T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

OTOZOMAL DOMİNANT POLİKİSTİK BÖBREK HASTALIĞINDA (ODPBH) microRNA SEVİYELERİNİN HASTALIĞIN SEYRİNE OLAN ETKİSİ

TSA-2013-4583

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
YRD. DOÇ. DR. İSMAİL KOÇYİĞİT
Tıp Fakültesi / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları

Araştırmacı:
PROF.DR. YUSUF ÖZKUL
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

YRD. DOÇ. DR. SERPİL TAHERİ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YRD. DOÇ. DR. ELİF FUNDA ŞENER
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2015

KAYSERİ

Bu projenin yürütülmesinde Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖZET……4

1. GİRİŞ……5
2.GEREÇ VE YÖNTEM……..6
3. BULGULAR……7
4. TARTIŞMA VE SONUÇ……..9

ÖZET

Amaç: Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı (ODPBH), ilerleyici kalıtsal hastalıklardan bir tanesidir. ODPBH hastalığının klinik gidişatını saptamada biyomarkırlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, mikroRNAlar (miRNA'lar) ile Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmak ve bu hastalığın tanısında ve tedavisinde miRNA'lar'ın biyomarkır olarak kullanılabilirliğini test etmek amaçlanmıştır.

Metod: Bu çalışma için 80 polikistik böbrek hastası (52 hipertansif, 28 normotansif) ve 50 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar ile sağlıklı bireylerden alınan serum örneklerinden 384 miRNA ekspresyonu Biomark Real Time PCR kullanılarak belirlenmiştir.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 44,6 ± 12.7 iken kontrol grubunda yaş ortalaması 45.4 ± 12.7'di. Hipertansif hastalarda kontrol grubuna kıyasla 15 miRNA (miR-3911, miR-4296, miR-4732-5p, miR-629-3p, miR-18a-5p, miR-365a-3p, miR-224-5p, miR-4732-5p, miR-4286, miR-1587, miR-4516, miR-128-3p, miR-27a-3p, miR-3689-5p, miR-202-3p) ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı farklandığı tespit edilmiştir. Hipertansif hastalar normotansif hastalar ile karşılaştırıldığında ise 4 miRNA'nın (miR-3907, miR-4687-5p, let-7c-5p, let-7d-3p) istatistiksel olarak anlamlı farklandığı saptandı. Hipertansif hastalar normotansif hastalar ile karşılaştırıldığında miR-3907 upregüle bulunurken; miR-4687-5p, let-7c-5p, let-7d-3p downregüle bulundu. Ayrıca, miR-1587, miR-3907, miR-92a-3p ve miR-3911 'Kronik Böbrek Hastalığı'nın evreleriyle korele dinamik değişiklikler gösterdi.

Tartışma: Bu çalışmada miR-3907'nin upregülasyonu ile Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı'nın klinik seyri arasında ilişki saptandı. Bulgularımıza göre bu miRNA'lar bu hastalığın takibinde ve tedavisinde biyomarkır olarak kullanılabilir.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı (ODPBH) son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilen progresif bir rahatsızlıktır. Hastaların çoğunda, renal fonksiyonlar hayatın dört ile altıncı dekadına kadar normal sınırlardadır [1]. Böbreklerdeki bozulmanın temel belirleyicileri hipertansiyon varlığı, artmış böbrek hacmi ve azalmış böbrek plazma kan akımıdır [2]. Büyümüş böbrekler ile minimal saptanabilir böbrek parankiminin ODPBH hastalarında bozulmuş renal fonksiyonlarla korele olduğu önceki çalışmalardan bilinmektedir [1,3]. ODPBH'de "Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY)" tanısı konulduktan sonra GFR yaklaşık olarak 4.4-5.9 ml/dak/yıl azalmaktadır [4]. Bu ilerleyici tablo net olarak açıklığa kavuşturulabilirse bu durumun ortaya çıkmasındaki hassas tetik noktası aydınlatılabilir. MikroRNA'lar (miRNA'lar) hücrelerde post-transkripsiyonel düzeyde negatif düzenleyici olarak farklılaşma, büyüme, apopitoz ve proliferasyonu düzenleyen küçük, kodlanmayan RNA molekülleridir [5]. Doku-kısıtlı miRNA ekspresyonlarının bulunması sonucunda araştırmacılar miRNA ekspresyonunun organ-spesifik rolleri olduğuna inanmıştır [6]. Kanıtlar miRNA ekspresyonundaki değişikliklerin böbrek dokusunun normal gelişiminde bir rol aldığını göstermektedir. Böbrek dokusundaki miRNA'ların bu değişken ekspresyonu ister normal gelişiminde ister hastalık sürecinde miRNA'ları böbrek fizyolojisi ve böbrek hastalıkları için değerli bir markır yapmaktadır [7]. Önceki araştırmalar miRNA'ların glomerüler ve tübüler hastalıkların progresyonunu düzenlediğini desteklemektedir [8]. Günümüzdeki çalışmalar ODPBH'de miRNA seviyelerinin potansiyel bir rolü olduğunu göstermektedir. miRNA'ların, polikistik böbrek hastalığı patogenezindeki transforming growth faktör β *(TGF-β)* ile kalsiyum sinyal yolaklarını da içeren önemli yolakları etkilediği için polikistik böbrek hastalığının progresyonunda çok önemli bir role sahip olduğunu ODPBH-rat modelleri de desteklemektedir [9,10]. Bu çalışmada, mikroRNAlar (miRNA'lar) ile Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığı arasındaki ilişkiyi araştırmak ve bu hastalıkta miRNA'lar'ın biyomarkır olarak kullanılabilirliğini test etmek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta Seçimi ve Çalışmanın Planlanması

Türk Nefroloji Derneği Polikistik Böbrek Hastalığı Çalışma Grubu kayıtlarındaki ODPBH hastaları arasından Haziran 2013 ile Ocak 2015 arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde takip edilen hastalar çalışmaya dahil edildi. Bu çalışma yerel etik komitesi tarafından onaylandı. Bu çalışma için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı'na başvuran 80 polikistik böbrek hastası (52 hipertansif, 28 normotansif) ve 50 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm katılımcılar yazılı bilgilendirilmiş onam formlarını imzaladıktan sonra çalışmaya dahil edildi. GFR<15 ml/dk/1.73m^2 olanlar ve kardiyovasküler hastalığı bulunan ODPBH hastaları çalışmadan çıkarıldı. Ayrıca hastalardan hipertansiyon tanısı için ayaktan kan basıncı ölçümleri yapıldı. 24 saatlik kan basıncı ölçümleri bir cihazla yapılmış, ve sonuçlar üretici firmanın yazılımı yardımıyla değerlendirildi. Ayaktan ölçümler 07.00-23.00 arası her 15 dakikada bir ve 23.00-07.00 arası ise her 30 dakikada bir yapıldı. Değerlendirme gece ve gündüz kan basıncı değerlerinin ortalamalarına göre yapıldı. Bir tüm gün boyunca ortalama sistolik basıncın ≥130mmHg ve/veya ortalama diastolik basıncın ≥80mmHg olduğu durumlar ile antihipertansif tedavi alan vakalar hipertansiyon olarak kabul edildi. Sonucunda, 80 ODPBH hastası (hipertansiyon var veya yok) bu çalışma için uygun bulundu. 50 yaş ve cinsiyet eşleşmiş sağlıklı birey kontrol grubuna dahil edildi. Aşağıda açıklandığı şekilde kayıtlı olan hastalar biyokimyasal parametreler açısından tekrar değerlendirildi. GFR ölçümleri (eGFR) Kronik Böbrek Hastalığı Epidemiyoloji İşbirliği denklemi kullanılarak yapıldı [11]. Kan örnekleri katılımcılar oturur pozisyondayken ve 12 saatlik açlıktan sonra 20 dakikalık dinlenmeyi takiben antikübital fossa veninden alındı. Biyokimyasal parametreler standart yöntemler kullanılarak belirlendi.

miRNA izolasyonu ve Real Time PCR

Hasta ve kontrollerden alınan kan örneklerinden serum izolasyonları yapıldıktan sonra, elde edilen serumlardan da miRNA izolasyonları yapıldı. 384 miRNA'nın ekspresyon profilinin belirlenmesinde High Throughput Microfluidic Real Time Quantitative PCR metodu kullanıldı. miRNA profili miRNA taqman propları kullanılarak BioMark Real-Time PCR Sisteminde çalışıldı. Bu metod miRNA ekspresyonlarının belirlenmesinde yüksek hassasiyete sahiptir. Microarray konfirmasyona ihtiyaç duyarken bu metod zaten Real Time PCR olduğu için konfirmasyona ihtiyacı yoktur.

1- İzole edilen miRNA'lar özel dizayn edilmiş özel loplu primerler ile cDNA'ya çevrilerek elde edilen cDNA'lar 5 kez dilüe edilerek preamplifiye edildi.

2- Preamplifiye edilen ürünler DNA süspansiyon buffer ile 10 kez dilüe edilerek, daha sonra Dinamik Array 96X96 chipine kontrol sıvısı enjekte edilmiş ve chip IFC cihazına yerleştirilerek chip prime edildi.
3- Sample master mix hazırlanarak 96'lık plate preamplifiye edilmiş cDNA örnek sayısı kadar kuyucuğa 3.85 µl samle master mix multi kanallı pipet ile pipetlendi ve üzerine 3.15 µl preamlifiye cDNA örnekleri pipetlenecek ve plate vortexlenip cDNA ve sample mastermix karışımından 5 µl Dinamik Array Chipine transfer edildi. Chipin assay kısmına da miRNA taqman proplarından 4,5 µl multikanallı pipet ile pipetlendi ve bu işlemler tamamlandıktan sonra hazırlanan Dinamik Array chipin kuyucuklarına ürünler yüklendi. Daha sonra da PCR işlemi için Chip Biomark Reader'a yüklendi.

İstatististik Analizler

Veriler Fluidigm Real-Time PCR Analiz Yazılımı yardımıyla doğrusal türev bazal düzeltme yöntemi ve küresel oto Cq eşik yöntemi kullanılarak toplanmıştır. Real time PCR'dan alınan 23'ten büyük Cq değerleri nonspesifik olarak değerlendirildi ve analizlerden çıkarıldı. Median LOD Cq değerleri eksik değerler için bütün değerler üzerinden hesaplandı. Verilerin normalizasyonu için 2 -ΔΔCT metodu kullanıldı. Farklı eksprese olan miRNA'ları belirlemek için RNA-Seq data (limma) metodu kullanıldı. Multipl test hesaplamalarının p değerlerini ayarlamak için Benjamini-Hochberg hata saptama oranı düzeltme metodu kullanıldı. Farklı eksprese olan miRNA'lara göre sinyal yolaklarını sınıflamak amacıyla DIANA-mirPath yazılımı [12] kullanıldı. miRNA'yı ve etkileşim seviyelerine göre yolak kümelerini belirlemek amacıyla deneysel yollarla doğrulanmış potansiyel hedefler ve aglomeratif hiyerarşik kümeleme algoritmasını içeren TarBase hedefleri kullanıldı. Analizler için R 3.1.2 yazılımının Rcmdr [13] ve limma [14] paketleri (URL http://www.R-project.org/.) kullanıldı. p değerlerinin %5 ten küçük olması anlamlılık sınırı olarak belirlendi.

BULGULAR

Hastalar ve Sağlıklı Kontroller

Bu çalışmada, ODPBH tanısı alan hastalar ve sağlıklı gönüllülerden elde edilen serum örneklerinden 384 miRNA'nın ekspresyonu belirlendi. Yaş ve cinsiyet dağılımı hasta ve kontrol gruplarında benzerdi ($p>0.05$) (Tablo 1). Hastalarda yaş ortalaması 44.6 ± 12.7 iken kontrol grubunda 45.4 ± 12.7 idi. 80 hastanın 47(%58)'si erkek iken, 50 kontrolün 28(%56)'i erkekti. Hasta grubun ortalama eGFR değeri olan 74.0 ± 35.4 ml/dk/1.73 m^2, kontrol

grubunun ortalama değeri olan 98.1±15.3 ml/dk/1.73 m^2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). Hipertansif ve normotansif ODPBH hastaların klinik ve biyokimyasal karakteristikleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Hastaların klinik ve biyokimyasal parametreleri (hipertansiyon ve KBY seviyeleri) hesaba katılarak miRNA ekspresyon profil analizleri yapıldı. Kullandığımız GFR sınıflamasına göre 8 hasta evre G4 (15-29 ml/dk/1.73 m^2), 15 hasta evre G3 (30-59 ml/dk/1.73 m^2), 17 hasta evre G2 (60-89 ml/dk/1.73 m^2), 30 hasta ise evre G1 (≥90 ml/dk/1.73 m^2)'di.

ODPBH'ndaki miRNA ekspresyon profilleri

ODPBH hastalarında, sağlıklı kontrollere kıyasla 18 miRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı farklanma tespit edildi. miR-3907, miR-25-3p ve miR-92a-3p upregüleyken, miR-3911, miR-4296, miR-145-5p, miR-629-3p, miR-18a-5p, miR-365a-3p, miR-224-5p, miR-4732-5p, miR-4286, miR-1587, miR-4516, miR-128-3p, miR-3689-5p ve miR-202-3p down regüle saptandı.

Hipertansiyonu olan ve olmayan ODPBH hastalarındaki miRNA ekspresyon profilleri

Hipertansif hastalarda kontrol grubuna kıyasla 15 miRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı farklanma tespit edildi. miR-3907, miR-25-3p, miR-92a-3p, ve miR-1260a upregüle iken, miR-3911, miR-4296, miR-4732-5p, miR-629-3p, miR-18a-5p, miR-365a-3p, miR-224-5p, miR-4732-5p, miR-4286, miR-1587, miR-4516, miR-128-3p, miR-27a-3p, miR-3689-5p ve miR-202-3p'nin ekspresyonunun, kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi ($p<0.001$).

Normotansif ODPBH hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında 4 miRNA'nın (miR-3907, miR-25-3p, miR-92a-3p, miR-423-5p) ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre arttığı tespit edildi.

Hipertansif hastalarla normotansif hastalar karşılaştırıldığında ise 4 upregüle miRNA'nın ekspresyonunun normotansif hastalara göre hipertansif hastalarda istatistiksel olarak anlamlı farklandığı tespit edildi (Figür 1) ($p<0.001$). Bunlardan miR-3907 upregüle bulunurken; miR-4687-5p, let-7c-5p, let-7d-3p ise downregüle bulundu. İlişkili yolaklar ve bunların haritası Figür 2 ile Figür 3'te gösterilmiştir.

KBY evrelerine göre ODPBH hastalarındaki miRNA ekspresyon profilleri

ODPBH hastaları KBY evrelerine göre 4 alt grupta sınıflandırıldı. Bu alt gruplar karşılaştırıldığında, 7 miRNA alt gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ayrıca, miR-1587, miR-3907, miR-92a-3p ve miR-3911 'Kronik Böbrek Hastalığı'nın evreleriyle korele olarak istatistiksel anlamlı dinamik değişiklik gösterdiği tespit edildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, ODPBH'de hipertansiyon ve KBY varlığını da içeren klinik gidişte miRNA'ların potansiyel rolünü araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada iki önemli bulgu vardır. Birincisi, miR-3907 ODPBH hastalarında hipertansiyonla ilişkili olabilir. İkincisi, hipertansiyonda olduğu gibi miR-3907 KBY evreleri ile ilişkilidir. Artmış miR-3907 bu hastalarda azalmış renal fonksiyonla ilişkilidir.

ODPBH, kronik böbrek hastalığının en yaygın genetik sebeplerinden biri olup tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemidir [15]. Hipertansiyon ve inflamasyon bu hastalığın progresyonuyla yakından ilişkilidir ve hipertansiyon kontrolü yavaş progresyon için tek ölçüm kriteridir [16]. Diğer yandan ODPBH hastalarının yaşam kalitesini arttırmak ve bu hastalığın yükünden kurtarmak için gelecekte bu hastalığın gidişatı ile ilgili pratik bir belirteç bulmak oldukça önemlidir [17,18]. Günümüzde ODPBH hastalarının izleminde klinik gidişatı belirlemek amacıyla kullanılabilecek pratik bir biyomarkıra ihtiyaç duyulmaktadır.

MiRBase'den elde edilen en güncel bilgilere göre, insanlarda tanımlanmış 2000'in üzerinde miRNA bulunmaktadır [19]. Bunlar böbrek gelişimi ve fizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır [20]. miRNA'lar ayrıca hipertansiyon, diyabet, böbrek disfonksiyonu gibi hastalıkları içeren birçok hastalıkla da ilişkilidir [10]. Günümüzde, araştırmacılar ODPBH'de miRNA'ların potansiyel rollerine odaklanmış durumdadır. Hayvanlardaki in vitro çalışmalarda polikistik böbrek hastalığına sahip ratlarda karaciğer dokusunda miR-15a'nın düşük bulunması bunu desteklemektedir [21]. Ayrıca, miRNA'lar hücre proliferasyonunda görev alan birçok hedef geni etkilediği gayet iyi bilinen PKD1 ve PKD2 ekspresyonlarını direkt regüle ederek polikistik hastalığın başlamasına katkıda bulunuyor olabilir. MiR-17~92 kümesi polikistik hastalıklı birçok fare modelinde böbrek dokusunda upregüledir ve bu miRNA'nın artmış ekspresyonu farede kistlerle sonuçlanmaktadır. Özellikle, miR-17 PKD1 ve PKD2'yi baskılamaktadır [22,23]. Buna ek olarak, MiR-17~92 kümesi kist gelişiminde önemli rol oynayan mammalian target of rapamycin (*mTOR*) ve *TGF-β* yolaklarının ikisini de düzenlemektedir [22]. ODPBH'lı hastalardan alınan idrar örnekleri ve primer tübül epitelyal hücre dizilerindeki miRNA profillerine bakıldığında, miR-1 ve miR-133b hastalığın ilerleyişini izlemede potansiyel biyomarkır olabilir. Bu sonuçlara göre bu konuda yapılacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir [24].

Bugüne kadar, literatürde miRNA profilleme ile ODPBH hastalarında bu hastalığın gidişatı arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma mevcut değildir.

Hipertansiyon, ODPBH populasyonunda artmış kardiyovasküler olaylar ve son dönem böbrek hastalığına hızlı ilerleyişle özellikle ilişkilidir [25]. Hipertansif hastalarda kontrol grubuna kıyasla 15 miRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlendi. Bunlardan 4 tanesi (miR-3907, miR-25-3p, miR-92a-3p, ve miR-1260a) upregüle iken; diğerleri (miR-3911, miR-4296, miR-4732-5p, miR-629-3p, miR-18a-5p, miR-365a-3p, miR-224-5p, miR-4732-5p, miR-4286, miR-1587, miR-4516, miR-128-3p, miR-27a-3p, miR-3689-5p ve miR-202-3p) down regüleydi. miR-3907,miR-4687-5p, let-7c-5p, let-7d-3p ODPBH hastalarında hipertansiyonla seyreden ve seyretmeyen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gösterdi. miR-3907, hipertansiyonla seyreden ODPBH hastalarında hipertansiyonun eşlik etmediği ODPBH hastalarına kıyasla 1.2 kat artmış bulunurken, hipertansiyonla seyreden ODPBH hastalarında kontrol grubuna kıyasla 2.7 kat yüksek bulundu. Bu sonuçlara göre bu miRNA'lar, özellikle miR-3907, ODPBH hastalarında hipertansiyonun ortaya çıkmasıyla ilişkili olabilir. Biz, bu miRNA'ların ekspresyonundaki artışın ODPBH hastalarında hipertansiyon gelişimine katkıda bulunuyor olabileceğini düşünüyoruz.

ODPBH hastaları, miRNA'lar ile hastalığın progresyonu arasındaki ilişkiyi gösterebilmek amacıyla KBY evrelerine göre de 4 alt grupta sınıflandı. Bu alt gruplar karşılaştırıldığında, 7 miRNA istatistiksel olarak anlamlı farklandığı tespit edildi ($p<0.05$). Ayrıca, miR-1587, miR-3907, miR-92a-3p ve miR-3911'nın 'Kronik Böbrek Hastalığı'nın evreleriyle korele istatistiksel olarak anlamlı dinamik değişiklikler gösterdiği tespit edildi. Hipertansiyonda olduğu gibi, miR-3907 KBY evreleriyle de ilişkili bulundu. İlginç şekilde GFR azalırken, miR-3907'nin ekspresyonu artmaktaydı.

Sonuç olarak, ODPBH klinik gidişatında hipertansiyon ve renal fonksiyon kaybının ortaya çıkmasıyla miRNA'lar ilişkili olabilir. Hastaların belli bir grubunda progresyon çok daha ciddidir ve bu durum miRNA'ların etkilerini açıklıyor olabilir. Biz, miR-3907 upregulasyonunun ODPBH patogenezinde bir rolü olduğunu ve hastalığın progresyonu ile uygulanan tedaviye cevabın izlenmesinde potansiyel bir biyomarkır olabileceğini düşünüyoruz. Bu miRNA'lar üzerine gelecekte yapılacak çalışmalar ODPBH'nın patofizyolojisini anlamada daha fazla fikir sunabilir ve yeni potansiyel tedavi seçeneklerini de beraberinde getirebilir.

REFERANSLAR

1.Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. Lancet 2007;14:1287-301.

2. Schrier RW, Brosnahan G, Cadnapaphornchai MA, Chonchol M, Friend K, Gitomer B, Rossetti S. Predictors of autosomal dominant polycystic kidney disease progression. J Am Soc Nephrol 2014;25:2399-418.

3. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB, Guay-Woodford LM, Bae KT, King BF Jr, Wetzel LH, Baumgarten DA, Kenney PJ, Harris PC, Klahr S, Bennett WM, Hirschman GN, Meyers CM, Zhang X, Zhu F, Miller JP; CRISP Investigators. Volume progression in polycystic kidney disease. N Engl J Med 2006;18:2122-30.

4. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. Kidney Int 2009;76:149-68.

5. Wing MR, Ramezani A, Gill HS, Devaney JM, Raj DS. Epigenetics of progression of chronic kidney disease: fact or fantasy? Semin Nephrol 2013;33:363-74.

6. Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, Matus IR, Liang M. MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. Genome Res 2008;18:404-11.

7.Akkina S, Becker BN. MicroRNAs in kidney function and disease. Transl Res 2011;157:236-40.

8. Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L, Sierig R, Seibler J, Reiss M, Tauber S, Bilban M, Wang S, Kain R, Bohmig GA, Moeller MJ, Grone HJ, Englert C, Martinez J, Kerjaschki D. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. Nat Med 2013;19:481-7.

9. Pandey P, Brors B, Srivastava PK, Bott A, Boehn SN, Groene HJ, Gretz N.Microarraybased approach identifies microRNAs and their target functional patterns in polycystic kidney disease. BMC Genomics 2008;9:624.

10. Pandey P, Qin S, Ho J, Zhou J, Kreidberg JA. Systems biology approach to identify transcriptome reprogramming and candidate microRNA targets during the progression of polycystic kidney disease. BMC Syst Biol 2011;25;56.

11. Gabow PA. Autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 1993;329:332-42.

12. Vlachos IS, Kostoulas N, Vergoulis T, Georgakilas G, Reczko M, Maragkakis M, Paraskevopoulou MD, Prionidis K, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA miRPath v.2.0:

investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. Nucleic Acids Res. 2012 Jul;40(Web Server issue):W498-504. doi: 10.1093/nar/gks494. Epub 2012 May 30.
13) Fox, J. Getting started with the The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. J Statistical Software 2005 **14** 1-42.
14) Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004 **3** Article 3.
15. Schrier RW, Abebe KZ, Perrone RD, Torres VE, Braun WE, Steinman TI, Winklhofer FT, Brosnahan G, Czarnecki PG, Hogan MC, Miskulin DC, Rahbari-Oskoui FF, Grantham JJ, Harris PC, Flessner MF, Bae KT, Moore CG, Chapman AB; HALT-PKD Trial Investigators. Blood pressure in early autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 2014;371:2255-66.
16. Kocyigit I, Kaya MG, Orscelik O, Kaya C, Akpek M, Zengin H, Sipahioglu MH, Unal A, Yilmaz MI, Tokgoz B, Oymak O, Axelsson J. Early arterial stiffness and inflammatory biomarkers in normotensive polycystic kidney disease patients. Am J Nephrol 2012;36:11-8.
17. Kocyigit I, Yilmaz MI, Unal A, Ozturk F, Eroglu E, Yazici C, Orscelik O, Sipahioglu MH, Tokgoz B, Oymak O. A link between the intrarenal renin angiotensin system and hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Nephrol 2013;38:218-25.
18. Wei Q, Mi QS, Dong Z. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. IUBMB Life 2013;65**:**602-14.
19. Trionfini P, Benigni A, Remuzzi G. MicroRNAs in kidney physiology and disease.Nat Rev Nephrol 2015;11:23-33.
20. Lee SO, Masyuk T, Splinter P, Banales JM, Masyuk A, Stroope A, Larusso N.MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. J Clin Invest 2008;118:3714-24.
21. Patel V, Williams D, Hajarnis S, Hunter R, Pontoglio M, Somlo S, Igarashi P.miR-17~92 miRNA cluster promotes kidney cyst growth in polycystic kidney disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;25:10765-70.
22. Sun H, Li QW, Lv XY, Ai JZ, Yang QT, Duan JJ, Bian GH, Xiao Y, Wang YD, Zhang Z, Liu YH, Tan RZ, Yang Y, Wei YQ, Zhou Q. MicroRNA-17 post-transcriptionally regulates polycystic kidney disease-2 gene and promotes cell proliferation. Mol Biol Rep 2010;37:2951-8.

23. Ben-Dov IZ, Tan YC, Morozov P, Wilson PD, Rennert H, Blumenfeld JD, Tuschl T. Urine microRNA as potential biomarkers of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: description of miRNA profiles at baseline. PLoS One 2014;29:e86856.
24. Ecder T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Nat Rev Nephrol 2009;5:221-8.
25. Myers GL, Miller WG, Coresh J, Fleming J, Greenberg N, Greene T, et al; National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group: Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. Clin Chem 2006;52:5-18.

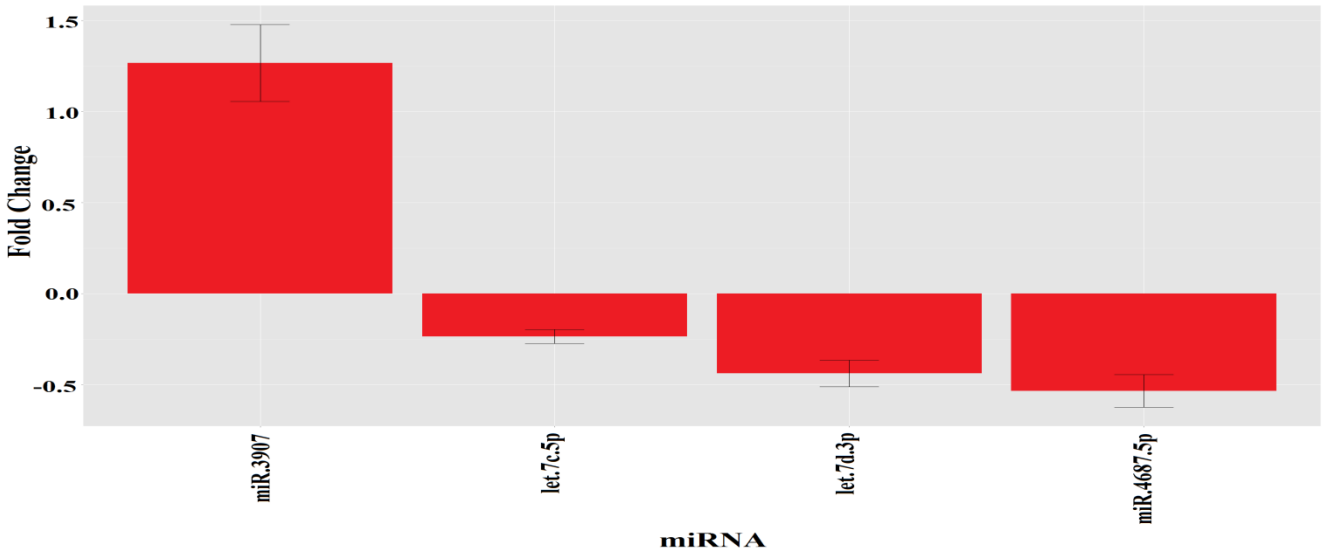
EKLER

Figür 1. Hipertansif ve normotansif ODPBH hastaları arasındaki anlamlı değişiklik gösteren miRNA'ların karşılaştırılması

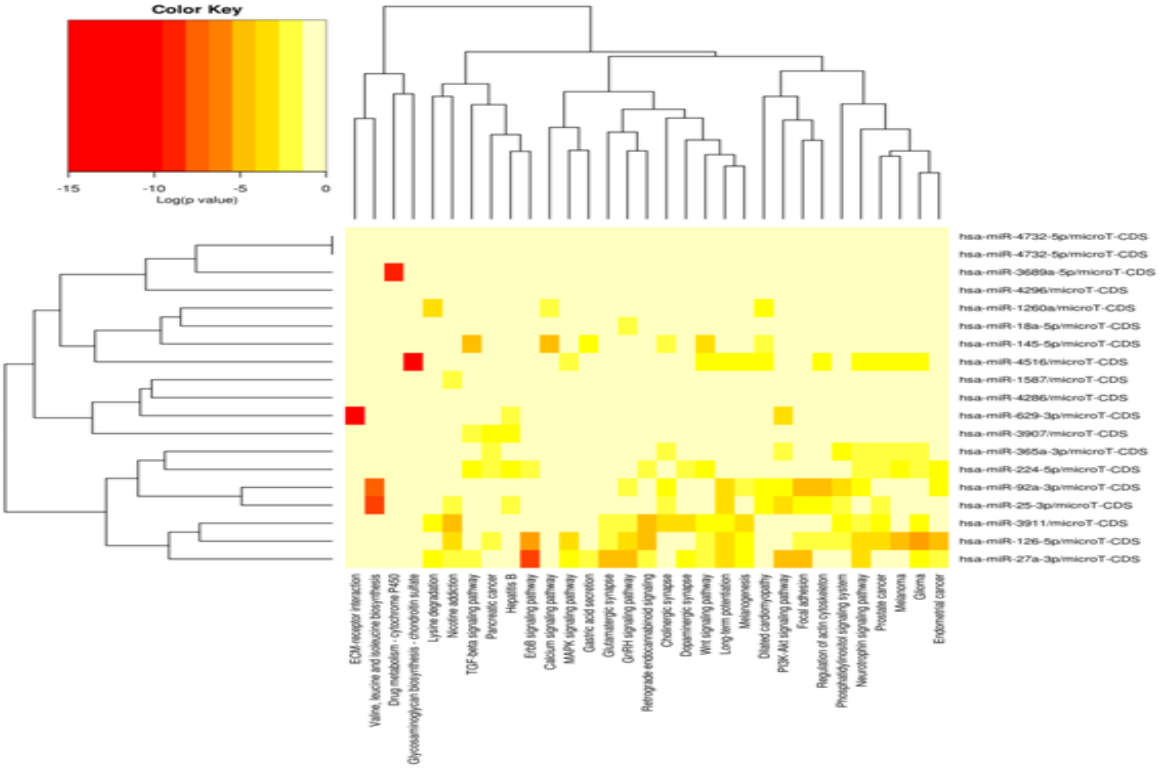
Figür 2. Hipertansiyonun ODPBH'a eşlik ettiği ve eşlik etmediği hastalarda anlamlı miRNA'ların yolak analizleri

Figür 3. ODPBH ile ilişkili anlamlı miRNA'ların ekpresyon değerlerini gösteren heatmap plot **A)** ODPBH hastalarında hipertansiyonla ilişkili anlamlı bulunan tüm miRNA'lar **B)** ODPBH hastalarında KBY evrelerine göre anlamlı bulunan tüm miRNA'lar. Küme figüründe sütunlar örnekleri ve satırlar genleri temsil etmektedir (siyah,kırmızı ve yeşil sırasıyla ekspresyonu değişmeyen, down-regüle, ve up-regüle'yi temsil etmektedir.

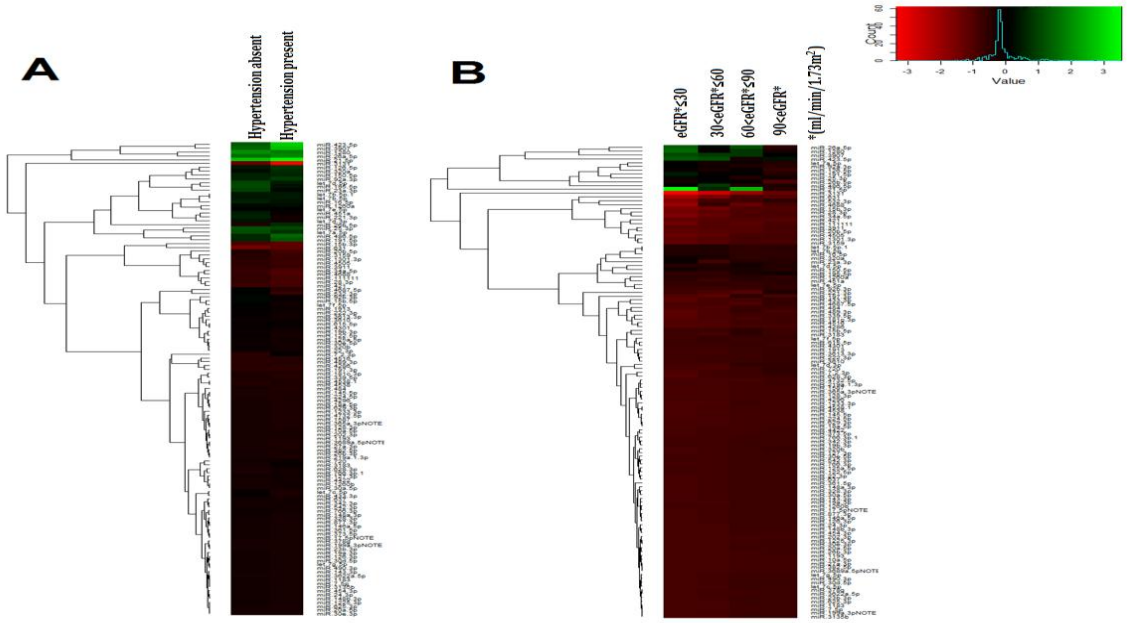
Figür 4. ODPBH hastalarında KBY evrelerine göre anlamlı değişiklik gösteren miRNA'lar



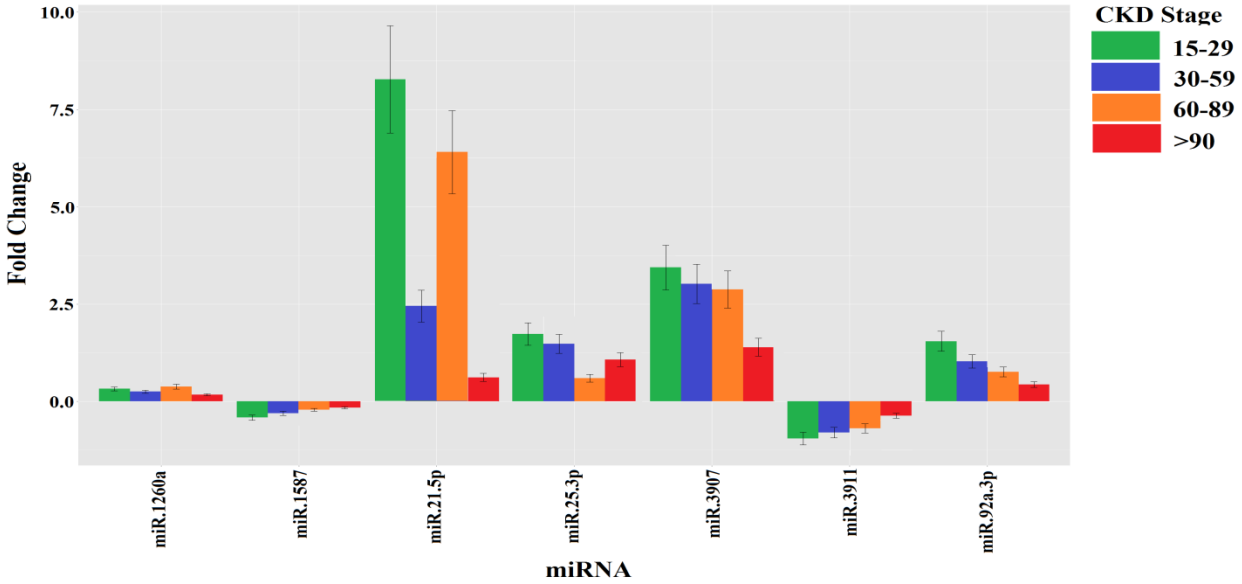
Figür 1. Hipertansif ve normotansif ODPBH hastaları arasındaki anlamlı değişiklik gösteren miRNA'ların karşılaştırılması



Figür 2. Hipertansiyonun ODPBH'a eşlik ettiği ve eşlik etmediği hastalarda anlamlı miRNA'ların yolak analizleri



Figür 3. ODPBH ile ilişkili anlamlı miRNA'ların ekpresyon değerlerini gösteren heatmap plot **A)** ODPBH hastalarında hipertansiyonla ilişkili anlamlı bulunan tüm miRNA'lar **B)** ODPBH hastalarında KBY evrelerine göre anlamlı bulunan tüm miRNA'lar. Küme figüründe sütunlar örnekleri ve satırlar genleri temsil etmektedir (siyah,kırmızı ve yeşil sırasıyla ekspresyonu değişmeyen, down-regüle, ve up-regüle'yi temsil etmektedir.



Figür 4. ODPBH hastalarında KBY evrelerine göre anlamlı değişiklik gösteren miRNA'lar