

**Naif CD4+T Hücresinden Th17 Fenotipinde Etkör T  
Hücresinin Oluşturulması ve Th17 Farklılaşmasında Rol  
Oynayan MikroRNA'ların Belirlenmesi**

**Proje No: 110T412**

**Yürütücü: Dr. Ayten Nalbant**

**Haziran 2014**

**İzmir**

## Önsöz

İmmunoloji alanında CD4+T hücrelerinin farklılaşması konusunda yeni ve heyecan verici bilgilerin elde edildiği bir dönem yaşanıyor. Yeni yardımcı T hücre efektör alt grupları tanımlanıyor. 2007 yılında CD4+T hücrelerinin farklı bir efektör türü bulunmuş ve üretmiş oldukları IL-17 sitokininin dolayı yardımcı T 17 tipi (Th17) olarak adlandırılmıştır. Th17 hücrelerinin konak immun yanıtına olan katkıları henüz araştırılmakta birlikte, bu hücrelerin Romatoid artrit, Sedef hastalığı, Crohn hastalığı ve Multiple sclerosis gibi patolojilerde rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Farede Th17 farklılaşmasında rol oynayan mekanizmalar daha detaylı olarak bilinmesine rağmen, insanda farklı kökenlerden gelen CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipini oluşturmak için gerekli olan faktörler üzerine olan çalışmalar halen devam etmektedir. T hücre farklılaşmasında sitokinler, transkripsiyon faktörleri gibi faktörlerin dışında mikroRNA gibi düzenleyici moleküllerin de etkili olması söz konusudur. İndüklenen ya da baskılanan miRNAların T hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayan anahtar transkripsiyon faktörlerini ya da diğer genleri regüle etmeleri olasıdır. Proje kapsamında insan naif CD4+T hücrelerinden in vitro koşullarda Th17 T hücreleri oluşturulmuş ve bu hücrelerden RNA örnekleri saflaştırılmıştır. MikroRNAların Th17 hücrelerinin farklılaşmasındaki rolleri ortaya koyma adına daha sonra RNA örneklerinden derin sekanslama ile mikroRNA profillemesi yapılmıştır. Projemiz TÜBİTAK KBAG tarafından 110T412 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

Özet (Türkçe).....	6
Özet (İngilizce).....	7
Sonuç Raporu Ana metni	
1. Giriş.....	8
2. Literatür özeti	
2.1. Th17 hücrelerinin tanımı ve bulunuşu.....	8
2.2. <i>In vitro</i> Th17 kültür koşulları.....	8
2.3. MikroRNA'lar .....	10
2.3.1. IFN $\gamma$ üretiminin miRNA-aracılıklı düzenlemesi.....	10
2.3.2. Treg hücre fonksiyon ve plastisitesinin miRNA vasıtasıyla düzenlenmesi.....	11
2.3.3. Th17 hücre farklılaşmasında mikroRNA'lar.....	11
3. Gereç ve yöntem	
3.1. PBMC (periferel kan mononükleer hücreleri) izolasyonu.....	12
3.2. Naif CD4+T hücrelerinin izolasyonu.....	12
3.3. Naif CD4+T hücrelerinden Th17 alt grubunun oluşturulması .....	12
3.4. Th17 hücrelerinin IL-17 salınımı metodu ile ayrıştırılması.....	13
3.5. Th17 fenotipinin hücre içi sitokin boyama metodu ile tespiti.....	13
3.6. RNA izolasyonu ve derin sekanslama yöntemiyle miRNA'ların belirlenmesi.....	13
3.7. Biyoinformatik analizleri.....	14

#### 4. Bulgular

4.1. Periferel kandan mononükleer hücrelerin (PBMC) saflaştırılması ve beyaz kan hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu.....	14
4.2. Periferel kandan saflaştırılan PBMC'lerden naif CD4+T hücrelerinin ayrıştırılması.....	15
4.3. Th17 oluşumunda CD25 ve IL-17 ifade ilişkisi.....	17
4.4. Naif CD4+T hücrelerinin Th17 fenotipine farklılaşma miktarları.....	18
4.5.Th17 farklılaşması sırasında Th spesifik sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin zamana bağlı ölçümü.....	19
4.6. Th17 hücrelerinin sitokin salınım metodu ile ayrıştırılması.....	21
4.7. Th17 kültürlerinden RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin ölçülmesi.....	22
4.8.Derin sekanslama ile mikroRNA profillerinin çıkarılması.....	23
4.9. Biyoinformatik verilerin değerlendirilmesi.....	26
5. Sonuç .....	30
6. Kaynakça.....	32

## ŞEKİL VE TABLO LİSTELERİ

Şekil 1: PMBC hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu.....	15
Şekil 2: PMBC hücrelerinin apoptoz ölçümü.....	15
Şekil 3: Naif CD4+ T hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu .....	16
Şekil 4: CD25 ve IL-17 ilişkisi.....	17
Şekil 5: Farklı donörlerden elde edilen Th17 miktarları.....	19
Şekil 6. Th17 farklılaşması sırasında subset spesifik sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin kinetiği.....	20
Şekil 7. Ayırıştırılmış IL17+ CD4+T hücreleri saflık analizi.....	21
Şekil 8: 3 donörün RNA örneklerinin biyoanalyzer görüntüsü.....	22
Şekil 9. MikroRNA Heat Map analizi.....	23
Şekil 10. Farklı ifade edilen MikroRNA'lar.....	25
Şekil 11. Okuma uzunluk dağılımı.....	27
Şekil 12. Örnekler arasındaki farklılıkların Venn diyagramı.....	28
Şekil 13. GO analiz sonuçları.....	29

## Özet

Th17 T hücreleri IL-17 sitokini ekspres eden CD4+T hücrelerinin bir alt sınıfıdır. İnsan Th17 farklılaşması için gereken kültür koşulları, regülatör moleküller ve bu hücrelerin sürdürülebilirliği üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. T hücre farklılaşmasında sitokinler, transkripsiyon faktörleri dışında mikroRNA gibi düzenleyici moleküllerin de etkili olabileceği önerilmektedir. Bu yüzden de, Th17 farklılaşmasında mikroRNA'ların rollerinin ortaya konması gerekmektedir. mikroRNA'lar (miRNAs) 17-23-nt uzunluğundaki RNA molekülleridir ve protein kodlayan genleri regüle ederler. Bu sebeple projenin amacı, insan periferik naif CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipindeki T hücre alt grubunu oluşturmak ve Th17 fenotip farklılaşmasında rol oynayan mikroRNA'ları derin sekanslama metodu ile profillerini çıkarmaktır.

Bu çalışmada, insan naif CD4+T hücreleri sağlıklı donörlerin periferik mononükleer kan hücrelerinden (PBMC) saflaştırılmış ve çeşitli stimulantlar (IL-6, IL-23, IL-1beta, TGF beta, anti-IL-4, anti-IFN gamma, anti-CD3 ve anti-CD28) ile birlikte kültüre konulmuştur. 5. gün kültürlerine taze besiyeri ve IL-23 eklenmiştir. Kültür sonlandırıldığında CD4+IL17A+T hücreleri Akım sitometrisi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Th17-farklılaşma kültür koşullarında CD4+T hücrelerinin aktive olduğunu (CD25+: 47%,  $p<0.01$ ) ve aktiveleşen hücrelerin IL-17 üreten hücrelere (33%,  $p<0.01$ ) dönüştüğünü göstermiştir. Ancak CD4+T hücrelerinin Th17 alt grubuna farklılaşma miktarları ve maksimum farklılaşma için gerekli zaman donör bazında farklılık göstermektedir. Th17 miktarları %11 ile %45 arasında değişirken, farklılaşma için gerekli zaman 6 ile 14 gün arasında değişmektedir.

MikroRNA profillerinin çıkarılması için negatif kontrol hücrelerinden ve Th17-pozitif hücrelerden RNA saflaştırılmıştır. RNA örnekleri Illumina MiSeq small RNA platformu kullanılarak derin sekanslama yapılmış ve örneklerin mikroRNA profilleri çıkarılmıştır. Biyoinformatik analiz sonuçlarına göre Th17-pozitif hücreler negatif hücrelerle karşılaştırıldığında (en az 5 kat ifade farkı esas alınarak) 41 adet mikroRNA farklı ifade edilmiştir. Bu mikroRNA'lardan 12 tanesi baskılanırken 29 tanesi aşırı ifade edilmiştir. Dolayısıyla proje kapsamında insan periferik kanındaki naif CD4+T hücrelerinden IL-17 üreten Th17 T hücreleri oluşturulmuş ve bu hücrelerin mikroRNA profilleri çıkarılmıştır.

Anahtar kelimeler: IL- 17, Th17 differentiation, microRNA

## **Abstract**

Th17 T cells are a subset of CD4<sup>+</sup> effector T cells. They identified by IL-17 expression. microRNAs (miRNAs) are 17-23-m length mRNA molecules and can regulate T helper differentiation like other regulatory molecules including cytokines and transcription factors. The role of microRNAs in Th17 differentiation is not known yet. Therefore, the aim of this project was to create Th17 effector T cells and the microRNAs in these Th17 phenotype were determined by deep sequencing.

In this study, naive CD4<sup>+</sup> T cells were purified from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Isolated cells were cultured with various stimulants (IL-6, IL-23, IL-1 beta, TGF-beta, anti-IL-4, anti-IFN gamma, anti-CD3 and anti-CD28). Culture medium was changed and cells were restimulated with IL-23 on day 5 after initiation of cultures. After indicated culture times, IL-17A expressing CD4<sup>+</sup>T cells were measured by flow cytometry. The results showed that naive CD4<sup>+</sup>T cells were activated in the Th17-polarizing conditions (CD25<sup>+</sup> T cells: 47%, p <0.01). Activated-CD25-positif cells were expressed IL-17 cytokine (33%, p <0.01). There were differences in the amounts of differentiated-Th17 cells among different donors. The Percentage of IL-17-positif cells was ranged from 11% to 45%. The culture time required for differentiation was also ranged from 6 to 14 days.

To profile microRNAs that play a role in Th17 differentiation, the RNA samples were isolated from Th17-positive and negative control cells. Illumina MiSeq small RNA platform was used to analyze microRNA profiles. Bioinformatics data showed that when Th17-positive cells compared to negative cells (at least 5-fold difference in expression), there were 41 microRNAs which were differentially expressed. 12 of those microRNAs were down regulated and 29 microRNAs were up-regulated. Therefore, in this project Th17 cells were *in vitro* produced from human naïve CD4<sup>+</sup>T cells and microRNA profiles of these cells were determined.

Key words: IL- 17, Th17 differentiation, microRNA



## Sonuç Raporu Ana Metni

### 1. Giriş

2007 yılında CD4+T hücrelerinin IL-17 sitokini üreten yeni bir T hücre efektör alt grubu olan yardımcı T-17 (T helper 17: Th17) hücreleri bulunmuştur. Farede Th17 farklılaşmasında rol oynayan mekanizmalar daha detaylı olarak bilinmesine rağmen, insanda farklı kökenlerden gelen CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipini oluşturmak için gerekli olan faktörler üzerine olan çalışmalar halen devam etmektedir. T hücre farklılaşmasında sitokinler, transkripsiyon faktörleri gibi faktörlerin yanında mikroRNA gibi düzenleyici moleküllerin de etkili olması söz konusudur. Bitirme raporu kapsamında CD4+T hücrelerinde son gelişmeler özetlendikten sonra, insan naife CD4+ T hücrelerinden Th17 T hücrelerinin oluşturulması ve mikroRNA profillerinin çıkarılması ile ilgili projemizin laboratuvarımızda elde ettiğimiz verileri tartışılacaktır.

### 2. Literatür özeti

#### 2.1. Th17 hücrelerinin tanımı ve bulunuşu

İnsandaki CD4 T hücrelerinin alt grupları 27 yıl kadar önce farelerde ilk olarak keşfedilmiş ve efektör fonksiyonların ve sitokinin üretimini farklı olduğu üzerinde durulmuştur (Zhu vd., 2010). Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar Th1 ve Th2 T yardımcı hücrelerinden başka Th17, Th9, nTreg, iTregs gibi farklı Th altgrupları üzerinde durulmuş (Doisne vd., 2011) ve 2005 yılında ilk olarak yeni bir Th alt grubu olarak Th17 hücreleri ile ilgili ilk önemli bulgular (Langrish vd., 2005) ortaya koyulmuştur ve bu hücrelerin otoimmün doku hasarında önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Langrish vd., 2005; Harrington vd., 2005; Park vd., 2005). 2006 yılında Bettelli ve Kuchroo bu hücrelerin nasıl farklılaştığını tanımlamıştır (Bettelli vd., 2006). 2006 yılının sonunda bu hücrelerin farklılaşmalarında rol alan transkripsiyon faktörünün ROR $\gamma$ t olduğu ortaya konulması ile bu hücrelerin ayrı bir yardımcı T hücresi alt grubu olduğu yaygın olarak kabul görmüştür (Ivanov vd., 2006).

#### 2.2 *In vitro* Th17 kültür koşulları

Th17 hücrelerinin farklılaşmasının *in vitro* koşullarda naif T hücrelerinden TGF- $\beta$ , IL-6 ve IL-21 sitokin kombinasyonunu kullanarak yapılabileceği gösterilmiştir (Bettelli vd., 2006). Bu bulgu esasında oldukça ilginçtir, çünkü TGF- $\beta$  sitokini tek başına etki ettiği zaman T hücre farklılaşmasını antienflematuvar özellikteki regülatör T hücreleri yönüne doğru ilerletmekte, IL-6 ile birlikte uyarım sağlandığı zaman ise proenflematuvar T hücre grubunun gelişimini

sağlamaktadır. TGF $\beta$  FOXP3'ü, TGF $\beta$  ve IL-6 kombinasyonu ise STAT3 bağımlı indüksiyon yolu ile Th17 hücrelerinin gelişmesini indükler. Buna karşılık STAT3 ve ROR $\gamma$ t genel transkripsiyon faktörleri AP-1 aile üyesi BATF, IRF4, NF $\kappa$ B ve NFAT, IL-17A/IL-17F lokustaki transkripsiyonu ve kromatini yeniden düzenlemektedir (Ciofani vd., 2012). IL-17A/F sitokinine ilave olarak Th17 hücreleri IL-22, TNF $\alpha$ , GM-CSF ve IL-23 reseptörünü ekspres ederler. Bu şekilde IL-23 Th17 hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasını düzenlenmektedir. Farklı moleküller ve yollar Th17 hücrelerin gelişimini tetikleyen ve önleyen olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Zuniga vd., 2013; Muranski vd., 2013). Naif T hücre kültürlerinde T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ + ifadesi gereklidir. Th1, Th2 ve Th17 hücrelerinde CXCR3, CCR4/CRTH2 ve CCR6 ifadesinin uyarılması yeterlidir (Manel vd., 2008; Sundrud vd., 2003).

İnsan Th17 alt gruplarının farklı kemokin reseptör ifade profilleri, dokuların farklı setlerine erişim sağlamaktadır. Th17 "fate-mapping reporter" kullanarak, Th17 hücrelerin büyük bir kısmının gelişim sırasında IL-17A veya IL-17F ifadesi gözlemlenmiştir (Ivanov vd., 2006). Açık bağırsak enflamasyonunda Th17 hücrelerinin yokluğu sırasında Payer's parçacıkları Tfh hücrelerine dönüşebilir (Hirota vd., 2013). IL-17A ifadesinin Th17 hücrelerinde doğal olarak geçişine ilişkin görüşlerin aksine epigenetik sabitliğinin insan CCR6+, CCR4+, CD161+, Th17 hafıza hücrelerinde IL-17A/IL17-F'in yerleştiği kanıtlarla gösterilmiştir (Cohen vd., 2011). İnsan Th17 bellek hücreleri Th1 polarize sitokinlere maruz kalmıştır. IFN $\gamma$  ifadesinin indüklenmesi IL-17A, IL-17F lokusundaki epigenetik baskıyla örtüşmektedir. İnsan hafıza Th hücreleri IL-2, IL-7, IL-15 gibi sadece hemostatik sitokinlerle stimüle edilmektedir (Wan vd., 2011). *In vitro* Th17 polarizasyon esnasında üretilen IL-17A, IFN $\gamma$  efektör T hücreleri sonraki büyüme ve yeniden stimülasyon sonrasında IL-17A'nın ifade kapasitesinin korunmasını sağlar. Th17 sitokin ifadesinin sitokin kullanılarak aktivasyonu, ortak gama zinciri PI-3K sinyal ve AKT, FOXO1 ve kruppel benzeri faktör 4 (KLF4) transkripsiyon faktörlerin inhibisyonunu içerir. FOXO1'in ve KLF4 ektopik ifadesi ve CCR6+ hafıza T hücrelerinin sitokin ifadesini inhibe eder. Bu faktörlerin shRNA aracılıklı susturulması IL-17A, IL-17F, IL-22'nin ifadesinin artmasına yol açar (Wan vd., 2011). FOXO1 Th17 hücrelerinde IL-23R ifadesini bastırdığını birçok yeni veriler göstermektedir. IL-23R ifadesinin ve FOXO1'e maruz kalarak *in vivo* patojenik Th17 hücre fonksiyonlarının artması SGK1 kinaz vasıtasıyla aktive olmaktadır.

İnsan CCR6+ hafıza T hücrelerinde Th17 sitokin ifadesinin sitokin bağımlı aktivasyonu sabit IL-17A sunan hücrelerden fazla büyümesine neden olmaz fakat *ex vivo* IL-17A ifadesinin yokluğu

CCR6 ve RORC ifadesine neden olur. CCR6+ ve RORC'a ek olarak ex vivo CCR6+ hafıza T hücreleri IL-17A'nın bağımsız CCL20'den ifade olur. CCL20, Th17 ile ilgili bir kemokindir. Onun CCR6 reseptörü Th17 doku içinde yerleşeceği yeri bulmasına aracılık eder (Wan vd., 2011). Lokal mikroçevreye bağlı olarak IL-17A, IL-17F, IL-22 ifadesini artırmak veya inhibe etmekle sonuçlanır. Eğer CCL20, IFN $\gamma$  tarafından ifade olunursa, enflamatuvar dokuda "nonclassic" Th1 hücreleri bulunur. *In vitro* oluşturulan Th17 hücrelerinden gelişmiş murin Th1 hücrelerden türemiş Th17 hücrelerinin analoğu olduğu gösterilmiştir. Naif T hücrelerinden direk gelişmiş klasik Th1 hücrelerin aksine enflamatuvar dokuda Th17 hücre mutasyonları ve farklılaşmadan elde edilen Th1 hücreleri belirgin bir proenflamatuvar fonksiyonlarına sahip olduğu düşünülmektedir. Th17'den türetilmiş Th1 hücrelerinin IL-23, IL-1R1 ve IL-17RE ifadelerini korumaları gerekmektedir. Klasik Th1 hücrelerinin ve Th17'den türetilmiş Th1 hücrelerinin yüzeysel CCR6 ifadesi eksiktir (Cosmi vd., 2011; Maggi vd., 2012).

### **2.3. MikroRNA'lar**

mikroRNA'lar (miRNAs) 17-23-nt uzunluğundaki RNA molekülleridir ve protein kodlayan genleri regüle ederler. Bu moleküllerin T hücrelerinin farklılaşmasındaki etkileri araştırılmaktadır. İndüklenen ya da baskılanan miRNA'ların T hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayan anahtar transkripsiyon faktörlerini ya da diğer genleri regüle etmeleri olasıdır. Bu sebeple bu projede insan periferik naif CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipindeki T hücre alt grubunu oluşturulduktan sonra Th17 fenotip farklılaşmasında rol oynayan mikroRNA'ları derin sekanslama metodu ile profili çıkarılmıştır. MikroRNA'lar T hücre aktivasyonu, farklılaşması, çoğalması ve sitokin üretimi gibi bir çok efektör fonksiyonlar için önemli regülatörler oldukları literatürde vurgulanmaktadır. mikroRNA'ların Th farklılaşması üzerinde rollerini vurgulayan literatür özeti aşağıda sunulmuştur.

#### **2.3.1 IFN $\gamma$ üretiminin miRNA-aracılıklı düzenlemesi**

Th1 hücrelerinde IFN $\gamma$  üretimi ve sinyali farklı düzeylerde birçok mikroRNA'lar tarafından düzenlenir. Soy belirleyen T box transkripsiyon faktörü (T-bet) Th1 hücreleri özellikle IFN-gamma sitokini ifadesini indükler. T-bet T hücre reseptörü (TCR) sinyal ile indüklenir. miR-146a doğrudan STAT-1 ve NF-KB sinyal molekülleri ile Traf6 ve Irak1'i hedefler (Yang vd., 2012). TCR aktivasyonu, miR-155 ifadesini indükler (Huffaker vd., 2012). Bununla birlikte, miR-155, aynı zamanda *lfngr1*'nin aşağı regülasyonunu da (down-regulation) indükler (Banerjee vd., 2010).

#### **2.3.2 Treg hücre fonksiyon ve plastisitesinin miRNA vasıtasıyla düzenlenmesi**

MicroRNA'ların Regülatör T hücrelerine (Treg) spesifik ifadesi efektör T hücreleri tepkilerini dizginlemek için gereklidir. Regülatör T hücrelerinde miRNA ifadesi olmadığı zaman otoimmüniteyle sonuçlanır. Treg hücre fonksiyonu ve plastisite düzenlenmesinde miRNA-aracılı yollar gösterilmiştir (Cobb vd., 2006). Regülatör T hücrelerinde miR-146a ifadesi doğrudan hedef STAT1 inhibisyonu ile interferon-gamma (IFN-g) aracılı Th1 hücre patolojisini önler (Lu vd., 2010). miR-155, interlökin-2 reseptör (IL-2R) sinyalinin negatif bir regülatörü olan Socs1 vasıtasıyla Treg hücre onarımını teşvik eder (Lu vd., 2009). Retinoik asit kaynaklı miR-10a ifadesi belirli koşullar altında Tfh hücre inhibisyonu transkripsiyonel represör B hücreli lenfoma-6- (BCL6) ve nükleer co-represör 2 (Ncor2) aracılı regülatör T hücrelerinin Tfh hücrelere dönüşümünü önler (Takahashi vd., 2012). miR-17 ~ 92 dizileri Treg hücre biyolojisinin farklı yönlerini sınırladığını göstermiştir. miR-17~92 bu işlemleri nasıl düzenlediğine dair kesin mekanizmalar bilinmemektedir (Jiang vd., 2011).

### **2.3.3. Th17 hücre farklılaşmasında mikroRNA'lar**

EAE ve multiple sklerozisli fare ve sıçanlardan alınan T hücrelerinde mikroRNA profili çalışılmıştır. Bu hastalıklarda görev alan miRNA'ların hastalığa farklı katkıları olacağı vurgulanmıştır. miRNA-326'nın Ets-1 tetikleyerek Th17 farklılaşmasını artırırken (Du vd., 2009), *in vivo* koşullarda miR-10a'nın ifadesinin Th17 farklılaşmasını sınırladığı gösterilmiştir. Bu etkinin Retinoik asite bağlı miR-10a and T-bet ifadesine bağlı olduğu belirtilmiştir (Takahashi vd., 2012). miR-301a karşı antagomir ile transfeksiyonu, IL-17 sekresyonunda azalma ile sonuçlanmıştır. Oysa ki, miR-21 ve miR-155 karşı antagomirin bu sitokin üzerinde anlamlı bir etkisi vardır. Bu veriler miR-301a'nın Th17-benzeri sitokin salgılama profili üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu önermiştir. Bu veriler aynı zamanda miR-301a'nın özellikle Th1 hücre farklılaşmasında değil Th17 hücre farklılaşmasında ilgili olduğunu göstermektedir. Th17 hücrelerinin *in vitro* farklılaşması sırasında miR-301a ifadesinin kinetiği analiz edilmiştir. Th17-polarize naif T hücrelerinde olduğu gibi, farklılaşma başlamasından 3 gün sonra miR-301a'nın upregüle olduğu belirlenmiştir. Ayrıca CCR6 ifadesi, Th17-hücre fenotipi ile bağlantılı kemokin reseptörü, uyarılmış naif CD4+ T hücrelerinde aşağı-düzenlenmiş miR-301a antagomir tarafından engellendi. Bu nedenle, bu veriler miR-301a Th17 farklılaşmasını teşvik ettiğini önermiştir (Mucko vd., 2012). Th17 hücre farklılaşmasında miR155'in hem bir T hücre-intrinsik rolü vardır hem de dentritik hücreler tarafından Th17 hücre polarize sitokinlerinin üretiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Murugaiyan vd., 2011).

### 3. Gereç ve yöntem

#### 3.1. PBMC (periferal kan mononükleer hücreleri) saflaştırılması

Gönüllü olarak seçilen sağlıklı (kalp, şeker hastalığı gibi sistemik bir hastalığa sahip olmayan, sigara içmeyen ve herhangi bir ilaç tedavisi altında olmayan) insanların periferal kan örneklerinden beyaz kan hücreleri "*Ficoll-Hypaque Density Gradient Centrifugation*" yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu çalışmanın yapılabilmesi gerekli olan Etik kurul izni; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İzmir 1 No'lu Etik kurulundan 03.08.2009 tarihinde 09-7.1/10 karar numarası ile alınmıştır (Not: Etik kurul onay belgesi Eylül 2009 başvuru döneminde TÜBİTAK'a gönderilmiştir).

#### 3.2. Naif CD4<sup>+</sup>T hücrelerinin saflaştırılması

Periferal kandan saflaştırılan mononükleer hücre farksiyonlarından (PBMC) naif CD4<sup>+</sup> T hücreleri 'Human Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II' kullanılarak ve firmanın prosedürü izlenerek tekrar saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış bu hücreler naif CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T hücreleridir. Bu hücrelerle Th17 kültürleri yapılmıştır. Ayrıştırılan bu hücreler hem fenotipik olarak hem de canlılık açısından akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

#### 3.3. Naif CD4<sup>+</sup>T hücrelerinden Th17 alt grubunun oluşturulması

Deneylerimizde kültür koşulları olarak Rodriguez ve ark.'nın kültür koşulları uygulanmış (Rodriguez ve ark. 2007) fakat daha çok Th17 yapımı için de besiyeri olarak RPMI yerine IMDM besiyeri kullanılmıştır (Veldhoen ve .ark. 2009). Kısaca, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naif hücreler IMDM besiyerinde kültüre anti-CD3 (5µg/ml), anti-CD28 (5µg/ml), stimule edici sitokinler için IL-1β (10ng/ml), IL-23 (20 ng/ml), IL-6 (50ng/ml) ve nötralize edici sitokinler için IFNγ(10µg/ml) ve IL-4 (10µg/ml) varlığında 5 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra farklılaşmış hücrelerin çoğaltılması için kültür tazelenerek IL-23 ve nötralize edici IFNγ(10µg/ml) ve IL-4 (10µg/ml) sitokinleri eklenerek hücreler 7 gün daha inkübatörde tutulacaktır. Kültür süresinin ilk 5 günlük süresince hücrelerin fenotipik değişimleri takip edilmiş ve kültürlerin 5. 7. ve 12. günlerinde de hücreler Th17 T hücre alt grubu belirteçleri ile boyanarak karakterize edilmiştir.

### **3.4. Th17 hücrelerinin IL-17 salınımı metodu (cytokine secretion assay) ile ayrıştırılması**

Th17 hücrelerinin IL-17 üretiminin karakteristik olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, naif CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipine polarize olan hücreler sitokin salınım prensibine dayalı cytokine secretion assay protokolüne göre ayrıştırılmıştır. Bunun için IL-17 secretion assay-detection kit (Miltenyi Biotec) kullanılmış ve firmanın prosedürü izlenerek Th17 pozitif ve Th17 negatif hücreler ayrıştırılmıştır. Ayrıştırmayı takiben yıkanan hücreler akım sitometrisinde okutulmuş ve hücrelerin saflık oranı tesbit edilmiştir.

### **3.5. Th17 fenotipinin hücre içi sitokin boyama metodu ile tespiti**

Sitokinlerin hücre dışına salınımını engellemek için hücrelere kültür bitiminden 4 saat öncesinde protein transport inhibitörü olarak bilinen BFA (Brefeldin A veya Monensin) eklenmiştir. Kültür bitiminde yıkanan hücrelere fiks edilip geçirgen hale getirilmiştir. Daha sonra bu hücreler farklı kombinasyonlarda sitokin antikorları ile de boyanmıştır. Örneğin Th17 fenotipi için anti-IL-17 sitokini ve CCR6 seçilmiştir. Bu hücrelerin bilinen diğer Th alt gruplarına dönüşmediklerini göstermek için anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-4, anti-TGF $\beta$  ve anti-IL10 sitokinleri ile de kombine boyamalar yapılmıştır. Yıkama sonrası hücreler akım sitometrisi cihazında okutulup analiz edilmiştir. Ayrıca sitokin boyamaları yapılırken ilk önce hücre yüzey boyamı yapılarak CD4, CD25 ve CD69 gibi fenotipik belirteçler kullanılmıştır. Analizle yapılırken hücreler CD4 belirteciye göre kapılama yapılarak analiz edilmiştir.

### **3.6. RNA izolasyonu ve derin sekanslama yöntemiyle miRNA'ların belirlenmesi**

Th17 fenotipine itilen(stimüle kültürler) hücrelerden ve sadece besiyerinde tutulan hücrelerden (negatif kontrol) alınan örnekler yıkayıp sayılmış ve bu hücrelerden toplam RNA saflaştırılmıştır. Toplam RNA saflaştırmasında *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kiti kullanılmış (Ambion) ve firmanın prosedürü izlenmiştir. Elde edilen RNA'nın miktarı nanodropta ve RIN'i bioanalyzer da kit ile ölçülmüş ve elde edilen örnekler -80°C'de saklanmıştır. RNA kalitesi ve RIN Agilent 2100 bioanalyzer aletinde and RNA LabChip® kits kullanılarak ölçülmüştür. Örneklerden RIN değeri 8.5 ve üstü olanlar derin sekanslama için kullanılmıştır. Th17 pozitif (3 biyolojik replika) ve Th17 negatif hücrelerin (3 biyolojik replika) RNA örnekleri derin sekanslama da herbir örnek bir kanala yüklenerek Illumina MiSeq sekanslama platformu kullanılarak TruSeq small RNA sample prep (V3) analizi yapılmıştır. Bunun için Ligand firması aracılığıyla Source Bioscience (İngiltere) firmasından hizmet alımı yapılmıştır.

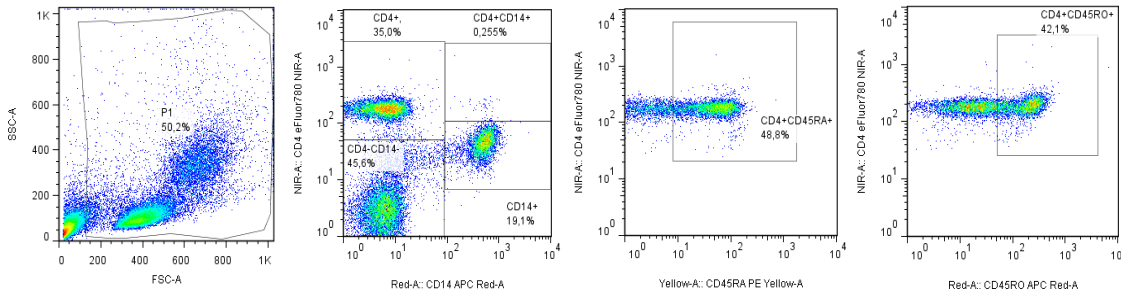
### 3.7. Biyoinformatik analizleri

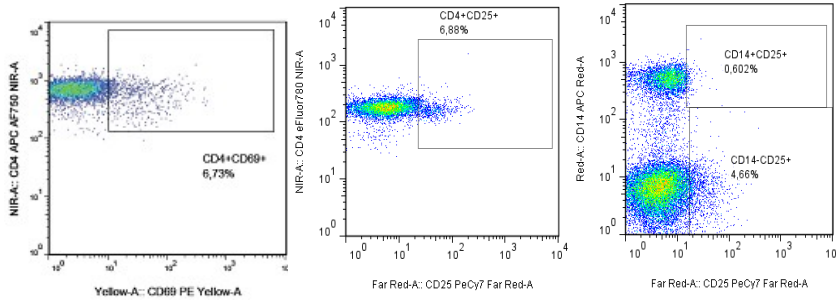
TruSeq small RNA sample prep (V3) analizi elde edilen veriler için ilgili örneklerin biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Bu analizler kapsamında primer analiz olarak From Image to Intensities using MiSeq Control Software (MCS,2.3.32), From Base Call to Quality Score using Real Time Analysis (RTA.2.0), Demultiplex and FASTQ file generation gibi analizler yapılmıştır. Ayrıca ileri biyoinformatik analizler olarak da Quality Check(QC), Adapters TrimmedAnd Filtered, Alignment to reference genome and small RNA veribankası (database), Post Alignment QC, Normalization and Quantification, Different Expression Analysis ve Heat Map ( on DEG) analizleri yapılmıştır. Veri analizleri için Ligand firmasından hizmet alımı yapılmıştır.

## 4. Bulgular

### 4.1. Periferel kandan mononükleer hücrelerin (PBMC) saflaştırılması ve beyaz kan hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu

Sağlıklı ve gönüllü donörlerden alınan periferel kan örnekleri Ficoll-Hypaque densite gradient yöntemine göre saflaştırılmıştır. Elde edilen hücreler, Tripan Mavisi ile boyanarak Thoma Lamında sayılarak canlı ve ölü hücre sayıları belirlendiği gibi hücrelerin canlılık testleri Annexin V ve 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) ile boyanarak apoptoz oranı Akım sitometri cihazında da ölçülmüştür. Ayrıca PBMC'lerin profillerinin çıkarılması için bu hücreler CD4, CD14, CD25, CD69, CD45RA ve CD45RO belirteçleriyle de boyanmış ve bu örnekler sitometrisinde Akım analiz edilmiştir. Saflaştırılan PBMC'lerin CD4, CD14, CD25, CD69, CD45RA ve CD45RO gibi yüzey belirteç ifadeleri Şekil 1'de gösterilmektedir. PBMC fraksiyonundaki hücrelerin % 35'i CD4+, %19'u CD14' tür. CD4+ kapılanmış PMBC'lerin % 6.8'i CD25, % 36'sı CD69, % 48.8'i CD45RA ve % 41.2'si CD45RO'dur.

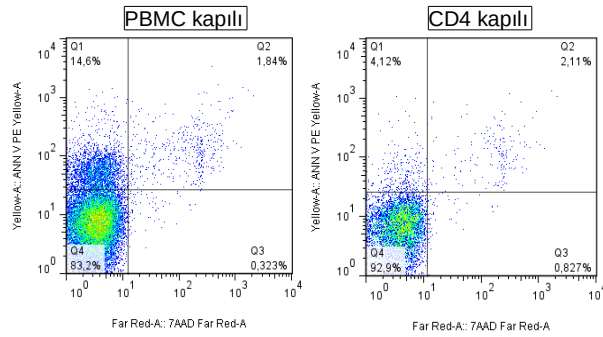




### Şekil 1: PMBC hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu

Saflaştırılan PMBC'ler CD4, CD14, CD25, CD69, CD45RA ve CD45RO gibi yüzey belirteçlerini ölçmek için uygun antikorlar ile boyanarak akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

Ayrıca bu hücrelerin Annexin V ve 7AAD boyaması ile ölçülen hücre ölüm oranı da tespit edilmiştir. Şekil 2' de sağdaki dot plot PMBC'lerin ölüm oranı %14.6 dır. Soldaki dot plot ise CD4 kapılanmış T hücrelerinin ölüm oranını (preapoptotic hücreler) %4.12 olarak göstermektedir. Dolayısıyla bu hücreler naif CD4+T hücrelerinin ayrıştırılmasında kullanılacaktır.



### Şekil 2: PMBC hücrelerinin apoptoz ölçümü.

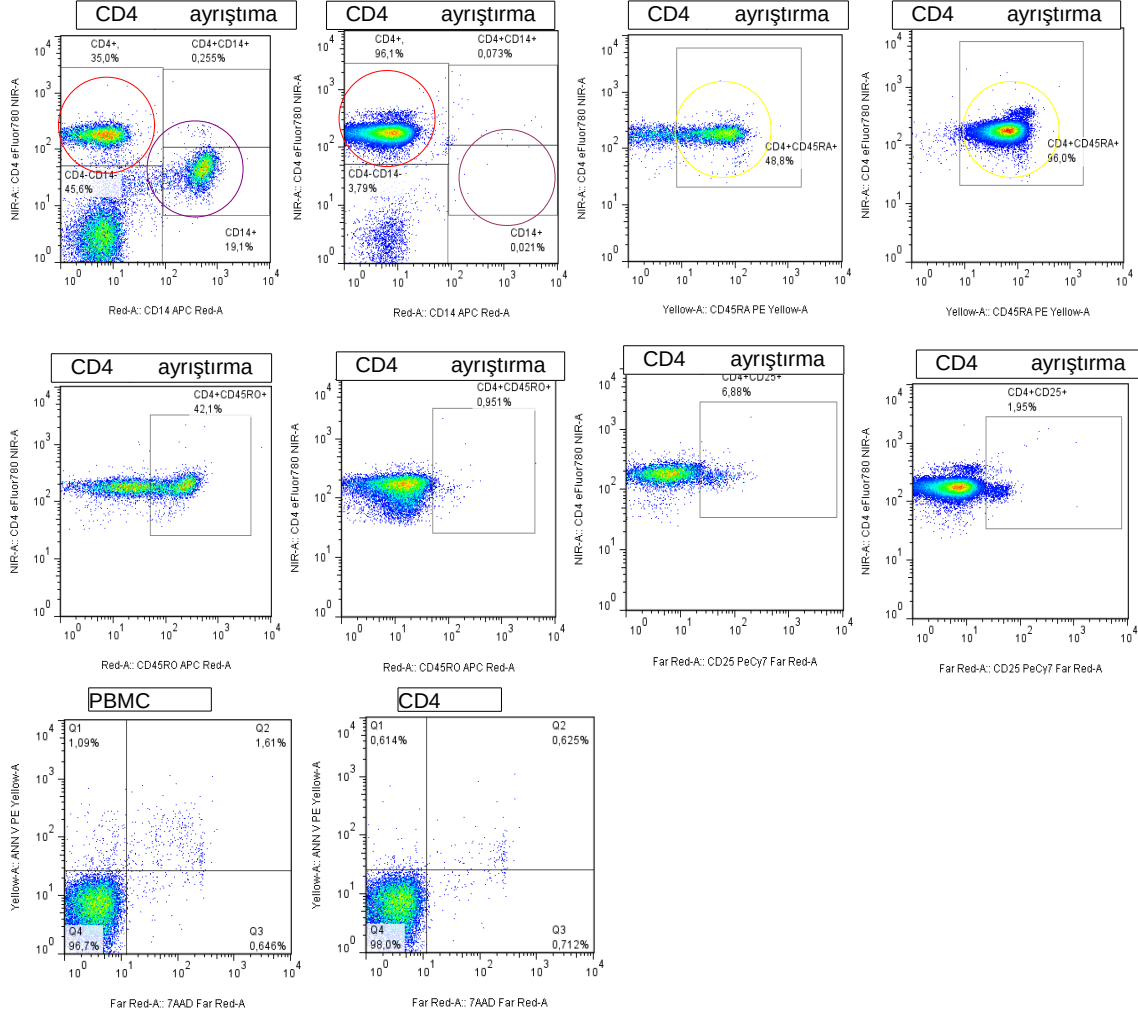
İzole edilen PMBC'ler Annexin V ve 7-AAD ile boyanarak örnekler akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

## 4.2. Periferel kandan saflaştırılan PMBC'lerden naif CD4+T hücrelerinin ayrıştırılması

PBMC'lerden naif CD4+T hücreleri naif ayrıştırma protokolu ile ve variomacs kullanılarak yapılmıştır. Ayrıştırılan naif CD4+ T hücreleri fenotipik karakterizasyonları için CD4, CD14, CD25, CD45RA ve CD45RO gibi yüzey belirteçleri ile boyanmış ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Ayrıştırılan CD4+T hücrelerin profillenmesi Şekil 3' te gösterilmektedir. Figür 3'te görüldüğü gibi CD4+T hücrelerinin oranı 35%'ten %96.1'e çıkarılmıştır. CD14 pozitif monositler hücre karışımından tamamen uzaklaştırılmıştır. CD4+CD45RA+ oranı %48.8'den %96'ya CD4+CD45RO+ oranı %42.1'den 0.951'e düşürülmüştür. Dolayısıyla ayrıştırılmış hücreler CD4+



açısından zenginleştirilmiş ve CD45RA ifade oranına göre naif oldukları için Th17 kültürlerinin oluşturulmasında kullanılacak olan naif CD4+T hücreleri için kullanılmışlardır. Ayrıca Şekil 3'te görüldüğü gibi Annexin/7-AAD ile boyanan hücrelerin apoptozu ölçülmüştür. CD4+ kapılanmış hücrelerde apoptoz oranı %1'in altındadır. Apoptoz testleri hücreleri kültüre koymak için kullanılmış ve ayrıştırılan hücrelerin ayrıştırma işleminin hücre ölüm oranına etki edilmediği gösterilmiştir.



### Şekil 3: Naif CD4+ T hücrelerinin fenotipik karakterizasyonu.

Saflaştırılan PBMC'lerden naif CD4+T hücreleri Variomacs kullanılarak magnetik ayrıştırma yapılmıştır. Ayrıştırılan naif hücreler CD4, CD14, CD25, CD69, CD45RA ve CD45RO gibi yüzey belirteçleri ile boyanmış ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Ayrıca Annexin/7-AAD ile bu hücrelerin apoptozu ölçülmüştür.

### 4.3. Th17 oluşumunda CD25 ve IL-17 ifade ilişkisi

Stimüle ve negatif kültürlerdeki naif CD4+T hücrelerindeki değişiklikler Th17 hücre grubu özel belirteçi olan IL17A sitokin ifadesi ve aktivasyon belirteci olan IL-2 reseptörü (CD25) ölçülerek takip edilmiştir. Şekil 4'te negatif ve stimüle edilmiş hücrelerde CD4+T hücreleri tarafından ifade edilen CD25 ile IL17 sitokininin ifadesi kültürün 15. gününde gösterilmektedir. CD25 belirteci ifade eden CD4+ T hücreleri %56'ya ulaşmıştır. CD4 kapılanmış hücreler CD25 miktarına karşı IL17A sitokin ifadesi açısından analiz edildiğinde 15. günde CD25+IL17+ hücrelerin (%11.4) CD25-negatif-IL17+ hücrelere oranı (%7.4) yaklaşık 1,5 katıdır. Veriye göre Th17 hücreleri hem CD25pozitif hem de CD25negatif olan hücrelerden gelmektedir (Şekil 4). Dolayısıyla, aktive olan hücrelerin büyük bir kısmı (%11.4; CD25+IL-17+) IL-17 ifade eden Th17 fenotipine dönüşmektedir.

Negatif

—————> CD25+IL  
17+

Stimüle I

—————> CD25-  
IL17+

IL17

StimüleI

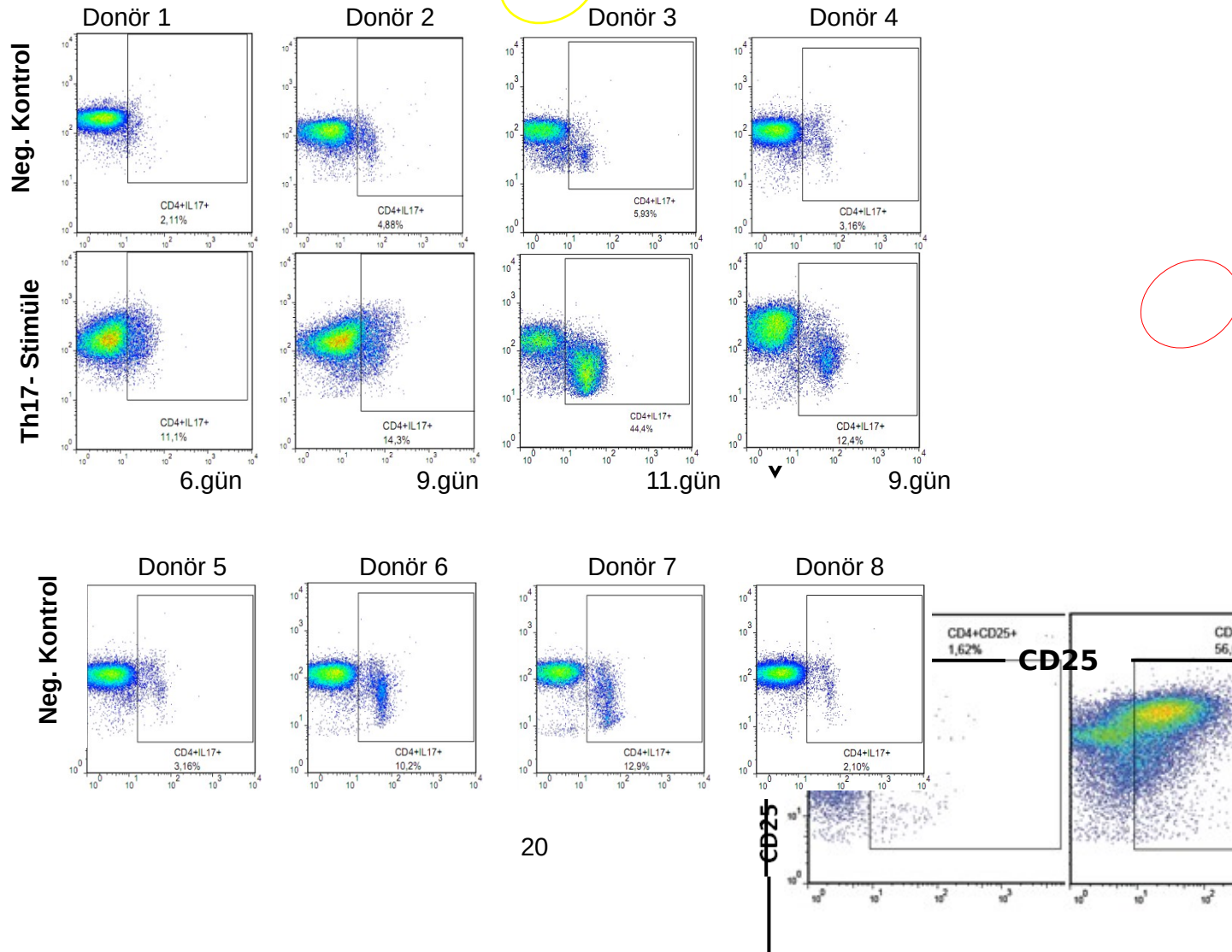
Negatif kontrol

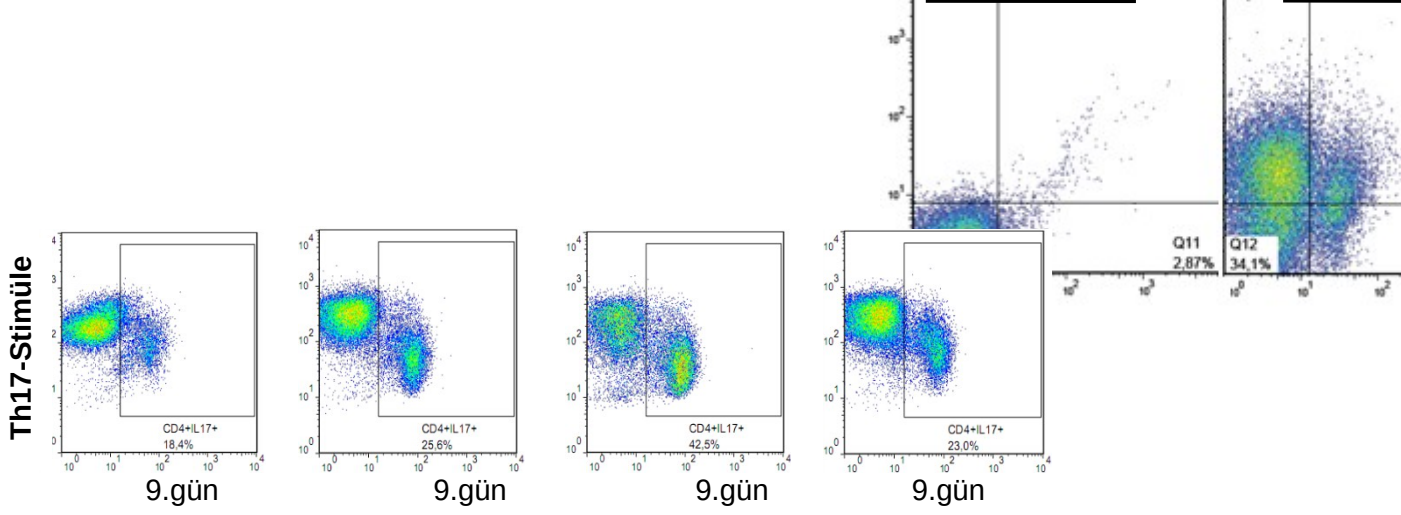
#### Şekil 4: CD25 ve IL17 ilişkisi

IMDM (negatif) ve Th17 kültür koşullarında (stimülayon+neutralizasyon antikorları) bekletilen hücrelerde CD4, CD25 ve IL-17A sitokin boyaması yapılmıştır. Kültürün 15. gününde CD4+T hücrelerinin CD25 ifadesi (Figür 4 üst kısım) ve CD4+T hücresi kaplanmış hücrelerin CD25 ve IL17 ifadesinin (Figür 4 alt kısım) akım sitometrisi analizi görülmektedir.

#### 4.4. Naif CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipine farklılaşma miktarları

Saflaştırılan naif CD4 hücreleri çeşitli sitokin ve stimulantlar varlığında kültüre konulup optimum kültür koşullarında Th17 fenotipe dönüşmeleri takip edilmiştir. Bu hücre tipinin karakteristik sitokini olan IL-17 sitokini CD4+ T hücreler arasında ölçülmüştür. Farklı donörlerden gelen naif CD4+T hücrelerinin Th17 hücre tipine farklılaşmaları hem zaman (donör 1-4, Şekil 5) hem de Th17 olma oranı açısından (donör 5-8, Şekil 5) farklılık göstermektedir (Şekil 5). Örneğin, Şekil 5'te görüldüğü gibi Th17 olma oranı % 11.1 (donör I), %14.3 (donör II) ve %44. 2 (donör III) gibi farklı donörlerde farklı oranlarda gerçekleşmiştir.





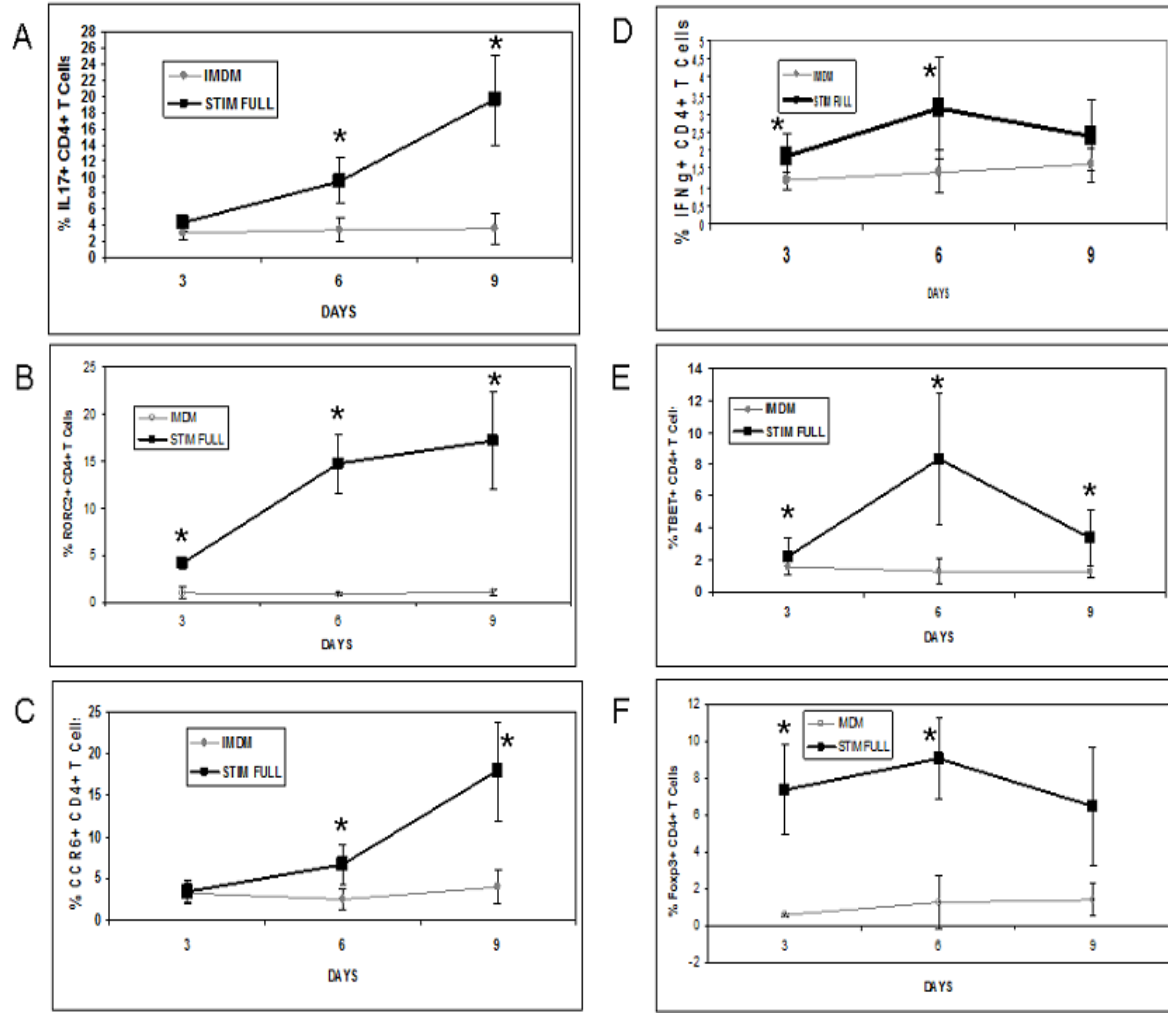
**Şekil 5: Farklı donörlerden elde edilen Th17 miktarları**

Farklı donörlerden alınan hücreler belirtilen günde kültüre edilmiştir. IMDM (Negative kontrol) ve Th17 kültür koşullarında (Th17 stimüle) kültüre edilen hücrelerde IL-17 sitokin miktarı ölçülmüştür. Akım sitometrisi analizinde hücreler CD4+ T hücreleri üzerine kapılanmış ve bu hücrelerin IL-17 sitokini ifadesi incelenmiştir.

#### **4.5. Th17 farklılaşması sırasında Th altgrup spesifik sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin zamana bağlı ölçümü**

Kültüre edilen hücrelerde IL-17 sitokinin yanında diğer yardımcı T hücrelerinin karakteristik sitokinleri de zamana bağlı olarak ölçülmüştür. Şekil 6'daki veriye göre (A) IL17 ifadesi zamana bağlı olarak artmaya başlamıştır; fakat özellikle 6. günden sonra IL17 ifadesi oldukça artmış ve 9. günde IL17 ifadesi %19,6' ya ulaşmıştır. (B) RORC2 ifadesi 6. güne kadar artmış ve 9. gününde maksimum değere ulaşmıştır. (C) CCR6 ifadesi 3. güne kadar değişmemiş ve 9. günden sonra artmaya başlamıştır. (D) IFN $\gamma$  ifadesi 6. güne kadar artmış ve sonra giderek azalmaya başlamıştır. Sonunda, IFN $\gamma$  ifadesi başlangıç miktarına geri dönmüştür. (E) T-bet'teki ifade artışı 3. günden itibaren 6. güne kadar gözlemlenmiş; sonra T-bet miktarı giderek azalmış ve sonunda negatif kültür ile aynı miktara gelmiştir. (F) Foxp3 ifadesi ilk günlerde aniden bir artış göstermiş, fakat 6. günden sonra düşmeye başlamış ve stabil hale gelmiştir.

Şekil 6'da gösterilen veriler her bir molekül için 12 donörden alınan hücrelerden farklı deney sonucunda elde edilen değerlerin ortalamasını göstermektedir. Buna göre 9 günlük Th17 kültür sonucunda; CD4+T hücrelerinde en yüksek Th17 miktarı:%20, RORC2 miktarı:16%, CCR6 miktarı:%17, IFN $\gamma$  miktarı:%3, T-bet miktarı:%8, Foxp3 miktarı:%9 dur.

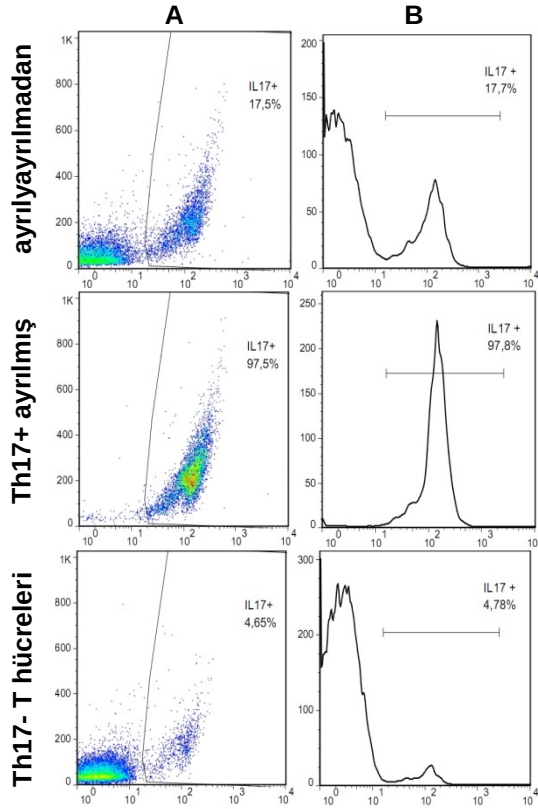


**Şekil 6. Th17 farklılaşması sırasında subset spesifik sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin kinetiği**

Naif CD4+T hücreleri stimüle ve negatif kontrol koşullarında kültüre konuldu ve kültürün 5. gününde, besiyeri anti-IL23, anti-IFN $\gamma$  ve anti-IL4 içeren taze besiyeri ile değiştirildi. Hücre içi immunoflorasan boyamadan 4h önce, kültürler Golgi Stop eklendi. 4h inkübasyondan sonra hücreler yıkandı ve hücre yüzeyleri CD4 ve CCR6 antikolarıyla boyandı. Fiksasyon ve permeabilizasyondan sonra, florasan konjuge antikolar (IL17, RORC2, IFN $\gamma$ , T-bet ve Foxp3) hücrelere eklenerek, moleküllerin ekspresyonları BD FACSarray cihazı ile ölçüldü. Elde edilen veriler, Flow Jo programı kullanılarak analiz edildi. Tüm popülasyonlardaki CD4 hücreleri kapılarak analiz yapıldı. (Ölçülen her bir molekül için 6 farklı deneyden elde edilen değerlerin ortalaması gösterilmektedir). Hata çubukları standart sapmayı gösterir ve "\*" p<0,05 anlamına gelmektedir.

#### 4.6. Th17 hücrelerinin sitokin salınım metodu ile ayrıştırılması

Th17 hücrelerinin IL-17 üretiminin karakteristik olduğu gösterilmiştir. Bunun için IL-17 secretion assay-detection kit kullanılarak Th17-pozitif ve Th17-negatif hücreler ayrıştırıldı. Ayrıştırmayı takiben yıkanan hücreler akım sitometrisinde okutuldu ve hücrelerin saflık oranı tesbit edildi. Şekil 7'de görüldüğü Th17-pozitif olarak ayrıştırılmış hücrelerde Th17 pozitif hücrelerin saflık oranı %97.8 olarak ölçüldü.



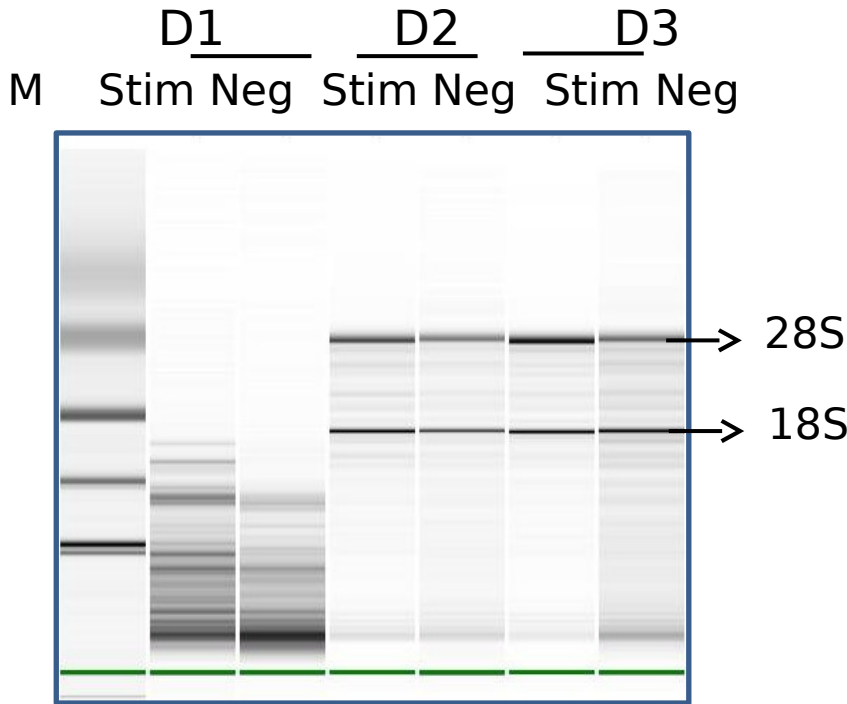
#### Şekil 7. Ayrıştırılmış IL17+ CD4+T hücreleri saflık analizi

Th17 kültür koşullarında IL-17+ olan T hücreleri sitokin salınımı deneyi ile ayrıştırılmıştır. Hücreler IL-17 sitokin ifadesine göre akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Th17 ayrılmayan hücreler; ayrıştırma öncesi IL-17 miktarını, Th17+ ayrılmış hücreler Th17 pozitif hücre miktarı ve saflığı, Th17 negatif T hücreleri ise Th17 olmayan hücreleri ve kaçırılan hücre miktarını göstermektedir. A; hücrelerin SSC (x eksen) ve FSC (y eksen) analizini, B; ise hücrelerin histogram analizlerini göstermektedir. B'de X eksen sayımı (count) ve Y eksen IL17 sitokin ifadesinin MFI'sini (mean fluorescence intensity) göstermektedir

#### 4.7. Th17 kültürlerinden RNA izolasyonu ve RNA kalitesinin ölçülmesi

Ayrıştırılmış Th17 pozitif olan hücrelerden yeterli RNA çıkmadığından, negatif kontrol kültürlerinden ve Th17 kültür şartlarında stimüle edilmiş hücrelerde (ilgili kültürlerin 9.gününde) IL-17 sitokin miktarları ölçülmüş ve sonra ayrıştırma yapılmadan hücrelerden RNA saflaştırılması yapılmıştır. Şekil 8'de 3 donörden elde edilen RNA örnekleri görülmektedir.

Şekil 8'de görüldüğü üzere Donör 1 (D1) elde edilen toplam RNA parçalanmış olmakla birlikte, Donor 2 ve 3'ten iyi kalitede toplam RNA saflaştırılmıştır. Bioanalizer verilerine göre, örneklerin RIN (RNA Integrity Number, RNA kalite kontrol değeri) 7 ve üzerindedir.



**Şekil 8: 3 donorun RNA örneklerinin biyoanalizer görüntüsü**

Th17 pozitif (stimüle) ve Th17 negatif hücre kültürlerindeki hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin biyoanalizer sonucu görülmektedir.

#### 4.8. Derin sekanslama (dizileme) ile mikroRNA profillerinin çıkarılması

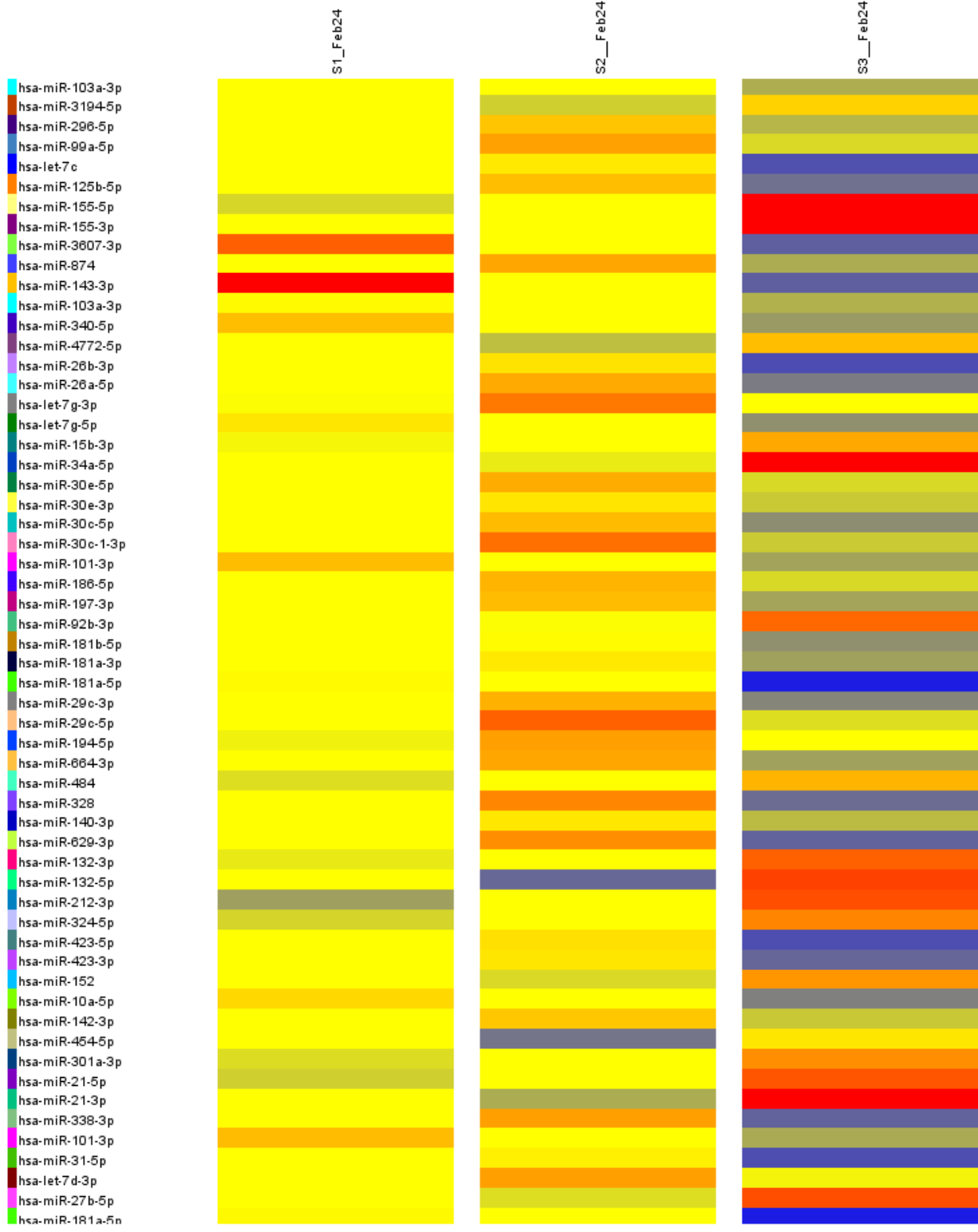


Elde edilen Th17 pozitif ve Th17 negatif RNA örneklerinde Illumina MiSeq derin sekanslama platformu kullanılarak (Source bioscience, İngiltere. Hizmet alımı), bu örneklerdeki mikroRNA profilleri çıkarılmıştır. Elde edilen verilerin biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Elde edilen verilerin Heat Map analizi Şekil 8'de gösterilmektedir.

Şekil 8'de S1; kontrol hücreleri (ayrıştırılmış CD4 naif T hücreleri, kültüre konulmamış), S2; negatif kültürlerden gelen hücreler (negatif kontrol) ve S3; th17 stimüle edilmiş hücrelerdir. Ayrıca negative control ile stimüle edilmiş örneklerde yapılan karşılaştırmalı analiz sonucu 5 kat farklı ifade edilen mikroRNA'ların listesi de Şekil 9' daki excel tablosunda görülmektedir.

Şekil 9' daki tabloda görüldüğü gibi 41 adet mikroRNA negatif kontrol hücreleri ile Th17 pozitif stimüle hücrelerde farklı ifade edilmiştir. Bu mikroRNA'lardan 12 tanesi baskılanırken 29 tanesi aşırı ifade edilmiştir.

**Şekil 9. MikroRNA Heat Map analizi.** MikroRNA'ların farklı ifadelerinin görüntüsü. S1; kontrol hücreleri (ayrıştırılmış CD4 naif T hücreleri, kültüre konulmamış), S2; negatif kültürlerden gelen hücreler (negatif kontrol) ve S3; th17 stimüle edilmiş hücrelerdir. (mavi az ifade, sarı orta ifade, kırmızı pozitif yüksek ifade demek)



### Şekil 10. Farklı ifade edilen mikroRNA'lar

Negatif kontrol hücreleri ile Th17 pozitif stimüle hücrelerdeki mikroRNAların farklı ifadeleri karşılaştırılmıştır. İfade farkı 5 kat ve fazlası bu grupta listelenmiştir.

MI0000268	192,7	up	hsa-mir-34a
MI0016004	75,87	up	hsa-mir-3614
MI0000273	60,48	up	hsa-mir-183
MI0000743	51,03	up	hsa-mir-34c
MI0000272	32,63	up	hsa-mir-182
MI0016884	28,45	up	hsa-mir-4518
MI0005568	24,32	up	hsa-mir-301b
MI0003823	21,76	up	hsa-mir-449c
MI0001518	20,08	up	hsa-mir-18b
MI0000478	18,9	up	hsa-mir-149
MI0016883	16,38	up	hsa-mir-4517
MI0000681	15,77	up	hsa-mir-155
MI0006415	14,5	down	hsa-mir-1275
MI0017330	13,86	up	hsa-mir-4697
MI0017432	12,27	up	hsa-mir-2467
MI0006416	11,34	up	hsa-mir-1276
MI0016764	11,34	up	hsa-mir-4425
MI0008329	10,23	up	hsa-mir-1908
MI0014231	10,08	up	hsa-mir-3187
MI0017385	10,04	up	hsa-mir-4746
MI0014249	9,484	up	hsa-mir-3200
MI0000742	9,449	up	hsa-mir-34b
MI0000286	9,102	up	hsa-mir-210
MI0003560	8,551	up	hsa-mir-92b
MI0014210	8,492	up	hsa-mir-3176
MI0019303	8,291	down	hsa-mir-5696
MI0000804	7,96	down	hsa-mir-328
MI0000089	7,527	down	hsa-mir-31
MI0001519	7,272	up	hsa-mir-20b
MI0003782	7,002	down	hsa-mir-1468

MI0000072	6,931	up	hsa-mir-18a
MI0019308	6,871	down	hsa-mir-5701-1
MI0000750	6,502	down	hsa-mir-26a-2
MI0000083	6,433	down	hsa-mir-26a-1
MI0006353	6,423	down	hsa-mir-1291
MI0000470	5,552	down	hsa-mir-125b-2
MI0005545	5,378	down	hsa-mir-190b
MI0000748	5,319	up	hsa-mir-130b
MI0000446	5,293	down	hsa-mir-125b-1
MI0000288	5,23	up	hsa-mir-212
MI0000100	5,212	up	hsa-mir-98

#### 4.9. Biyoinformatik verilerin değerlendirilmesi

Biyoinformatik olarak Şekil 9 ve 10'da gösterilen veriler hakkında detaylı bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

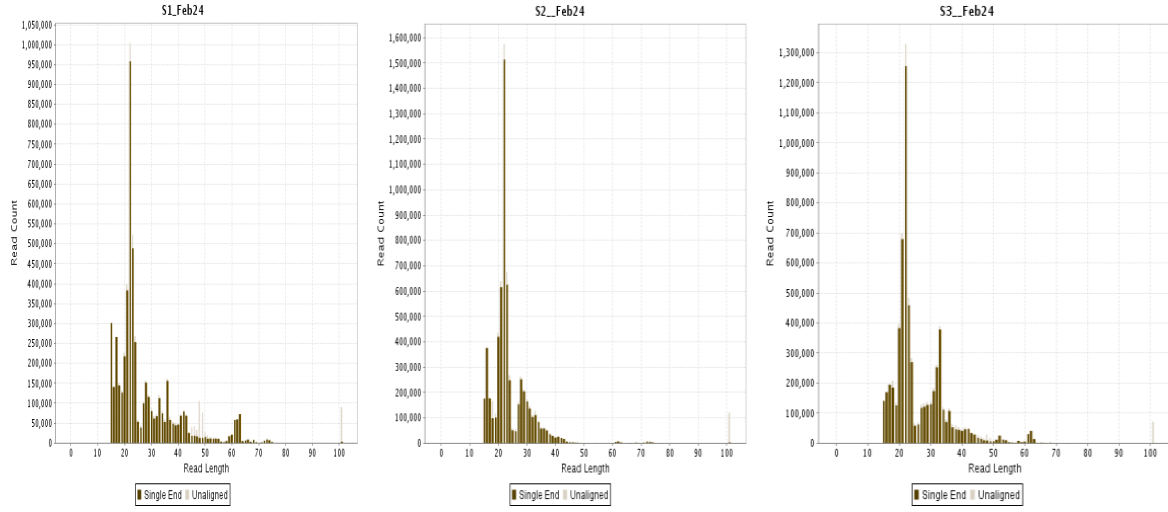
**A.** 3 örnekte herbir örnek için yaklaşık 2.7 milyon sekans okundu. Bu sekansların %95.97 si insan genomu ile eşleşti. Örnekler hakkındaki bilgi ve kodlama aşağıdaki gibidir.

S1; (kontrol) Ayrıştırılmış naif CD4 T hücreleri, kültüre konulmadı ve direkt RNA saflaştırılması yapıldı.

S2: (Th17 negatif kontrol); naif CD4T hücreleri sadece besiyerinde kültüre konuldu.

S3: (Th17 pozitif hücreler); naif CD4T hücreleri Th17 kültür koşullarında kültüre konuldu .

**B.** Okuma uzunluğu dağılımı (read length distribution) bakıldığında profiller beklendiği gibi birbirine benziyor. Dolayısıyla cDNA hazırlanması aşamasında teknik bir sorun yok gibi görünüyor. Büyük çoğunluğu beklendiği gibi 15-35nt arasındadır. Şekil 11'de örneklerin okuma uzunluk dağılımı görülmektedir (X ekseninde okuma sayısı, y ekseninde okuma uzunluğu gösterilmektedir).



### Şekil 11. Okuma uzunluk dağılımı

Örneklerin okuma uzunluk dağılımı görülmektedir (X ekseninde okuma sayısı, y ekseninde okuma uzunluğu gösterilmiştir).

### C. Örneklerde farklı ifade karşılaştırması ve Venn diyagramları

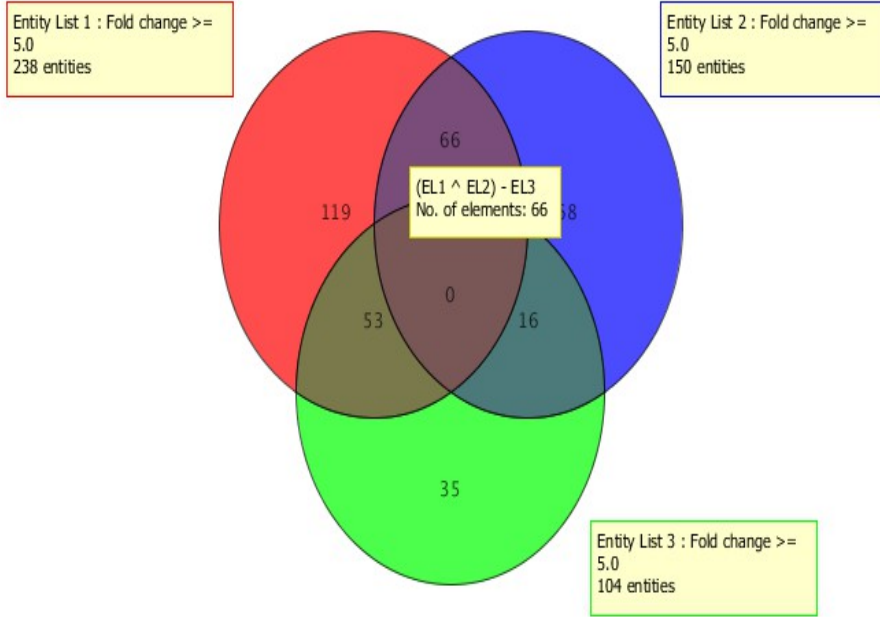
Her bir dönörden 3 RNA örneği saflaştırılıp her birinin RNASeq analizi yapılmıştır.

Entity List 1: S3 (stim) ile S1(ctrl:kontrol),

Entity List 2: S3 (stim) ile S2 (Neg) ve

Entity List 3: S1 (ctrl: kontrol) ile S2 (neg) karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Örnekler arasındaki farklılıklar Şekil 12'deki Venn diyagramında görülmektedir. 5-kattan fazla farkın olduğu bu venn diyagramı "bütün küçük RNA'ları" içermektedir. Bunların aralarından miRNA'ları seçtiğimizde bu sayının 41 olduğunu görülmektedir.



### Şekil 12. Örnekler arasındaki farklılıkların Venn diyagramı

Venn diyagram analizlerine göre Stim (Th17 pozitif) ile negatif kontrol (Th17 negatif) karşılaştırıldığında (en az 5 kat ifade farkı esas alınarak) 41 adet mikroRNA farklı ifade edilmiştir. Bu mikroRNA'lardan 12 tanesi baskılanırken 29 tanesi aşırı ifade edilmiştir (Şekil 10).

### D. GO analizi

Elde edilen liste de (Şekil 10) ifadesi artan ya da azalan mikroRNA'ların GO analizi yapılmıştır. Şekil 13'te GO analiz sonuçları gösterilmektedir. Verilere göre mikroRNA'ların biyolojik prosesler, moleküler fonksiyonlar ve hücrel yapılar da görev alabilecekleri görülmektedir.

GO ACCESSION	GO Term	p-value	hedef mRNA sayısı
GO:0008150  GO:0000004  GO:0007582	biological process	5,32E+02	1810
GO:0005622	intracellular	3,58E-05	1522
GO:0009987  GO:0008151  GO:0050875	cellular process	1,19E-06	1519
GO:0044424	intracellular part	2,36E-04	1492
GO:0005488	binding	1,84E-02	1456
GO:0043226	organelle	3,35E-02	1298
GO:0043229	intracellular organelle	1,69E-01	1297
GO:0043227	membrane-bounded organelle	2,76E-01	1186
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	1,73E-01	1184
GO:0065007	biological regulation	6,94E+02	1151
GO:0008152	metabolic process	5,25E-01	1145
GO:0050794  GO:0051244	regulation of cellular process	6,69E+01	1029
GO:0044237	cellular metabolic process	9,81E-03	1013
GO:0044238	primary metabolic process	8,35E-02	990
GO:0005515  GO:0045308	protein binding	6,72E-04	961
GO:0044422	organelle part	2,34E+02	852
GO:0044444	cytoplasmic part	1,98E+02	846
GO:0044446	intracellular organelle part	2,69E+01	840
GO:0043170  GO:0043283	macromolecule metabolic process	1,32E-01	807
GO:0005634	nucleus	1,51E+02	750
GO:0044260  GO:0034960	cellular macromolecule metabolic process	4,66E-02	748
GO:0019222	regulation of metabolic process	1,59E-01	666
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	4,15E-03	648
GO:0080090	regulation of primary metabolic process	6,16E-02	599
GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process	1,30E+01	557
GO:0032502	developmental process	3,47E+02	541
GO:0006139  GO:0055134	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	6,02E+01	541
GO:0016043	cellular component organization	3,99E+01	523
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	3,00E-02	514
GO:0019219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	9,00E-03	509
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	2,60E-01	501
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	3,04E-01	497
GO:0010468	regulation of gene expression	5,62E+00	483
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	8,87E-02	480
GO:0048856	anatomical structure development	5,37E+02	470
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	1,33E+02	455
GO:0045449  GO:0061019	regulation of transcription	5,87E+00	432
GO:0009059  GO:0043284	macromolecule biosynthetic process	4,49E+01	424
GO:0034645  GO:0034961	cellular macromolecule biosynthetic process	4,49E+00	418
GO:0048519  GO:0043118	negative regulation of biological process	3,47E+01	399
GO:0016070	RNA metabolic process	3,62E+02	398
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	1,42E+01	386
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	1,95E+00	375
GO:0044267	cellular protein metabolic process	3,29E+02	361
GO:0006351  GO:0061022	transcription, DNA-dependent	1,82E+02	308
GO:0032774	RNA biosynthetic process	2,03E+02	308
GO:0043412	macromolecule modification	1,76E+01	304
GO:0006464	protein modification process	1,00E+01	291
GO:0050790	regulation of catalytic activity	6,11E+01	278
GO:0043687	post-translational protein modification	1,44E+02	256
GO:0044265  GO:0034962	cellular macromolecule catabolic process	1,95E+02	113
GO:0009894	regulation of catabolic process	1,09E+02	89
GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	6,54E-01	80
GO:0034661	ncRNA catabolic process	3,04E+01	9

### Şekil 13. GO analiz sonuçları

İfadesi artan ya da azalan mikroRNA'ların GO analizi görülmektedir.

**E.** En çok artış (5 kat fark dikkate alınarak) gösteren ile en çok baskılanmış mikroRNA'lar için literatür taraması da yapılmıştır (her iki gruptaki ilk 5'er mikroRNA için). Bu çalışmalarımız devam da etmektedir. Örneğin, miR-34a'nın p53 tümör supresor yolağında rol oynadığı ve miRNA-34

ün bazı kanserlerin oluşmasında etkili olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca Targetscan program sonuçlarına göre mir-34a'nın hedeflerinden biri de TGIF2 genidir (TGF-B-induced factor homeobox 2). Bu mikroRNA'nın TGF-beta sinyal yolağında rol olabileceğini düşündürebilir. Yapılan bir çalışmada multiple myeloma hastalarında Th17 sitokinleri ile mikroRNA'lar arasındaki ilişki araştırılmış ve miR-34a'nın multiple myeloma hastalarında azaldığı ve bu hastalarda ifadesi artan IL-17, IL-21 and IL-27 gibi sitokinlerin bazı mikroRNA'ların ifadelerini baskılamış olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2014). Ayrıca mir-34c'nin göğüs kanser hücrelerinde G2/M hücre döngüsünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Achari vd., 2014).

Azalan mikroRNA'lardan biri olan mir-328'in epitel-mezenkimal geçişi inhibe ettiği basınçla-tetiklenmiş renal fibrosis modelinde gösterilmiştir (Chen vd., 2014). Literatür taramasına göre bizim bulduğumuz en fazla ifade edilen ve baskılanan ilk 5'er mikroRNA'nın (Şekil 10) Th17 farklılaşması ile ilgili rolleri henüz ortaya konulmamıştır. Bizim bu alandaki çalışmalarımız planladığımız yeni projelerle devam edecektir.

## 5. Sonuç

Proje kapsamında yapılan deneylerle PBMC'lerden naif CD4+T hücreleri saflaştırılmış ve bu hücrelerin fenotipik karakterizasyonu yapılmıştır. PBMC fraksiyonundaki hücrelerin % 35'i CD4+, %19'u CD14' tür. CD4+ kapılanmış PMBC'lerin % 6.8'i CD25, % 3.6'sı CD69, % 48.8'i CD45RA ve % 41.2'si CD45RO'dur. Naif CD4+T hücrelerinde apoptoz da ölçülmüştür. Hücrelerde apoptoz tesbit edilmemiştir. Gerek periferel kandan PBMC gerekse elde edilen PBMC'lerden naif CD4+T hücrelerinin ayrıştırılmasında sorun yaşanmamıştır. Ayrıştırılan hücrelerin CD45RA oranı %98 ve üstü ise bu hücreler kültürlerde kullanılmıştır.

Bu çalışmada, insan naif CD4+T hücreleri sağlıklı donörlerin periferel mononükleer kan hücrelerinden (PBMC) saflaştırılmış ve çeşitli stimulantlar (IL-6; 30ng/ml, IL-23; 10ug/ml, IL-1beta; 10ug/ml, TGF-beta; 0.5ng/ml, anti-IL-4; 10ug/ml , anti-IFN-gamma; 10ug/ml, anti-CD3 (5ug/ml) ve anti-CD28 (5ug/ml) ile birlikte kültüre konulmuştur. 5. gün kültürle taze besiyeri ve IL-23 eklenmiştir. Kültür sonlandırıldığında CD4+IL17A+T hücreleri Akım sitometrisi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Th17-farklılaşma kültür koşullarında CD4+T hücrelerinin aktive olduğunu (CD25+: 47%, p<0.01) ve aktifleşen hücrelerin IL-17 üreten hücrelere (33%, p<0.01) dönüştüğünü göstermiştir. Dolayısıyla optimize ettiğimiz kültür koşullarında maksimum derecede IL-17 ifade eden Th17 fenotipinin oluşturulması sağlanmıştır. Literatürde yayınlanan ve kültür koşullarının önerildiği çalışmaların (Velhoen ve ark., 2009; Yang ve ark., 2008; Streeck ve ark., 2008) hepsinden daha fazla Th17 fenotipinde hücre yaptığımız kültür koşulları optimizasyonu çalışmalarımız yayına hazırlanmaktadır



Farklı donörlerden gelen naif CD4+T hücrelerinin Th17 hücre tipine farklılaşmaları hem zaman hem de Th17 olma oranı açısından farklılık göstermektedir (Şekil 5). Th17 miktarları %11 ile %45 arasında değiştiği görülmüştür. Bu nedenle derin sekanslama için kullanılan örneklerde IL-17 olma oranının en %20 olma şartı konulmuştur. Th17 farklılaşması için gerekli kültür zamanı 6, 9, 12 ve 14 gün arasında değişmektedir. Verilerimize göre toplam kültür süresi çoğunlukla 9 gün olarak belirlenmiş olup bazı kültürlerin daha uzun veya daha kısa süre sürmesinin nedeninin naif CD4+T hücrelerinin birey bazındaki genetik farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

MikroRNA profillerinin çıkarılması için negatif kontrol hücrelerinden ve Th17-pozitif hücrelerden RNA saflaştırılması yapılmıştır. RNA örnekleri Illumina MiSeq small RNA platformu kullanılarak derin sekanslama yapılmış ve örneklerin mikroRNA profilleri çıkarılmıştır. Biyoinformatik analiz sonuçlarına göre Th17-pozitif hücreler negatif hücrelerle karşılaştırıldığında (en az 5 kat ifade farkı esas alınarak) 41 adet mikroRNA farklı ifade edilmiştir. Bu mikroRNA'lardan 12 tanesi aşağı-regüle (down) olurken 29 tanesi aşırı ifade (up) edilmiştir.

Literatürde Th17 farklılaşmasında rol oynayan mikroRNA'lar ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. 2010 yılında TÜBİTAK tarafından projemiz desteklendiğinde hiçbir miRNA henüz Th17 farklılaşması ile ilintilendirilmemişti. Şimdi literature bakıldığında multiple sclerosis hastalarında miRNA-326'nın Ets-1 tetikleyerek Th17 farklılaşmasını artırırken (Du ve ark., 2009), *in vivo* koşullarda miR-10a'nın ifadesinin Th17 farklılaşmasını sınırladığı gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2012). Buna ilaveten, veriler miR-301a'nın Th17 farklılaşmasını teşvik ettiği önerilmiştir (Mycko ve ark., 2012). Th17 hücre farklılaşmasında miR155'in hem bir T hücre-intrinsik rolü vardır hem de dentritik hücreler tarafından Th17 hücre polarize sitokinlerinin üretiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Murugaiyan ve ark., 2011). Şekil 10'da listelenen mikroRNA listesinde görüldüğü gibi mir-555 yaklaşık 16 kat aşırı ifade edilmiştir. hsa-mir-301b ifadesi de 25 kez artmıştır. mirRNA-10a ve miRNA-326 listede yer almamaktadır. Th17 farklılaşmasında kullanılan başlangıç hücrelerinin farklılığı, kullanılan farklı kültür koşulları gibi nedenlerin farklı mikroRNA ifadesine sebebiyet vermesi oldukça mümkündür.

Genel olarak elde edilen veriler değerlendirildiğinde, proje kapsamında naïf CD4+CD45RA pozitif T hücrelerinden IL-17 ifade eden Th17 T hücreleri yapılmıştır. Bu hücrelerden RNA saflaştırılmış ve derin sekanslama ile mikroRNA profilleri çıkarılmıştır. Literatürde bilinmeyen çok sayıda mikroRNA tesbit edilmiştir. mikroRNA'ların Th17 farklılaşmasındaki rollerini anlamaya yönelik çalışmalarımız devam edecektir.

## 6. Kaynakça

[Achari C](#), [Winslow S](#), [Ceder Y](#), [Larsson C](#). 2014. Expression of miR-34c induces G2/M cell cycle arrest in breast cancer cells. [BMC Cancer](#). 2014 Jul 26;14(1):538.

Banerjee, A., Schambach, F., DeJong, C. S., Hammond, S. M. & Reiner, S. L. Micro-RNA-155 inhibits IFN- $\gamma$  signaling in CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 225–231 (2010).

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K. 2006. "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells", *Nature*, 441, 235–238

Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C. N., Muratet, M., Newberry, K. M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F. K., Birchmeier, C., Wagner, E. F., Murphy, K. M., Myers, R. M., Bonneau, R., Littman, D. R. 2012. "A validated regulatory network for Th17 cell specification", *Cell*, 151, 289–303.

[Chen CH](#), [Cheng CY](#), [Chen YC](#), [Sue YM](#), [Liu CT](#), [Cheng TH](#), [Hsu YH](#), [Chen TH](#). 2014. MicroRNA-328 inhibits renal tubular cell epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the CD44 in pressure-induced renal fibrosis. [PLoS One](#). 9(6):e99802. doi: 10.1371/journal.pone.0099802.

[Cobb, B. S.](#), [Hertweck, A.](#), [Smith, J.](#), [O'Connor, E.](#), [Graf, D.](#), [Cook, T.](#), [Smale, S. T.](#), [Sakaguchi, S.](#), [Livesey, F. J.](#), [Fisher, A. G.](#), [Merkenschlager, M.](#) 2006. "A role for Dicer in immune regulation", *J. Exp. Med*, 203, 2519–2527.

Cohen, C. J., Crome, S. Q., MacDonald, K. G., Dai, E. L., Mager, D. L., Levings, M. K. 2011. "HumanTh1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci", *Journal of Immunology*, 187, 5615–26.

Cosmi, L., Cimaz, R., Maggi, L., Santarasci, V., Capone, M., Borriello, F., Frosali, F., Querci, V., Simonini, G., Barra, G., Piccinni, M.P., Liotta, F., De Palma, R., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. 2011. "Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis", *Arthritis and Rheumatism*, 63, 2504–15.

Doisne, J. M., Soulard, V., Bécourt, C., Amniai L., Henrot P., Havenar-Daughton C., Blanchet C., Zitvogel L., Ryffel B., Cavillon, J. M., Marie, J.C., Couillin, I., Benlagha, K. 2011. "Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1-invariant NKT cells to bacteria", *J Immunol*, 186,662–6.

Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z., Pei, G. 2009. "MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis", *Nature Immunol*, 10, 1252–1259.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K. M., Weaver, C. T. 2005. "Interleukin 17-producing CD4 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages", *Nature Immunol*, 6, 1123–1132

Hirota, K., Turner, J. E., Villa, M., Duarte, J. H., Demengeot, J., Steinmetz, O. M., Stockinger, B. 2013. "Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses" *Nature Immunology*, 14, 372–9.

[Huffaker, T. B.](#), [Hu, R.](#), [Runtsch, M. C.](#), [Bake, E.](#), [Chen, X.](#), [Zhao, J.](#), [Round, J.L.](#), [Baltimore, D.](#), [O'Connell, R.M.](#) 2012. "Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity", *Cell Rep*, 2, 1697–1709.

Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua D. J., Littman, D. R. 2006. "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells", *Cell*, 126, 1121-33.

[Jiang, S.](#), [Li, C.](#), [Olive, V.](#), [Lykken, E.](#), [Feng, F.](#), [Sevilla, J.](#), [Wan, Y.](#), [He, L.](#), [Li, Q. J.](#) 2011. "Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation", *Blood*, 118, 5487–5497.

[Langrish, C. L.](#), [Chen, Y.](#), [Blumenschein, W. M.](#), [Mattson, J.](#), [Basham, B.](#), [Sedgwick, J. D.](#), [McClanahan, T.](#), [Kastelein, R. A.](#), [Cua, D. J.](#) 2005. "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation", *J. Exp. Med*, 201, 233–240.

[Li Y.](#), [Li D.](#), [Yan Z.](#), [Qi K.](#), [Chen L.](#), [Zhang Z.](#), [Fan G.](#), [Li H.](#), [Xu K.](#), [Li Z.](#) 2014 . Potential relationship and clinical significance of miRNAs and Th17 cytokines in patients with multiple myeloma. [Leuk Res.](#) S0145-2126(14)00222-7. doi: 10.1016/j.leukres.2014.07.005.

[Lu, L. F.](#), [Boldin, M. P.](#), [Chaudhry, A.](#), [Lin, L. L.](#), [Taganov, K. D.](#), [Hanada, T.](#), [Yoshimura, A.](#), [Baltimore, D.](#), [Rudensky, A. Y.](#) 2010. "Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses", *Cell*, 142, 914–929.

[Lu, L. F.](#), [Thai, T. H.](#), [Calado, D. P.](#), [Chaudhry, A.](#), [Kubo, M.](#), [Tanaka, K.](#), [Loeb, G. B.](#), [Lee, H.](#), [Yoshimura, A.](#), [Rajewsky, K.](#), [Rudensky, A. Y.](#) 2009. "Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein" *Immunity*, 30, 80–91.

Maggi, L., Santarasci, V., Capone, M., Rossi, M. C., Querci, V., Mazzoni, A., Cimaz, R., DePalma, R., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Cosmi, L., Annunziato, F. 2012. "Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells", *EuropeanJournal of Immunology*, 42, 3180–8.

Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D. R. 2008. "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ mat", *Nature Immunology*, 9, 641–9.

Muranski, P., Restifo, N. P. 2013. "Essentials of Th17 cell commitment and plasticity", *Blood*, 121, 2402–14.

Murugaiyan, G., Beynon, V., Mittal, A., Joller, N., Weiner, H. L. 2011. "Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis", *J. Immunol*, 187, 2213–2221.

[Mycko, M. P.](#), [Cichalewska, M.](#), [Machlanska, A.](#), [Cwiklinska, H.](#), [Mariasiewicz, M.](#), [Selmaj, K. W.](#) 2012. "MicroRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, e1248–e1257.

[Park, H.](#), [Li, Z.](#), [Yang, X. O.](#), [Chang, S. H.](#), [Nurieva, R.](#), [Wang, Y. H.](#), [Wang, Y.](#), [Hood, L.](#), [Zhu, Z.](#), [Tian, Q.](#), [Dong, C.](#) 2005. "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17", *Nature Immunol*, 6, 1133–1141.

[Streeck, H.](#), [Cohen, K. W.](#), [Jolin, J. S.](#), [Brockman, M. A.](#), [Meier, A.](#), [Power, K. A.](#), [Waring, M. T.](#), [Alter, G.](#), Altfeld, M. 2008. "Rapid ex vivo isolation and long-term culture of human Th17 cells", *J Immunol Methods.*, 333(1-2), 115-25.

Sundrud, M. S., Grill, S. M., Ni, D., Nagata, K., Alkan, S. S., Subramaniam, A., Unutmaz, D. 2003. "Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in Th cell differentiation" *Journal of Immunology*, 171, 3542–9.

[Takahashi, H.](#), [Kanno, T.](#), [Nakayamada, S.](#), [Hirahara, K.](#), [Sciumè, G.](#), [Muljo, S. A.](#), [Kuchen, S.](#), [Casellas, R.](#), [Wei, L.](#), [Kanno, Y.](#), [O'Shea, J. J.](#) 2012. "TGF- $\beta$  and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells", *Nature Immunol*, 13, 587–595.

Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., Stockinger, B. 2009. "Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells", *J Exp Med*, 206(1), 43-9.

Wan, Q., Kozhaya, L., ElHed, A., Ramesh, R., Carlson, T. J., Djuretic, I. M., Sundrud, M. S., Unutmaz, D. 2011. "Cytokine signals through PI-3 kinase pathway modulate Th17 cytokine production by CCR6+ human memory T cells", *Journal of Experimental Medicine*, 208, 1875–87.

[Yang, L.](#), [Anderson, D. E.](#), [Baecher-Allan, C.](#), [Hastings, W. D.](#), [Bettelli, E.](#), [Oukka, M.](#), [Kuchroo, V.K.](#), Hafler, D. A. 2008. "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells", *Nature*, 454(7202), 350-2.

[Yang, L.](#), [Boldin, M. P.](#), [Yu, Y.](#), [Liu, C. S.](#), [Ea, C. K.](#), [Ramakrishnan, P.](#), [Taganov, K. D.](#), [Zhao, J. L.](#), [Baltimore, D.](#) 2012. "miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice", *J. Exp. Med*, 209, 1655–1670.

Zhu, J., Yamane, H., Paul W. E. 2010. "Differentiation of effector CD4 T cell populations", *Immunol*, 28, 445–89.

Zuniga, L. A., Jain, R., Haines, C., Cua, D.J. 2013. "Th17 cell development: from the cradle to the grave", *Immunological Reviews*, 252, 78–88.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. AYTEN NALBANT ALDANMAZ
Proje No:	110T412
Proje Başlığı:	Naif CD4+T Hücrelerinden Th17 Fenotipinde Eftör T Hücrelerinin Oluşturulması ve Th17 Farklılaşmasında Rol Oynayan MikroRNA'ların Belirlenmesi
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	BÜNYAMİN AKGÜL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2010 - 01/04/2014
Onaylanan Bütçe:	402100.0
Harcanan Bütçe:	370130.23
Öz:	<p>Özet</p> <p>Th17 T hücreleri IL-17 sitokini ekspres eden CD4+T hücrelerinin bir alt sınıfıdır. İnsan Th17 farklılaşması için gereken kültür koşulları, regülatör moleküller ve bu hücrelerin sürdürülebilirliği üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. T hücre farklılaşmasında sitokinler, transkripsiyon faktörleri dışında mikroRNA gibi düzenleyici moleküllerin de etkili olabileceği önerilmektedir. Bu yüzden de, Th17 farklılaşmasında mikroRNA'ların rollerinin ortaya konması gerekmektedir. mikroRNA'lar (miRNAs) 17-23nt uzunluğundaki RNA molekülleridir ve protein kodlayan genleri regüle ederler. Bu sebeple projenin amacı, insan periferik naif CD4+T hücrelerinden Th17 fenotipindeki T hücre alt grubunu oluşturmak ve Th17 fenotip farklılaşmasında rol oynayan mikroRNA'ları derin sekanslama metodu ile profillerini çıkarmaktır.</p> <p>Bu çalışmada, insan naif CD4+T hücreleri sağlıklı donörlerin periferik mononükleer kan hücrelerinden (PBMC) izole edilmiş ve çeşitli stimulantlar (IL-6, IL-23, IL-1beta, TGF beta, anti-IL-4, anti-IFN gamma, anti-CD3 ve anti-CD28) ile birlikte kültüre konulmuştur. 5. gün kültürle taze besiyeri ve IL-23 eklenmiştir. Kültür sonlandırıldığında CD4+IL17A+T hücreleri Akım sitometrisi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Th17-farklılaşma kültür koşullarında CD4+T hücrelerinin aktive olduğunu (CD25+: 47%) ve aktiveşen hücrelerin IL-17 üreten hücrelere (33%) dönüştüğünü göstermiştir. Ancak CD4+T hücrelerinin Th17 alt grubuna farklılaşma miktarları ve maksimum farklılaşma için gerekli zaman donör bazında farklılık göstermektedir. Th17 miktarları %11 ile %45 arasında değişirken, farklılaşma için gerekli zaman 7 ile 12 gün arasında değişmektedir.</p> <p>MikroRNA profillerinin çıkarılması için negatif kontrol hücrelerinden ve Th17-pozitif hücrelerden RNA izole edilmiştir. RNA örnekleri Illumina MiSeq small RNA platformu kullanılarak derin sekanslama yapılmış ve örneklerin mikroRNA profilleri çıkarılmıştır. Biyoinformatik analiz sonuçlarına göre Th17-pozitif hücreler negatif hücrelerle karşılaştırıldığında (en az 5 kat ifade farkı esas alınarak) 41 adet mikroRNA farklı ifade edilmiştir. Bu mikroRNA'lardan 12 tanesi aşağı-regüle (down) olurken 29 tanesi aşırı ifade (up) edilmiştir. Dolayısıyla proje kapsamında insan periferik kanındaki naif CD4+T hücrelerinden IL-17 üreten Th17 T hücreleri oluşturulmuş ve bu hücrelerin mikroRNA profilleri çıkarılmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Anahtar kelimeler: IL- 17, Th17 differentiation, microRNA
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır