

**HAVA YOLU EPİTEL HÜCRELERİNDE ALERJEN  
PROTEAZLARIN MATRİKS PROTEAZLARIN SALIMI  
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

**THE EFFECT OF ALLERGEN PROTEASES ON MATRIX  
PROTEASES RELEASE IN AIRWAY EPITHELIAL  
CELLS**

**DİLARA KARAGÜZEL**

**DOÇ. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ Bölümü İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

**DİLARA KARAGÜZEL**'in hazırladığı “Hava Yolu Hücrelerinde Alerjen Proteazların Matriks Proteazların Salımı Üzerine Olan Etkileri” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER

Başkan

Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Danışman

Doç. Dr. Esra BİRBEN

Üye

Doç. Dr. Ebru ÇELEBİOĞLU

Üye

Prof. Dr. Ersoy CİVELEK

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak ..... /...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Aileme,

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24 / 06 / 2019



DİLARA KARAGÜZEL

## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

24 / 06 / 2019

  
DİLARA KARAGÜZEL

# ÖZET

## HAVA YOLU EPİTEL HÜCRELERİNDE ALERJEN PROTEAZLARIN MATRİKS PROTEAZLARIN SALIMI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

**Dilara KARAGÜZEL**

**Yüksek Lisans, BİYOLOJİ Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN**

**Haziran 2019, 86 sayfa**

Astım, çocuklarda daha yüksek sıklıkta olmakla birlikte tüm yaş gruplarında görülen, son yıllarda ülkemizde de görülme sıklığı artmış olan önemli bir solunum yolu hastalığıdır. Astımı tetikleyen çevresel etkenlerin başında alerjenler gelmektedir. Alerjenlerin proteaz özellikte olanları 6 ana gruba (serin, sistein, treonin, aspartat, glutamat ve metalloproteaz) ayrılırken, proteaz özellikte olmayanları da mevcuttur.

Alerjenlerin epitel hücre bariyerindeki reseptörler aracılığı ile veya meydana gelen hasar sonucu epitel bariyeri geçip vücuda girmesiyle başlayan inflamasyon durumu, epitel hücre hiperplazisi, epitel altı fibrosizi ve düz kas hücre hiperplazisi gibi çeşitli mekanizmaları aktifleştirerek hava yolu yeniden yapılanmasına (airway remodeling) neden olmaktadır.

Hava yolu yeniden yapılanmasında, epitel hücre, fibroblast ve düz kas hücresinde görülen değişikliklerin yansira ekstraselüler matriksin içeriğinde ve yapısında da bozulmalar meydana gelir. Bu bozulmalar kolajen, fibronektin, laminin ve agrekan gibi moleküllerin

yıkımı ile gerçekleşir. Hava yolu yeniden yapılanmasında bu moleküllerin kesiminde rol alan proteaz grubu matriks metalloproteazlardır.

Çinko ile aktifleşen endopeptidazlar olan matriks metalloproteazlar (MMP'ler), ekstraselüler matriks elemanlarının üzerindeki parçalama etkilerinin yanında sitokin ve büyüme faktörleri gibi hücrel aktiviteyi düzenleyen moleküller üzerinde de etkilidir. Bu nedenle epitel hücre, fibroblast ve düz kas hücresi gibi farklı hücrelerde gerçekleşen metabolik olaylarda görev almaktadırlar. Günümüze kadar tanımlanan 28 matriks metalloproteaz arasından jelatin molekülünü kesen MMP-2 ve MMP-9'un ve kolajen molekülünü kesen MMP-12'nin astımda önemli rol oynadığı kanıtlanmıştır. MMP'lerin kaynak hücreler tarafından yeterli düzeyde ifade olmaması veya molekülleri parçalayarak gerçekleştirdikleri proteaz etkinliklerini tam olarak yerine getirememesi, ekstraselüler matriks üretimi ve akciğer fibrillerinin parçalanması arasındaki dengenin bozulmasına ve akciğerde yapısal bozulmaların görülmesine neden olur. Literatürde bronş epitel hücreleri ve MMP-9 ilişkisini gösteren yayınlar bulunmakla birlikte alerjen ile karşılaşma sonrası hava yolu epitel hücrelerinden salınan MMP-2 ve MMP-12 ile ilgili bilgiler son derece yetersizdir.

Bu tez çalışmasında BEAS-2B bronş epitel hücreleri, *Dermatophagoides pteronyssinus* kaynaklı sistein proteaz özellikteki Der p 1, serin proteaz özellikteki Der p 6 ve proteaz özellikte olmayan Der p 2 alerjenleri ile ayrı ayrı uyarılmış ve uyarılma sonucu değişen MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 seviyelerinde meydana gelen ifade farklılıkları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak RNA düzeyinde ve ELISA yöntemi kullanılarak protein düzeyinde araştırılmıştır.

Sistein proteaz olan Der p 1'in, proteaz özellikte olmayan Der p 2'ninve serin proteaz özellikteki Der p 6'nın bronş epitel hücrelerine 24 saat uyarımı sonucunda MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 gen ifadesini etkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca ısı ile denatürasyona uğrayan alerjenlerin de MMP genleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Der p 1 ve Der p 2 alerjenlerinin 24 saat uyarımı sonrasında hücre dışına salınan MMP-9 protein miktarını konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı ancak Der p 6 alerjeninin düşürdüğü görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda bronş epitel hücrelerin maruz kaldığı

alerjenlerin, proteaz aktiviteleri ve/veya epitel hücre reseptör etkileşimleri vasıtasıyla MMPlerin salımı üzerine etkili olarak hava yolu yeniden yapılanmasında rol oynadıkları sonucunu çıkarmak mümkündür.

**Anahtar Kelimeler:** Alerjen proteaz, alerji, astım, bronş epitel hücresi, matriks metalloproteaz (MMP)



## **ABSTRACT**

### **THE EFFECT OF ALLERGEN PROTEASES ON MATRIX PROTEASES RELEASE IN AIRWAY EPITHELIAL CELLS**

**Dilara KARAGÜZEL**

**Master of Science, Department of MOLECULAR BIOLOGY**

**Supervisor: Assos. Prof. İbrahim Çağatay KARASLAN**

**June 2019, 86 pages**

Asthma is an important respiratory disease that has a higher incidence in children and has increased in recent years in our country. Allergens are the main environmental factors which trigger asthma. While allergens with protease activity are categorized to 6 main groups (serine, cysteine, threonine, aspartate, glutamate, and metalloprotease), there also allergens with no proteolytic activity.

Inflammation, which begins when allergens enter the body through the receptors on epithelial cells or disrupted epithelial barrier, leads to airway remodelling by activating various mechanisms such as epithelial cell hyperplasia, sub-epithelial fibrosis and smooth muscle cell hyperplasia.

In airway remodeling, in addition to changes is epithelial cell, fibroblast and smooth muscle cell, there are also deteriorations in the content and structure of extracellular

matrix. These deteriorations occur by degradation of molecules such as collagen, fibronectin, laminin, and aggrecan. The protease group responsible for the cleavage of these molecules in airway remodeling is matrix metalloproteases.

Matrix metalloproteases (MMPs), zinc-activated endopeptidases, are effective on molecules that regulate cellular activity such as cytokines and growth factors, as well as exerting destructive effects on extracellular matrix components. Thus, they participate in metabolic events taking place in different cells such as epithelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells. Of the 28 matrix metalloproteases identified to date, MMP-2 and MMP-9, which breaks the gelatin molecule, and MMP-12, which breaks the collagen molecule, have been shown to play an important role in asthma. Inadequate expression of MMPs by the source cells or failure to fully perform protease activity by degrading molecules leads to disruption of the balance between extracellular matrix production and lung fibrillation breakdown and eventually causes structural disruption in the lung. Although there are publications in the literature indicating the association between bronchial epithelial cells and MMP-9, information on MMP-2 and MMP-12 released by airway epithelial cells in response to allergen exposure is extremely inadequate.

In this study, BEAS-2B bronchial epithelial cells were stimulated separately with cysteine protease allergen Der p 1, serine protease allergen Der p 6, and Der p 2 allergen with no protease activity, allergens derived from *Dermatophagoides pteronyssinus*. Changes in expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-12 levels occurring after allergen stimulation were investigated at RNA level by using PCR and at protein level by using ELISA method.

It has been established that cysteine protease Der p 1 is effective on MMP-2 and MMP-9 gene expression, while non-proteolytic Der p 2 have an impact on MMP-2, only. Also, Der p 6 has been shown to be effective on MMP-2, MMP-9, and MMP-12 after 24 hour allergen exposure. Besides, heat inactivated allergens are also shown to be effective on MMP genes. Amount of MMP-9 protein released from cells are shown to be increased after both Der p 1 and Der p 2 stimulation, whereas stimulation with Der p 6 decreased release of MMP-9. According to these results, it can be concluded that allergens exposed

to bronchial cells play a role in airway remodeling by affecting MMP release through their protease activities and/or epithelial cell receptor interactions.

**Keywords:** Allergen protease, allergy, asthma, bronchial epithelial cell, matrix metalloproteases (MMP)

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren bana yol gösteren, daha iyisini yapmam için beni cesaretlendiren ve destekleyen, her zaman örnek alacağım tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a,

Sahip olduğu deneysel bilgilerini bana anlatan, öğreten ve bunu her zaman büyük bir sabırla yapan, yüksek lisans boyunca desteğini her zaman hissettiğim sayın Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e

Hiçbir zaman yardım etmekten çekinmeyen, gece gündüz ne zaman arasam yanıma gelmeye üşenmeyen ve en zor durumlarda bile bir an olsun yanımdan ayrılmayan değerli arkadaşım Arş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ'a,

Çalışmalarım sırasında ne zaman zorda olsam yardım eden, yüksek lisans hayatımın bana kazandırdığı değerli arkadaşlarım Gülsen BAYRAK ve Selcan GENÇ'e,

Her zaman yardıma hazır olan ve desteklerini esirgemeyen ECRG Laboratuvar arkadaşlarıma,

Üniversite hayatımda iyi ki tanışmışım dediğim, her zaman güler yüzüyle beni karşılayan, dinleyen ve saatler boyunca bıkmak bilmeden konuştuğum oda arkadaşım Ege ŞENOL'a,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda tereddüt etmeden beni destekleyen, birçok sıkıntıya rağmen benim bugün geldiğim noktada olmamı sağlayan, katkılarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim çok sevgili annem Sema KARAGÜZEL'e, babam Murat KARAGÜZEL'e ve ağabeyim Taner KARAGÜZEL'e,

Sonsuz teşekkürler...

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Astım .....	4
2.2. Astımın Dünyada ve Türkiye’de Görülme Sıklığı .....	4
2.3. Astım Türleri ve Patogenezi.....	6
2.3.1. T2-Yüksek Endotip .....	7
2.3.1.1. Erken Dönem Alerjik Astım.....	8
2.3.1.2. Geç Dönem Alerjik Astım.....	8
2.3.2. T2-Düşük Endotip .....	8
2.3.2.1. Nötrofilik Astım .....	9
2.3.2.2. Obezite İlişkili Astım .....	10
2.4. Astım ve IgE.....	10
2.5. Astım ve Havayolu Epitelinin İlişkisi .....	11
2.6. Astım ve HDM.....	14
2.7. Proteazlar.....	16
2.7.1. Sistein Proteazlar .....	16
2.7.2. Serin Proteazlar .....	17
2.7.3. Treonin Proteazlar .....	18
2.7.4. Aspartik Proteazlar .....	19
2.7.5. Glutamik Proteazlar.....	20
2.7.6 Metalloproteazlar.....	20
2.8 Matriks Metalloproteazlar .....	21

2.8.1. Matriks Metalloproteazların Görevleri .....	22
2.8.2. Matriks Metalloproteazların Gruplandırılması .....	24
2.8.2.1. Arketipik MMP'ler .....	27
2.8.2.2. Matrilisinler.....	28
2.8.2.3. Jelatinazlar .....	29
2.8.2.4. Furin-Bağlı MMP'ler .....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	33
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler .....	33
3.2. Hücre Kültürü Deneyleri .....	34
3.2.1. BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması.....	34
3.2.2. Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri.....	34
3.2.3. Bronş Epitel Hücrelerin Air-Liquid Interface (ALI) Yöntemi ile Farklılaştırılması .....	35
3.2.4. Transepitelyal Elektriksel Rezistans (TEER) Ölçümü.....	36
3.2.5. BEAS-2B Hücrelerinin Alerjenler ile Uyarılması ve Koşulların Belirlenmesi .....	36
3.3. RNA İzolasyonu .....	37
3.4. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi.....	38
3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	38
3.6. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi.....	39
3.7. İstatistiksel Analiz.....	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	42
4.1. Bronş Epitel Hücrelerinde Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 Alerjeni ile Uyarımın Hücre Canlılığına ve Sitotoksositeye Etkisi .....	42
4.1.1. Alerjen uyarımı sonrasında Canlı ve Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskobu ile Görüntülenmesi .....	42
4.1.2. Alerjen ile Uyarılan Hücrelerin Sitotoksosite Değerlerinin Ölçülmesi .....	47
4.2. Alerjen ile Uyarılan Bronş Epitel Hücrelerin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Analizi.....	50
4.2.1. Der p 1 Sistein Proteaz Alerjeninin MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi .....	51

4.2.2. Der p 2 Proteaz-Olmayan Alerjenin MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi.....	53
4.2.3. Der p 6 Serin Proteaz Alerjenin MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi.....	56
4.3. Alerjen ile Uyarılan Bronş Epitel Hücrelerin ELISA Sonuçları .....	58
5. YORUM.....	64
6. KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ .....	86

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Alerjenin epitel hücreye teması sonrası kadınlarda daha fazla sayıda görülen hücrelerin ve ifadesi artan sitokin, kemokin ve mediatörlerin gösterimi (K:Kadın, E:Erkek).....	5
<b>Şekil 2.2.</b>	Dünyada 13 - 14 yaşındaki çocuklarda görülen astım prevalansı.....	6
<b>Şekil 2.3.</b>	Alerjenin epitel bariyerle karşılaşma sonrasında astım patogenezi oluşturan basamakların ilerleyişi .....	7
<b>Şekil 2.4.</b>	T2-düşük astım mekanizması.....	9
<b>Şekil 2.5.</b>	Epitel hücreler arasındaki bağlantılar ve alerjen geçişi.....	13
<b>Şekil 2.6.</b>	İnflamasyon durumunda MMP'ler.....	23
<b>Şekil 3.1.</b>	ALI-kültür yöntemi ile hücrelerin farklılaştırılması.....	35
<b>Şekil 3.2.</b>	Millicell ERS-2 TER ölçüm cihazı ve ölçüm yöntemi.....	36
<b>Şekil 3.3.</b>	Deney koşullarının gösterilmesi; U: Uyarılmamış koşul .....	37
<b>Şekil 4.1.</b>	Der p 1 alerjeni ile uyarılmamış koşulda (A) ve 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C) ve 10 µg/mL (D) konsantrasyonda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil) /ölü (kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 100 µm .....	43
<b>Şekil 4.2.</b>	Bronş epitel hücrelerinin Der p 2 ile uyarılmamış (A), 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C), 10 µg/mL (D), 20 µg/mL (E) ve 40 µg/mL (F) konsantrasyonda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 100 µm .....	45
<b>Şekil 4.3.</b>	Bronş epitel hücrelerinin Der p 6 ile uyarılmamış (A), 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C), 10 µg/mL (D), 20 µg/mL (E) ve 40 µg/mL (F) konsantrasyonda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil) /ölü (kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 100 µm .....	47
<b>Şekil 4.4.</b>	Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyondaki Der p 1 alerjeni ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; * p<0.05 .....	48
<b>Şekil 4.5.</b>	Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki Der p 2 alerjeni ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; * p<0,05 .....	49
<b>Şekil 4.6.</b>	Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyondaki Der p 6 alerjeni ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; * p<0,05; .....	50
<b>Şekil 4.7.</b>	Bronş epitel hücrelerinin 24 saat 2 ve 10 µg/mL Der p 1 ile uyarımı sonrasında MMP-2 (A), MMP-9 (B) ve MMP-12 (C) genlerinin ifadeleri; I: Isı ile denatüre edilmiş; n=3; *p<0,05; **p<0,01 .....	52



<b>Şekil 4.8.</b> Bronş epitel hücrelerinin 24 saat 2 ve 10 µg/mL Der p 2 ile uyarımı sonrasında MMP-2 (A), MMP-9 (B) ve MMP-12 (C) genlerinin ifadeleri; I: Isı ile denatüre edilmiş; n=3; *p<0,05, ***p<0,001 .....	55
<b>Şekil 4.9.</b> Bronş epitel hücrelerinin 24 saat 2 ve 10 µg/mL Der p 6 ile uyarımı sonrasında MMP-2 (A), MMP-9 (B) ve MMP-12 (C) genlerinin ifadeleri; I: Isı ile denatüre edilmiş; n=3; *p<0,05; **p<0,01 .....	57
<b>Şekil 4.10.</b> MMP-2 proteininin ELISA deneyi için elde edilen standart grafiği .....	59
<b>Şekil 4.11.</b> MMP-9 proteininin ELISA deneyi için elde edilen standart grafiği .....	59
<b>Şekil 4.12.</b> Der p 1 (A), Der p 2 (B) ve Der p 6 (C) ile uyarılan hücrelerde MMP-9 proteininin değerleri; I: Isı ile uyarılmış; n=3; *p<0,05 .....	61
<b>Şekil 4.13.</b> MMP-12 proteininin ELISA deneyi için elde edilen standart grafiği .....	63

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> HDM alerjenlerinin gruplandırılması.....	15
<b>Çizelge 2.2.</b> Sahip oldukları bölgelere ve substratlarına göre MMP'lerin gruplandırılması.....	25
<b>Çizelge 3.1.</b> PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilen primer dizileri.....	39
<b>Çizelge 3.2.</b> Gerçek zamanlı PZR reaksiyon ve döngü koşulları; * : Aşama, 35 döngüde tamamlanmıştır .....	39

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
Ex/Em	Uyarma/emisyon
mg	Miligram
mL	Mililitre
pH	Hidrojen gücü
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Derece santigrat
U	Ünite

### Kısaltmalar

ADAM	Disintegrin ve metalloproteazlar
Aed a	<i>Aedes aegypti</i> alerjisi
AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu
Asp f	<i>Aspergillus fumigatus</i> alerjisi
BAL	Bronkoalveolar lavaj
BEAS-2B	İnsan bronş epitel hücreleri
Bet v	<i>Betula verrucosa</i> alerjisi

Bla g	<i>Blatella germanica</i> alerjenu
Blo t	<i>Blomia tropicalis</i> alerjenu
CD	Farklılaşma kümesi
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
cDNA	Komplementer DNA
CLR	C-tip lektin reseptörü
DAMP	Hasar ilişkili moleküler kalıp
Der f	<i>Dermatophagoides farinae</i> alerjenu
Der m	<i>Dermatophagoides microceras</i> alerjenu
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> alerjenu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EGF	Epitelyal büyüme faktörü
ESM	Ekstraselüler matriks
Eur m	<i>Euroglyphus maynei</i> alerjenu
FeNO	Ekshale nitrik oksit
FEV	Zorlu ekspiryumun 1.saniyesinde çıkarılan hava hacmi
For t	<i>Forcipomyia taiwana</i> alerjenu
GCP-2	Granülosit uyarıcı protein-2
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GINA	Astım için Küresel Girişim
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
HDM	Ev tozu akarı
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
IFN- $\gamma$	İnterferon-gama
IgE	İmmünoglobulin E

IL	İnterlökin
ILC2	Grup 2 innate lenfoid hücreler
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
Lep d	<i>Lepidoglyphus destructor</i> alerjisi
Log	Logaritma
Lol p	<i>Lolium perenne</i> alerjisi
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
MCP-1	Monosit kemotaktik protein 1
MEROPS	Proteaz, substrat ve proteaz inhibitörlerinin databazı
MIP-2	Makrofaj İnflamatuar proteini-2
MMP	Matriks metalloproteazlar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NHBE	Normal insan bronş epitel hücresi
NLR	Nod-benzeri reseptörler
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıplar
PAR	Proteazla aktive olan reseptörler
PBS	Fosfat tamponlu salin
Per a	<i>Periplaneta americana</i> alerjisi
PRR	Kalıp tanıma reseptörü
PSME3	Proteazom aktivatör alt birimi 3
RLR	Rig-benzeri reseptör
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
RT-PCR	Geri transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SCCA	Skvamoz hücre karsinoma antijeni
sICAM-1	Çözünebilir hücre içi adhezyon molekülü - 1
TGF- $\beta$	Transforme edici büyüme faktörü - $\beta$
Th	Yardımcı T hücre
TIMP	Doku İnhibitörü Metalloproteinaz
TLR	Toll-benzeri reseptör
TSLP	Timik stromal lenfopoietin
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Zea m	<i>Zea mays</i> alerjisi



# 1. GİRİŞ

Astım, solunum yolu inflamasyonu ve bronşiyal hiperreaktivite sonucunda akciğerde görülen patofizyolojik değişikliklerle tanımlanan kronik bir hastalıktır. Hastalığa bağlı olarak görülen inflamasyon durumunda birçok hücre ve mediatör yer alır. Havayollarının inflamasyonu, akciğerde doku hasarına yol açarak hava akımı kısıtlanması, havayolu aşırı duyarlılığı ve kalıcı yapısal değişiklikleri kapsayan havayolu yeniden yapılanmasının (airway remodeling) ortaya çıkmasına neden olur. Buna bağlı olarak da astımlı kişilerde öksürük nöbetleri, hırıltı, nefes darlığı, göğüs sıkışması, acı veya baskı gibi semptomlar görülür.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) güncel verilerine göre dünyada astımdan etkilenen kişi sayısı 330 milyondan fazladır. Dünya genelinde astımla ilgili yapılan çalışmalarda çocuklarda görülen astım sıklığı (%9,4) yetişkinlere göre (%7,7) daha fazladır. Türkiye’de ise yetişkin ve çocuklar üzerine yapılan çalışmalar yaklaşık 4 milyon kişinin bu hastalıktan etkilendiği göstermektedir. Türkiye’de astım görülme sıklığı erişkinlerde %4,0 -4,8 iken bu oran çocuklarda %2,8-9,8 olarak görülmektedir.

Alerjenlerin, egzersizin, iklim faktörlerinin, sigara dumanının, hava kirliliğinin, psikolojik faktörlerin ve çeşitli kimyasal maddelerin astım semptomlarının ortaya çıkmasında etkili olduğu literatürde gösterilmiştir. Semptomların ortaya çıkışı, solunan alerjenlerin akciğerdeki epitel hücrelere temas etmesi ile başlar. Alerjenin epitel hücreler tarafından ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından tanınması, cevap mekanizmasını oluşturacak mediatörlerin salınımını tetikler. Oluşturulan cevap, bireyde astım semptomlarının görülmesinde etkili olur.

Ev tozu akarı [House dust mite (HDM)] kaynaklı alerjenler, günlük yaşamda en çok maruz kalınan aeroalerjen tipidir. Atopik dermatit, alerjik rinit ve astım gibi alerjen kaynaklı rahatsızlıkların en temel kaynağıdır. En çok bilinen HDM türü *Dermatophagoides pteronyssinus* olup bugüne kadar 31 farklı alerjen grubu tanımlanmıştır. Bu alerjenlerin çoğu proteaz özelliğine sahip iken proteolitik etkiye sahip olmayan grupları da mevcuttur.



Proteazlar (peptidazlar ya da proteinazlar) peptit bağlarını hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir. Proteaz ailesinin üyeleri, birbirlerinden farklı katabolik mekanizmalara sahiptirler. Proteaz özellikteki alerjenlerin epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantıları bozarak bu hücrelerin bariyer fonksiyonlarını azalttığı bulunmuştur. Proteazlar, aktive eden molekül ve sahip oldukları aminoasitlere göre gruplandırılmışlardır. Sistein proteaz grubundan olan HDM kaynaklı Der p 1, epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantıları bozarak geçirgenliğini artırırken IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin salınımındaki artışta da etkilidir. Serin proteaz özellikteki Der p 6 ise PAR2 reseptörünü etkileyerek farklı moleküler basamakların aktivasyonunu sağlar. Proteaz aktiviteleri olmayan Der p 2 gibi HDM kaynaklı alerjenlerin de epitel hücreden granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), IL-6, IL-8, monosit kemotaktik protein 1(MCP-1) ve intraselüler adhezyon molekülü olan sICAM-1 salımında etkili oldukları belirlenmiştir.

Metalloproteaz grubundan olan matriks metalloproteazlar (MMP) 28 üyeden oluşan ve esas görevi ekstraselüler matriksi parçalamak olan endopeptidazlardır. Zimojen adı verilen inaktif formda üretilen bu proteazlar, katalitik bölgesine bağlanan bir çinko iyonu ile aktifleşir. Yapı ve substrat özelliklerine göre arketipik (MMP-1, -3, -8, -10, -12, -13, -18), jelatinazlar (MMP-2, -9), matrilisin (MMP-7, -26) ve furin-bağlı MMP'ler (MMP-14, -15, -16, -17, -23, -24, -25) olmak üzere 4'e ayrılmıştır. Bu proteaz ailesi, insan vücudunun pek çok bölgesinde görev alır ve çeşitli hastalıklarda rol oynarlar.

Geniş parçalama yetenekleri nedeniyle MMP'ler, hücreden çok düşük miktarda üretilip salınır ve aktiviteleri pozitif veya negatif olacak şekilde hem transkripsiyon sırasında hem de sonrasında kontrol edilir. Başta ekstraselüler matriks parçalanması olmak üzere inflamasyona, damar oluşumuna ve havayolu yeniden yapılanmasına katkıda bulunurlar. Alerjik astım durumunda vücuttaki MMP'lerin sayısının artması hava yolu tamir mekanizmasının işlevsizliğine ve alerjene verilen cevabın yetersiz kalmasına neden olur. Ortamda bulunan IL-17, IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$  ve TGF- $\beta$  gibi sitokinlerin yoğunluğu, MMP ifadesini etkiler.

MMP'ler makrofaj, eozinofil, nötrofil ve T hücre gibi inflamatuvar hücreler ile fibroblast, epitel hücre ve solunum yolu düz kas hücreleri gibi yapısal hücreler tarafından sentezlenir. MMP-2 ve MMP-9 çeşitli hücreler tarafından ifade olur ancak MMP-12'nin ifadesi makrofaj ve epitel hücreler ile sınırlıdır. Astımlı bireylerde MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 ile bu proteazların inhibitörü olan TIMP-1 arasındaki dengenin bozulması

sonucunda hava yolu yeniden yapılanması görülür. Bu durum, fibroz amfizem, trakeobronkomalazi gibi rahatsızlıkların görülmesine neden olur.

Sonuç olarak, literatürde epitel hücreden salgılanan MMP'ler ve astım mekanizmasındaki rolleri ile ilgili bilgiler son derece kısıtlıdır. Hava yolu epitel hücrelerinin alerjen proteazlarla karşılaşma sonucunda, MMP'lerin salgıdaki değişikliğin alerjenin proteaz özelliğine bağlı olup olmadığının bulunması, özellikle epitel hücre harabiyeti ve hava yolu yeniden yapılanmasının görüldüğü astım hastalığı için yeni tedavi yaklaşımları yönüyle son derece değerlidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

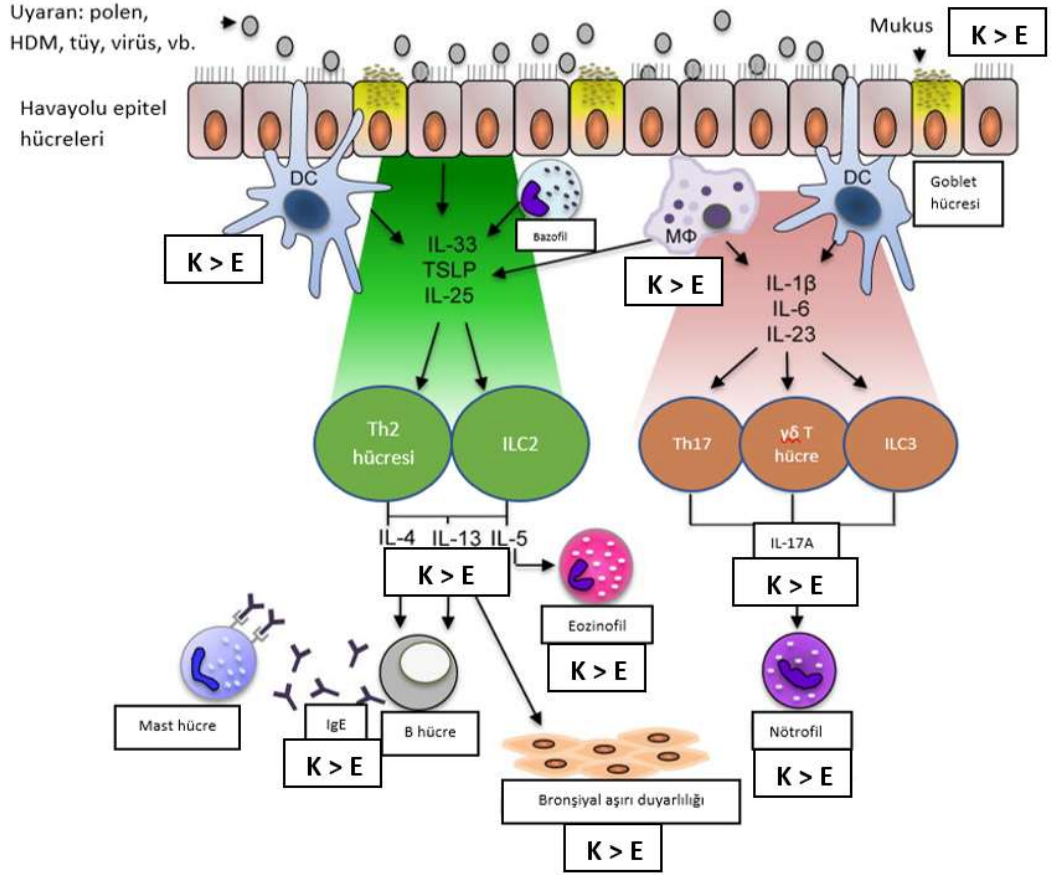
### 2.1. Astım

Astım, ilk kez 19. yüzyılın başlarında tanımlanan ve günümüzde yaklaşık 330 milyondan fazla kişide görülen en önemli akciğer hastalıklarından biridir [1]. Hava yollarında görülen kronik inflamatuvar hastalık olarak da tanımlanan astımda, çevreden gelen alerjenlere (polen, hayvan tüyleri, virüs vb.) karşı hava yollarındaki aşırı duyarlılık sonucu hırıltı, nefes alamama, göğüste sıkışma ya da öksürük gibi semptomların biri ya da birçoğu görülür [2].

Astımda oluşturulan inflamatuvar cevabın ilk adımı epitel hücreler tarafından gerçekleştirilir. Alerjenler, enfeksiyon, sitokinler ve kemokinler tarafından uyarılan epitel hücrelerinden sonra immün sistem hücreleri olan T hücreleri, mast hücreler, makrofajlar, eozinofiller ve nötrofiller de inflamatuvar cevap oluşturulmasına dahil olurlar. Oluşturulan cevap sonucunda hava yolu bazal membranında kalınlaşma, kolajen birikimi ve düz kas hücrelerinin hipertrofisi/hiperplazisi görülebilir [3].

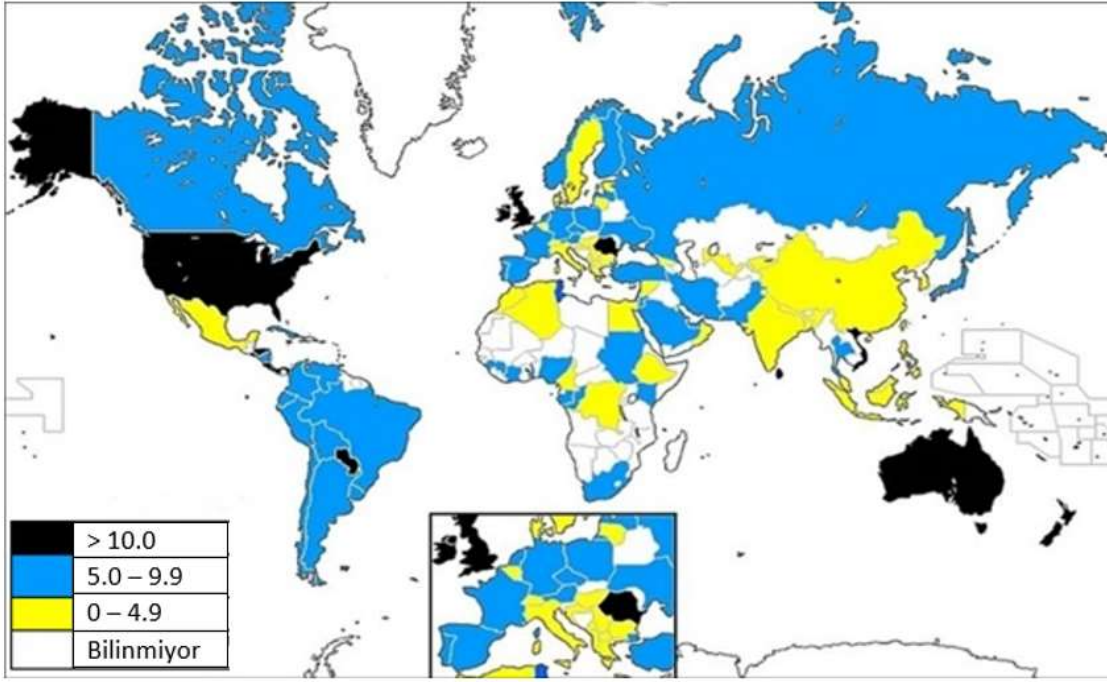
### 2.2. Astımın Dünyada ve Türkiye’de Görülme Sıklığı

Astım görülme sıklığı son 50 yıl içerisinde artmış ve mekanizması günümüze kadar tam olarak açıklanamamıştır. Bunun nedeni astımın belirli bir yaş, cinsiyet, ırk ve etnik köken gözetmeksizin her bireyde farklı şiddette kendini göstermesidir [2]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)]’nin verilerine göre dünyada her 13 kişiden 1’inde astım semptomları görülmektedir. Sadece Amerika’da 7 milyonu çocuk olmak üzere 25 milyon kişide bu hastalığa rastlanmaktadır. Astımın görülme sıklığı erkeklerde %6,5 iken, kadınlarda bu oran %9,1’dir. Bu durum hormonlara, stres koşullarına ve farklı inflamatuvar cevaba bağlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) [4, 5].



Şekil 2.1. Alerjenin epitel hücreye teması sonrası kadınlarda daha fazla sayıda görülen hücrelerin ve ifadesi artan sitokin, kemokin ve mediatörlerin gösterimi (K:Kadın, E:Erkek) [6]

GINA 2018 raporuna göre 13 ve 14 yaşındaki çocuklarda astım prevalansının dünyada en yüksek görüldüğü bölgelerin başında Amerika, Avusturalya ve İngiltere gibi ekonomik açıdan gelişmiş ülkeler gelmektedir. Bu ülkeleri Rusya, Kanada ve Avrupa ülkelerinin çoğu takip etmektedir [7]. Gelişmiş ülkelerde şehirleşmeye bağlı olarak yaşam tarzının ve beslenme alışkanlıklarının değişmesi, çocukların daha az alerjenle karşılaşmalarına neden olur. Bu nedenle karşılaşılan farklı alerjenler, inflamatuvar yanıtı tetikler ve çocuklarda alerjiye bağlı astım durumu görülür (Şekil 2.2) [8, 9].



Şekil 2.2. Dünyada 13-14 yaşındaki çocuklarda görülen astım prevalansı [7]

Türkiye’de 4 milyona yakın bireyde astım bulgularına rastlandığı rapor edilmiştir. Epidemiyolojik çalışma sonuçları ülkemizde çocukluk çağında astımın görülme oranının %2,8-9,8, erişkinlerde ise %4,0-4,8 olduğunu göstermektedir [10]. Sağlık Bakanlığı’nın 2017 yılı verilerine göre büyük şehirlerde ve sahil kesimlerinde astım prevalansı daha yüksektir [11].

### 2.3. Astım Türleri ve Patogenezi

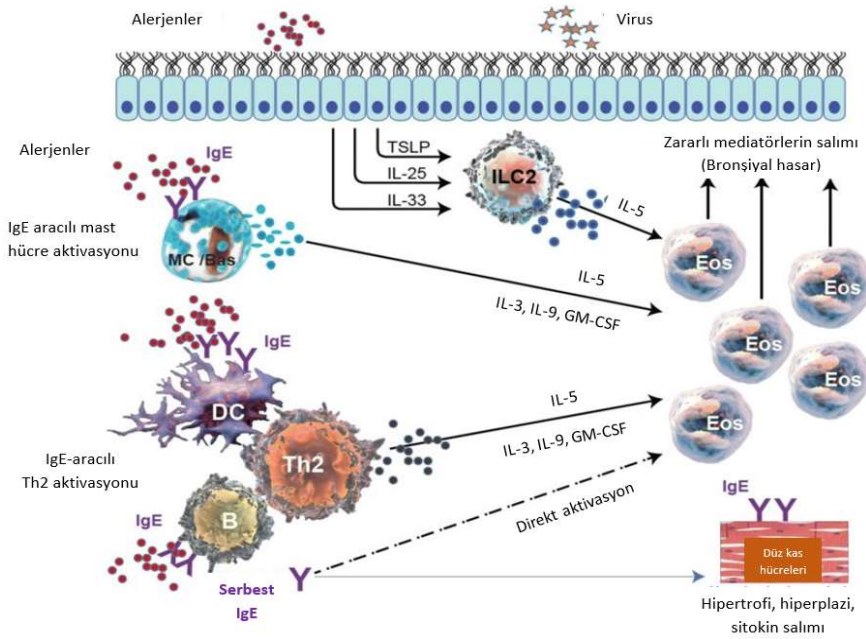
Astımın, patolojik ve fizyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında çevresel etkenler ve hastanın astıma genetik olarak yatkınlığı etkilidir. Çevresel etken olarak aeroalerjenler, gıda kaynaklı alerjenler, mikroorganizma kaynaklı alerjenler, hava kirliliği ve sigara dumanı gibi etkenler gösterilmektedir [12]. Hastanın genetik yatkınlığına, alerjenlere karşı ürettiği yanıtı, çevresel etkenlere maruz kalma süresine ve yoğunluğuna göre astımın şiddeti değişmekte ve kronik hava yolu inflamasyonu ile sonuçlanan basamakların aktivasyonu görülmektedir [13].

Astımın atopik ve non-atopik ayrımı dışında hastalığın sıklığı, görülme yaşı ve semptomları gibi koşullar göz önüne alındığında birçok fenotip belirlenmiştir [14, 15]. Yeni tanımlanan fenotipler ise hastaların kanlarında veya bronkoalveolar sıvılarında

(BAL) bulunan T hücrelerinin farklılaşmalarına göre “T2-yüksek” ve “T2-düşük” olmak üzere iki endotip altında toplanmıştır [16, 17].

### 2.3.1. T2-Yüksek Endotip

Havayolu Tip 2 immün cevapta bazofil, eozinofil, mast hücre, Tip 2 yardımcı T hücre (Th2), grup 2 doğal bağışıklık hücreleri-2 (ILC2) ve IgE üretiminde etkili olan B hücreler görülür [18]. Alerjenin epitel hücreye teması sonrasında alarmin olarak da adlandırılan timik stromal lenfopoyetin (TSLP), IL-25 ve IL-33 sitokinleri salgınır. Çevresel etkenlerin epitel hücre ile teması ve hücrede oluşturdukları hasar sonucu salgınan bu sitokinlerden IL-33 ve IL-25, ILC’leri aktive ederken, TSLP salgını ise dendritik hücrelerin alerjeni tanınması için öncül molekül olarak görev alır [19, 20]. Dendritik hücreler, alerjeni farklılaşmamış CD4<sup>+</sup> T hücrelere sunar ve tip 2 yardımcı T hücre farklılaşması görülür. Th2 ve ILC üzerinden ilerleyen aktivasyon yollarında IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerinin salgınında görülen artış, eozinofilik havayolu inflamasyonunun belirteci olarak kabul edilmiştir [21]. Aynı sitokinler, B hücre aktivasyonunda ve IgE dönüşümünde de etkilidir. IgE salgını, histamin ve sisteinil lökotrienler gibi inflamatuvar mediatörlerin görülmesine neden olur. Bu durum, bronkospazm, ödem, mukus üretimi gibi astıma spesifik semptomların görülmesi ile sonuçlanır (Şekil 2.3) [22].



Şekil 2.3. Alerjenin epitel bariyerle karşılaşma sonrasında astım patogenezi oluşturmanın ilerleyişi [23]

T2-yüksek endotip, kendi içinde 2 gruba ayrılmıştır;

### **2.3.1.1. Erken Dönem Alerjik Astım**

Dünyada astım hastalarının yaklaşık %95'i ilk alerjik reaksiyonlarını 6 yaşından önce göstermektedir [24]. Bu dönemdeki çocuklarda alerjik astım semptomlarının görülmesi aile geçmişinde alerjik astım görülmesi, bakteri veya viral kaynaklı solunum yolu enfeksiyonu geçirilmesi ve sigara dumanına maruz kalınması gibi koşullara bağlıdır [25, 26]. Ayrıca alerjik rinit ve atopik dermatit ile ilişkilendirilen bu astım fenotipinde, Th2 kaynaklı egzama da görülmektedir [27]. 6 yaşındaki çocuklarda yapılan bir çalışmada rinovirus enfeksiyonu sonucunda görülen kuvvetli hırıltı (wheezing), astımla ilişkilendirilmiştir, ancak viral enfeksiyonlar ve astım arasındaki ilişki net olarak açıklanamamıştır [28, 29].

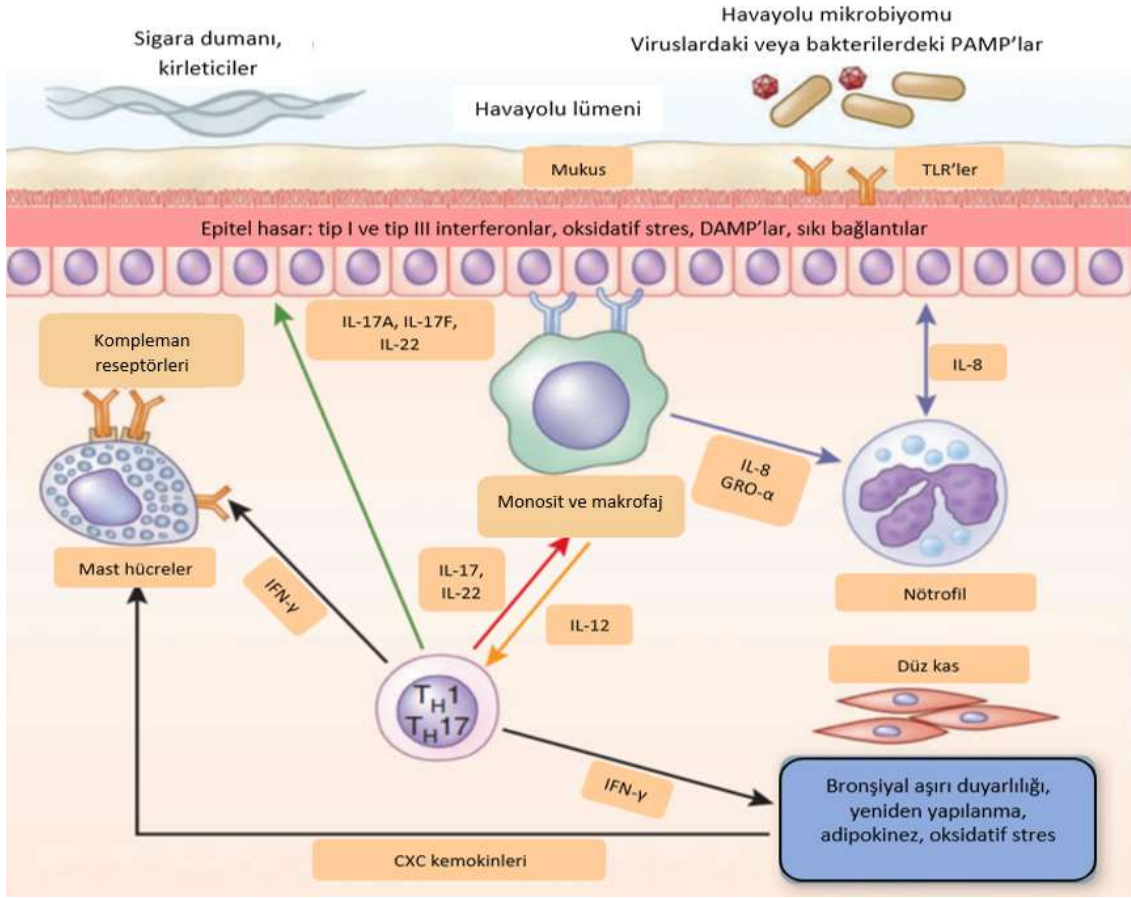
### **2.3.1.2. Geç Dönem Alerjik Astım**

Erken dönemde görülen alerjik reaksiyonların yetişkinlik dönemlerinde başlaması, geç dönem alerjik astım fenotipi olarak adlandırılır. Literatürde 'yetişkinlik dönemi'ni, 12 yaşından 65 yaşına kadar ya da 40 yaş üstü olarak tanımlayan çalışmalar mevcuttur [30, 31]. Erken dönem alerjik astımlı bireylere göre semptomları çok az bilirse de genel olarak zayıf prognoz, akciğer fonksiyonlarındaki düşüşün hızlı olması ve nefes alım kapasitesinde azalma gibi semptomlarla karakterize edilir [32, 33].

### **2.3.2. T2-Düşük Endotip**

T2-düşük astım endotipi, CD4<sup>+</sup> hücrelerinin Th1 veya Th17 hücrelerine farklılaşması ile tanımlanırken düşük eozinofil sayısı ile de belirlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, çocukluk döneminde alerjik reaksiyonlara sahip olmayan ve yetişkinlik dönemlerinde orta dereceli astım semptomlarına sahip kişilerde astım tedavisi amacıyla verilen yüksek dozda kortikosteroidlere cevap alınmadığı görülmüştür [34]. Yapılan başka bir çalışmaya dahil edilen 378 hastanın BAL ve kan değerlerine bakıldığında 112 hastada yüksek nötrofil sayısı ve ekshale nitrik oksit (FeNO) tespit edilmiştir [35]. Bu durumun, kortikosteroid kullanımına bağlı olduğu düşünülse de tedavi sürecinde olmayan

hastalarda da nötrofil sayısında artış tespit edilmiştir [36, 37]. Bu sonuçlara bağlı olarak T2-düşük endotip, nötrofil sayısındaki artışa bağlı olarak da tespit edilebilmektedir.



Şekil 2.4. T2-düşük astım mekanizması [36]

### 2.3.2.1. Nötrofilik Astım

Nötrofilik havayolu inflamasyonu genellikle ağır astım, steroid dirençli astım ve iş kaynaklı astım durumlarında görülmektedir. Uyarılan epitel hücre yüzeyinde bulunan TLR4 ve CD14 reseptörleri nüklear faktör (NF)-κB aktivasyonunu gerçekleştirir. Ortamda sayıları artan monosit ve makrofajlar, dış çevreden etkilenen ve apoptoza uğrayan hücreleri fagosite eder ve bunun sonucunda salınan IL-8 kemokini, nötrofillerin gelmesini sağlar (Şekil 2.4) [38].

Nötrofilik astımda görülen Th17 inflamasyonu, epitel hücrede IL-17 salımını uyarır ve hava yolu yeniden yapılanması, düz kas hipertrofisi ve mukusun aşırı üretimi ile ilişkilendirilir. Ancak Th17 hücrelerin varlığına rağmen T2-yüksek astım sitokinleri



salınabilir ve IL-8 ifadesi engellenerek nötrofillerin ortama gelmesi engellenebilir [39, 40]. Bu nedenle Th17'nin ortamda bulunması, nötrofilik astım için tek başına bir belirteç olarak sayılmamaktadır. Daha çok bakteriyel ve fungal enfeksiyon sonucunda ifadesinin arttığı tespit edilen ve nötrofilik astımda Th1 ve Th17'den salınan IFN- $\gamma$ 'nın, T2 yüksek astıma göre daha fazla ifade olduğu bulunmuştur [41, 42]. Ayrıca astım, KOAH ve akciğer kanserine sahip 900'e yakın hastada yapılan çalışmada HDM gibi kapalı ortam alerjenlerinin de nötrofilik inflamazomu tetiklediği tespit edilmiştir [43, 44].

### **2.3.2.2. Obezite İlişkili Astım**

Obezite ilişkili astım, kadınlarda daha sık görülen bir astım fenotipidir [45]. Obezite ilişkili astımda rol oynayan mekanizmalara bakıldığında CD4<sup>+</sup> T hücrelerden Th1 farklılaşması görülmüştür ancak aynı zamanda az miktarda eozinofile de rastlanmıştır[46]. Yağ dokusundaki inflamasyon sonucunda ifade olan ve IL-6 benzeri protein olan leptin, obez astımlı farelerde akciğer bütünlüğünün bozulmasına ve ağır alerjik havayolu inflamasyonunun görülmesine neden olmuştur [47, 48]. HDM alerjeni ile uyarılan farelerde yapılan bir çalışmada yüksek miktarda leptine bağlı görülen hava yolu reaktivitesinin kilo kaybı ile tersine çevrilebildiği gösterilmiştir [49]. Obezite ilişkili astımın mekanizmasında inflamasyonun kilo ile ilişkisi olmadığı tespit edilmiştir. Alerjenlere karşı obez hastaların verdiği tepkinin obez olmayanlara göre kuvvetli olması, alerjenlere duyarlılığın daha fazla olması ile açıklanmaktadır [50].

### **2.4. Astım ve IgE**

IgE antikorunun, ilk olarak solucan, kurt (helminth) gibi patojenlere karşı üretildiği düşünülmüştür. Günümüzde ise alerjenleri tanıyarak alerjik reaksiyonları başlattığı bilinmektedir [51, 52]. Vücuttaki epitel tabakaları altında bulunarak besin, hava ya da temas ile maruz kalınan alerjenlere karşı savunma görevi görür [53]. Dendritik hücrelerce alerjenin tanınması Th2 hücre farklılaşmasında etkili olur. Salınan IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerinin yanında B hücreler tarafından alerjene spesifik IgE'lerin üretildiği görülür. IgE, ortamdaki mast hücreler tarafından hücre yüzeyinde ifade olan Fc $\epsilon$ RI'e yüksek afinite ile tutunur. Tutunma sonucunda nötrofil proteaz, histamin ve proteoglikanlar gibi granüler mediatörlerin salımı gerçekleşir ve farklı sinyal yolları aktifleşir [54, 55]. IgE'nin mast hücrelerin yanında bazofillerde de bulunan Fc $\epsilon$ RI'e tutunması, Fc $\epsilon$ RI ifadesini arttırırken monositlere ve dendritik hücrelere tutunması sonucunda ise IgE-

FcεRI bağı hücrelerdeki endozomal içerikle kırılır [56, 57]. Bu iki durumla bireydeki IgE seviyesi ve hücre yüzeyinde bulunan reseptörün ifadesi dengelenerek bireyin alerjene karşı hiperreaktivite göstermesi engellenir.

## **2.5. Astım ve Havayolu Epitelinin İlişkisi**

Havayolu epitel hücreleri akciğerde hava ile dış ortamdaki gelen alerjen, mikroorganizma, kimyasallar ve toksinler gibi çeşitli maddelerle karşılaşan ve bu maddelere karşı koruyucu rol üstlenen ilk hücrelerdir. Bu hücreler oluşturdukları fiziksel bariyerle birlikte yüzeylerinde bulunan patern tanıma reseptörleri (PRR) vasıtasıyla kimyasal bir bariyer rolü de üstlenirler [58]. PRR'lerin aktivasyonu ile bağışıklık sistemi hücrelerini harekete geçirecek mediyatörlerin salımının yanı sıra doğal bağışıklıkta etkili olan lizozim ve mukus salımı gerçekleşir. Bu sayede PRR'ler tarafından tanınan moleküllerin havayolunda epitel dokuya zarar vermesi engellenir [59, 60]. Dendritik hücreler, epitel hücrelerin arasındaki sıkı bağlantılar arasından uzanarak epitel hücrelerle temas eden alerjeni tanır ve bağışıklık sistemini bu alerjene karşı harekete geçirir [61]. Yapılan çalışmalarda epitel hücreler üzerinde de bulunan PRR'lerin ev tozu akarı (HDM) alerjeni ile uyarılması sonucunda alarminleri salgıladığı ve dendritik hücreleri ortama çağırdıkları bulunmuştur [62].

İnflamatuvar, mezenkimal ve epitel hücreler gibi çeşitli hücrelerde bulunan PRR'ler, hem ekzojen hem de endojen uyarınları tanımaya yönelik özelleşmişlerdir. Hasarlı, stres durumundaki veya ölüm yolağına girmiş hücrelerden salınan hasar-ilişkili moleküler kalıpları (Damage-associated molecular pattern-DAMP) ve mikrobiyal enfeksiyon durumunda patojen ilişkili mikrobiyal kalıpları (pathogen-associated molecular pattern-PAMP) tanıyan PRR'ler, immün sistemin uyarıcı sinyal basamaklarını harekete geçirirler [63, 64]. Reseptör kinazlar, Toll-benzeri reseptörler (TLR) ve C-tip lektin reseptörleri (CLR) membrana bağlı bulunan PRR'ler iken NOD-benzeri reseptörler (NLR) ve RIG-I-benzeri reseptörler (RLR) ise sitoplazmada serbest halde bulunmaktadır.

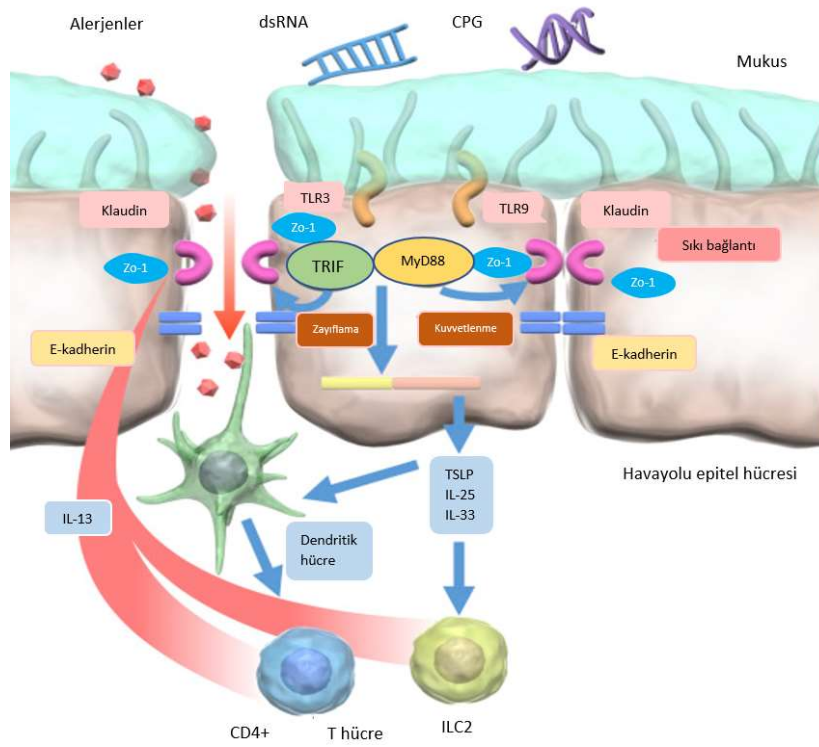
Ekstraselüler ve intraselüler patojen kalıplarını tanıyan TLR'ler doğal ve adaptif immün basamaklarını harekete geçirecek olan sitokin sentezini ve salımını başlatır. Epitel hücre membranında bulunan TLR4, gram-negatif bakteriler üzerindeki lipopolisakarit (LPS) yapılarını tanıyarak NF-κB yolağı üzerinden hücresel savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar TLR4'lerin hasarlı dokudan ya da nekrotik hücrelerden salınan endojen molekülleri de tanıdığını göstermektedir [65]. TLR4,

miyeloid farklılaşma faktörü-2 (MD-2) ile kompleks oluşturur ve bu kompleks, TLR4'ün LPS ile indüklenen cevabı için gereklidir [66]. MD-2'nin moleküler yapısına benzerlik gösteren Der p 2 alerjeni de TLR4 ile kompleks oluşturabilmektedir. MD-2-eksik farelerde yapılan çalışmada Der p 2'nin tek başına doğal bağışıklık sistemini uyardığı görülmüştür [67]. Der p 2 alerjeni ile uyarılan epitel hücrelerde NF-κB ve MAPK yolları üzerinden Th2 alerjik cevabı indüklenmektedir [68]. Yapılan çalışmalar, bu yolların Der p 2'nin TLR4 ile oluşturduğu kompleks üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir [69].

Epitel hücrelerden salınan ve alerjik cevapta etkili olduğu bilinen önemli sitokinler TSLP, GM-CSF, IL-25 ve IL-33'tür. TSLP sitokini, dendritik, mast ve CD34<sup>+</sup> progenitör hücrelerin aktivasyonunu sağlar ve alerjinin şiddetine göre Th2 tip inflamatuvar cevapta etkili olur [70]. IL17E olarak da bilinen IL-25 sitokini, IL-4, IL-5 ve IL-13 salımını uyarır ve serumda yüksek IgE konsantrasyonu ile havayolu aşırı duyarlılığı görülür [71]. IL-25'in seviyesinin epitel hücreden salınan MMP-7 tarafından kontrol edildiği MMP7<sup>-/-</sup> fare modelinde gösterilmiştir [72]. IL-33, astımlı kişilerin bronş epitel hücrelerinde yüksek miktarda bulunur ve akciğerdeki dendritik hücreleri harekete geçirerek Th2 tip hücresel cevabın oluşmasına katkı sağlar [73]. GM-CSF ise epitel hücreler de dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinden salınır ve alerjik inflamasyonun düzenlenmesinde etkilidir. HDM ile uyarılan astımlı fare modeli çalışmalarında GM-CSF'in akciğer eozinofil sayısı üzerinde etkili olduğu bulunmuştur [74].

İmmün cevabın erken evrelerinde salınan kemokin ve sitokinlerin hava yolu inflamasyonuna ve bronşiyal aşırı duyarlılığına neden olduğu bilinmektedir. Sağlıklı bireylerde hava yolu epitel dokuda meydana gelen hasar onarılabılır. Astımlı bireylerde ise astım sıklığının artması ve kronik inflamasyon durumunun görülmesi, akciğer fonksiyonunu normalin altına düşürür. Silli epitel hücre sayısı azalırken apoptoza yatkın bazal epitel hücreler yüzeyde kalır [75]. Fibroblastlar ve miyofibroblastlarca üretilen kolajen ve proteoglikan gibi ESM elemanlarının sayısı artar [76]. Görülen bu bozulmalar hava yolu yeniden yapılanması (airway remodeling) olarak adlandırılmaktadır [77, 78]. Hava yolu yeniden yapılanmasının ortaya çıkışı, sigara dumanı veya havadaki partiküller gibi farklı uyaranlara maruz kalma süresine ve pro-inflamatuvar moleküllerin üretilme sıklığına bağlıdır. Bu durum kişiden kişiye değişmekle birlikte, her inflamatuvar süreç sonunda görülmemektedir [79]. Hava yolu yeniden yapılanması sırasında astımlı

bireylerin akciğer epitel hücrelerinde sıkı bağlantıları meydana getiren E-kadherin ve Kaveolin-1 molekülünün bozulduğu görülmüştür [80]. Bunun yanında düz kas hücrelerinde büyüme ve hücre göçü, üretilen ESM elemanlarının fazlalığı nedeniyle su kapasitesinin artması ve buna bağlı olarak bronşlarda kalınlaşma tespit edilmiştir [81]. Yapılan farklı çalışmalarda steroid tedavisi gören astımlı çocuklarda ve metakolin ile gerçekleştirilen bronko-konstriksiyon sonucunda havayolu yeniden yapılanması görülmüştür ancak elde edilen bu farklı sonuçlara neden olan mekanizma tam olarak açıklanamamıştır [82, 83].



Şekil 2.5. Epitel hücreler arasındaki bağlantılar ve alerjen geçişi [84]

Hücreler arasındaki sıkı bağlantı molekülleri ile alerjenin dokuyu geçmesi engellenir ancak astımlı kişilerdeki epitel hücre bariyeri hassastır (Şekil 2.5). Adhezyon elemanlarından biri olan E-kadherin ekstraselüler bölgede bulunan ve hücreler arasındaki bağlantıyı  $Ca^{2+}$  ile kuran bir moleküldür [85]. E-kadherinin ifadesinde meydana gelen bir azalma, dendritik hücreler tarafından tonik inhibitör sinyal yolu ile algılanır ve bunun sonucunda aktifleşen dendritik hücrelerin alerjene hassasiyeti artar [86]. Epitel hücrelerde TSLP ifadesinin artışı da alerjene olan duyarlılığı artırır [87]. Zonula occludens-1 (ZO-1) molekülü ise epitel hücre polarizasyonu için önemli bir sıkı bağlantı elemanıdır. Hava yolu epitel hücre hattı olan Calu-3 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, IL-4 ve IL-13

sitokinlerinin ZO-1 molekülü üzerinden epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantıları bozduğu bulunmuştur [88]. Ayrıca hücre-hücre bağlantıları arasında gerçekleşen kırılmalar HDM, polen veya mantar kaynaklı alerjenlerin proteolitik etkileri nedeniyle de gerçekleşebilir [89, 90].

## 2.6. Astım ve HDM

Astımın en bilinen etkenlerinden biri olan ev tozu akarları (HDM) bireyin kapalı ortamlarda en çok maruz kaldığı alerjenlerin kaynağıdır [91]. Yaşamları için sıcak ve tozlu ortamları kullanmaları nedeniyle ılıman iklime sahip yerlerde görülme yüzdeleri fazladır [92]. Genel olarak yüzden dökülen deri parçalarını ve diğer canlı kaynaklı biyolojik atıkları yiyerek yaşarlar [93]. Dünya popülasyonunun %1-2'lik kısmı HDM kaynaklı alerjenlerden etkilenmektedir ve bu alerjenler farklı özelliklere sahiptir. HDM grubunu oluşturan *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) kaynaklı 31 alerjen, *D. farinae* (Der f) kaynaklı 20 alerjen, *Blomia tropicalis* (Blo t) kaynaklı 14 alerjen ve *Euroglyphus maynei* (Eur m) kaynaklı 5 alerjen bulunmaktadır [94]. Bu canlıların bağırsaklarında bulunan sindirime yardımcı enzimler, canlının atıklarıyla dışarıya verilir. Alerjik reaksiyonu başlatan asıl alerjenler olarak kabul edilen bu proteolitik aktiviteye sahip moleküller, genellikle solunum yoluyla alınır [95]. Küçük moleküller olmaları nedeniyle akciğerde kolaylıkla ilerlerler ve Th2 polarizasyonunu uyararak alerjik reaksiyonu başlatırlar [96, 97].

HDM ilişkili alerjik reaksiyonların görülmesinde farklı koşullar etkilidir. Örneğin, 0-3 yaş arası çocuklar ile yapılan klinik bir çalışmada HDM kaynaklı alerjik reaksiyonların, erken yaşlarda bu alerjenlere maruz kalınmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [92]. Yapılan bir başka çalışmada ise 0-5 yaş arasındaki çocuklarda yüksek veya düşük dozda HDM alerjenlerine maruz kalma sonucunda ileriki yıllarda HDM'ye karşı gösterdikleri alerjik reaksiyon tepkisi düşmüştür [98]. Son yıllarda yapılan mikrobiyaya çalışmalarında da bu konu üzerinde durulmuştur. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda intranazal bölgenin ve dalak hücrelerinin *Lactobacillus plantarum* bakterisi ve HDM alerjeni ile uyarımı sonucunda HDM'ye karşı alerjik yanıt düşmüştür. Bunun yanında eozinofil hücrelerinin sayısında düşüş ve dalaktaki CD4+ hücrelerin Th1 hücrelere farklılaştığı tespit edilmiştir [99].

Çizelge 2.1 HDM alerjenlerinin gruplandırılması[100]

Grup	Fonksiyon	Grup	Fonksiyon
1	Sistein proteaz	12	Kitinaz
2	MD-2-benzeri lipit bağlayıcı protein	13	Lipokalin
3	Tripsin - benzeri serin proteaz	14	Vitellogenin /Apolipoforin-benzeri
4	Amilaz	15	Kitinaz
5	Lipit bağlayıcı protein	16	Gelsolin
6	Kimotripsin-benzeri serin proteaz	17	EF-Ca <sup>2+</sup> -bağlayıcı protein
7	Lipit bağlayıcı protein	18	Kitinaz
8	Glutasyon-S-transferaz	19	Antimikrobiyal peptit
9	Kollajenolitik-benzeri serin proteaz	20	Arjinin kinaz
10	Tropomiyozin	21	Lipit bağlayıcı protein
11	Paramiyozin	22	Lipit bağlayıcı protein

HDM alerjenleri, sahip oldukları özelliklerine göre gruplandırılmıştır (Çizelge 2.1). Grup 1 olarak adlandırılan sistein proteaz grubu alerjenler incelendiğinde Der p 1 ve Der f 1'in moleküler yapılarında benzerlik tespit edilmiştir [91]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Der p 1 alerjeninin serin proteaz özelliği olduğu da bulunmuştur. Zimojen formu olan pro-Derp1 olarak üretilmektedir ancak pro kısmı kesilip aktif duruma geldiğinde alerjik reaksiyonlarda daha etkili olmaktadır [101]. Genellikle proteaz aktivitesine sahip Der p alerjenleri epitel bariyerdeki sıkı bağlantıları bozarak hücre yıkımına neden olurlar. Proteaz özelliğe sahip olmayan ve MD-2 molekülüne moleküler olarak benzerlik gösteren Der p 2 ve Der f 2 gibi grup 2 alerjenleri ise TLR4 üzerinden alerjik reaksiyonları başlatır.

## 2.7. Proteazlar

Proteazlar, proteinleri parçalayan enzimlerdir. Virüs, bakteri ve parazit gibi düşük yapılı organizmalardan memeliler gibi gelişmiş sistemlere sahip yüksek yapılı organizmalara kadar farklı canlılarda bulunurlar. Proliferasyon, büyüme, inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi birçok biyolojik yolak için öneme sahiptirler [102, 103]. Proteazlar, parçalama mekanizmalarına ve aminoasit dizilerine göre MEROPS (Proteaz, substrat ve proteaz inhibitörlerinin databazı) veri tabanında 6 temel gruba ayrılmış durumdadır. Bunlar; aspartik, glutamik, metallo, serin, sistein ve treonin proteazlardır [104].

Alerjenler üzerine yapılan çalışmalar, mantar, bitki, hamamböceği ve HDM kaynaklı farklı alerjenlerin proteaz özelliğe sahip olduklarını göstermiştir [105-108]. Bu alerjenler, sahip oldukları katalitik aktivite ile yüzey proteinlerini ve endojen proteaz inhibitörlerini parçalayarak alerjik duyarlılaşma durumunda etkili olabilirler [109, 110]. Epitel hücre yüzeyiyle karşılaşan proteaz alerjenler, PAR-2' gibi reseptörleri aktive ederek ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıları bozarak doğal bağışıklık cevabını başlatırlar [111]. Proteazların aktivitesi, epitel hücreden ve doğal bağışıklık hücrelerinden salınan proteaz inhibitörleri ile dengelenir.

### 2.7.1. Sistein Proteazlar

Hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bulunan sistein proteazlar, 20 familyadan oluşmaktadır [112]. Parazitlerde bulunan sistein proteazlar hemoglobin hidrolizinde, yüzey proteinlerinin işlenmesinde ve kan hücresi etkinliklerinde rol oynar. Memelilerde sistein proteazlar genelde lizozomal katepsinler olarak bilinir ve osteoporoz, AIDS, malarya, Afrika uyku hastalığı gibi bağışıklık sistemiyle ilişkili hastalıkların tedavisinde hedef olarak belirlenmişlerdir [113]. Zimojen formunda ifade olan sisteinler, oto-kataliz yolu ile aktifleşirler. Der p 1 alerjeninde de görülen oto-kataliz durumunun, ortamın pH değerine göre değiştiği ve asidik pH değerlerinde katalitik aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir [114, 115].

Grup 1 HDM alerjenleri olarak adlandırılan Der p 1, Der f 1, Blo t 1, Eur m 1 ve Der m 1 alerjenleri sistein proteaz özelliğine sahiptir. Bu proteazlar epitel hücreler arasındaki

sıkı bağlantıları bozarak hücreler arasındaki geçirgenliği arttırırlar [116]. Bireyde grup 1 alerjenlerine karşı gerçekleşen reaksiyonlarda bağışıklık sistemi hücrelerinin farklı cevaplar verdiği bulunmuştur. Sistein proteaz özelliğindeki alerjenler, B-hücreleri üzerinde bulunan ve IL-2 salımında etkili olan CD25 reseptörünü etkisiz hale getirir. Bu durumda Th1 farklılaşması yerine alerjik reaksiyonların görülmesinde etkili olan Th2 farklılaşması gerçekleşir [117]. Bir başka reseptör olan CD23'ün kesiminde de rol oynarlar ve IgE reseptörünün baskılanmasını inhibe ederek alerjene karşı daha fazla IgE üretilmesinde etkilidirler [118]. Der f 1 ile uyarılan B hücrelerinde de ROS-ERK ve p38 yolları üzerinden IL-8 salınır [119]. T hücrelerle yapılan bir çalışmada epitel bariyeri geçen sistein proteazların bu hücrelerin yüzeyindeki PAR-2'leri aktif hale getirdiği gösterilmiştir [120]. Akciğer epitel hücre hattı olan A549 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise sistein proteazların epitel hücre yüzeyindeki PAR-1'leri inaktive ederken PAR-2'leri aktive ettiği ve buna bağlı olarak IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir [121]. T2-yüksek fenotipte rol oynayan bazofiller de sistein proteaz alerjenler ile aktifleşirler. Kemik iliği bazofilleri kullanılarak yapılan *in vitro* deneylerde alerjenlerin proteolitik etkinliği ile IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin salındığı gösterilmiştir [122, 123].

### 2.7.2. Serin Proteazlar

Serin proteazlar endoproteaz özelliğine sahiptir ve zimojen formunda üretilirler. Tüm canlılarda bulunurlar ancak miktarları türden türe farklılık gösterir [124]. Pankreastan salınan kimotripsin, tripsin ve elastaz enzimleri; pıhtılaşmada rol oynayan faktör 10 (X), 11 (XI) ve 12 (XII) ile trombin ve plazmin enzimleri; ve doğal bağışıklık elemanları olan C1r, C1s, C4b ve C3b.Bb gibi kompleman molekülleri serin proteaz özelliği taşır [125, 126].

Penicillium, Rhodotorula, Aspergillus, Cladosporium ve Culvularia gibi fungal kaynaklı serin proteaz alerjenler mevcuttur [127-129]. A549 ve 16HBE14o- akciğer epitel hücrelerinde yapılan çalışmada Penicillium kaynaklı Pen ch 13 alerjeni ile uyarım sonrasında okludin kesimi ve immün cevap oluşumunda etkili olan IL-8 ile TGF-1 $\beta$  salımı görülmüştür [130]. Farelerde yapılan başka bir çalışmada Aspergillus kaynaklı Asp f 2 alerjeninin kendi başına etkili olmadığı görülmüştür. Asp f 13 alerjeni ile bir araya



geldiğinde ise akciğerde inflamatuvar süreci başlattığı ve kanda eozinofil sayısının arttığı tespit edilmiştir [131]. Hamamböceği türü olan *Periplaneta americana*'dan elde edilen Per a 10 alerjeni de serin proteaz özelliğe sahiptir. BEAS-2B hücrelerinin ve Balb/c farelerinin Per a 10 alerjeni ile uyarımı sonrasında sıkı bağlantı molekülleri olan ZO-1 ve okludin molekülleri üzerinde etkili oldukları ve Th2 farklılaşmasını uyardıkları bulunmuştur [132].

Grup 3 (tripsin-benzeri), 6 (kimotripsin-benzeri) ve 9 (kollajenolitik-benzeri) alerjenlerinden olan Der p 3, Der p 6 ve Der p 9, *D. pteronyssinus*'un bağırsağında üretilen alerjenlerdir. Bu alerjenlerin pro/inaktif formunda üretildikten sonra Der p 1 alerjeni tarafından aktif forma getirilirler [133, 134]. Bu gruplara dahil alerjenlerle yapılan çalışmalar, Der p 1 ile yapılan çalışmalara göre sınırlıdır. Bunun nedeni, HDM alerjenlerine duyarlı olan alerji hastalarında serin proteaz alerjenlere verilen IgE yanıtının, Der p 1'e göre düşük olmasıdır [135, 108]. Akciğer epitel hücrelerine uygulanan aktif haldeki bu alerjenlerin hücreler arasındaki sıkı bağlantı molekülleri olan ZO-1, okludin ve E-kadherini keserek havayolu yeniden yapılanılmasında etkili oldukları görülmüştür. Bu etki, epitel hücre yüzeyindeki PAR-2 reseptörünün aktifleşmesi ile gerçekleşir. Etkileşimin devamında ekstraselüler matrikse CCL17 ve TSLP salınır ve Th2 hücre farklılaşması görülür [136, 137].

Sistein proteaz özelliğe sahip Der p 1 ve Der f 1 alerjenlerinin yapılan çalışmalar ile serin proteaz özelliğine de sahip oldukları bulunmuştur. Der p 1 ve Der f 1 alerjenlerinin serin proteaz inhibitörü olan skuamoz hücre karsinoma antijeni 1 (squamous cell carcinoma antigens 1, SCCA1, SERPINB3) ve 2 (SCCA2, SERPINB4) varlığında CD25 molekülü üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir [138]. Serin proteazlarla aktive olan PAR-2 reseptörünün, fare ve insanlarla yapılan deneylerde Der p 1 ile aktifleştiği ve meydana gelen epitel bariyer yıkımını bu durumla ilişkili olduğu saptanmıştır [139].

### **2.7.3. Treonin Proteazlar**

Treonin proteazlar, aktif bölgelerinde bulunan treonin (Thr) rezidüsüne sahip olan proteazlardır. Serin ve sistein proteazlarla ortak olarak aktif bölgelerindeki belirleyici

aminoasidin yanı sıra aktif alan nükleofiline sahiptir [140]. Ancak doğada serin ve sistein proteazlara göre daha az miktarda buldukları tespit edilmiştir. Serin proteazlar 176, sistein proteazlar ise 150 üyeden oluşurken treonin proteazlar sadece 28 üyeden meydana gelmektedir [141, 142].

Doğada bulunan treonin proteaz alerjenlerin sayısı ise sınırlıdır. *Forcimopyia taiwana* (tatarcık) türü kaynaklı For t 1 alerjeni, sahip olduğu moleküler dizilimi nedeniyle treonin özelliğinin yanında serin proteaz özelliğine de sahiptir. 400'e yakın hastada yapılan çalışmada For t 1 alerjeni uyarımı sonrasında deride reaksiyon ve yüksek miktarda IgE tespit edilmiştir [143].

#### **2.7.4. Aspartik Proteazlar**

Aspartik proteazlar, katalitik bölgelerinde 2 aspartat rezidüsüne sahiptir. Aspartik proteazlara memeli canlılarda bulunan pepsin, HIV proteaz, katepsin-E, renin, kimosin, gibi proteazlar örnek verilebilir [144]. Alzheimer hastalığında etkili olan ve yara iyileşmesi, apoptoz, kanser ve tümör gelişiminde rol alan katepsin D proteini de aspartik proteaz özelliğine sahiptir [145-147].

Bla g 2 alerjeni, bağırsak gibi sindirim organlarında bulunur ve lizozomda bulunan *A. aegypti* kaynaklı Aed a 11 aspartik proteaz alerjeninden daha düşük miktarlarda bulunmaktadır [148]. Bla g 2 aspartik proteaz alerjeninin kedi ve HDM alerjenlerine kıyasla 10 ya da 100 kat düşük miktarlarının bile IgE üretimini arttırdığı bulunmuştur [149]. Aspartik proteazlarla benzer diziye sahip olmasına rağmen enzimatik olarak inaktif olması, Bla g 2 uyarımıyla gerçekleşen immünolojik yanıtı diğer proteaz etkili yollardan ayırır [150]. Yapılan bir çalışmada mantar alerjen reseptörü olan CLR'ler tarafından tanınarak bazofillerde IL-4 üretimini ve mast hücrelerden histamin salımını tetiklediği bulunmuştur [151].

*Periplaneta americana* kaynaklı Per a 2 alerjeni de aspartik proteaz özelliğine sahiptir [152]. Tayvan'da yapılan bir çalışmada hamamböceğine alerjisi olan ağır astım hastalarında IL-8, GM-CSF, CCL-20 ve MCP-1 kemokin değerlerinin alerjik rinitli

hastalara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda *P. americana* kaynaklı alerjenler arasında Per a 2 alerjeninin en yüksek IgE bağlama oranına sahip olduğu görülmüştür [153]. Ekmek küfü kaynaklı Rhi o 1 alerjeninin, PBMC hücrelerine uygulanması sonrasında serumda bulunan IgE'ler tarafından tanındığı ve histamin salımını uyardıkları bulunmuştur. Ayrıca Bla g 2 alerjeni ile de çapraz-reaksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir [154].

### 2.7.5. Glutamik Proteazlar

Glutamik proteazlar, asit peptidaz grubuna sahiptir ve asidik pH'da optimum aktiviteye sahiptirler [155]. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda filamentli mantar türlerinde rastlanan glutamik proteazlar, bu mantarların büyümelerinde etkilidirler [156, 157].

### 2.7.6 Metalloproteazlar

Metalloproteazlar, morfogenez, metabolizma, hücre döngüsünün düzenlenmesi, biyolojik olarak aktif hormon ve peptitler, hücre göçü ve adhezyon gibi birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. MEROPS veri tabanına göre kendilerini aktifleştiren iyon sayısına ve sahip oldukları moleküler motife göre 14 klanı ayrılmışlardır (MEROPS database; <https://merops.sanger.ac.uk/>). Bağlı metal olarak en sık çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonuna rastlansa da kobalt, nikel ya da manganaz gibi iyonların bağlanması ile aktifleşen metalloproteazlar da mevcuttur [158].

İnsanlarda en sık rastlanan metalloproteaz grubu olan MA, moleküler dizilerinde HEXXH motifine sahiptirler [159]. MA klanı dahilinde bulunan M3 (Nörolisin), M10 (Matriks metalloproteaz), M12 (Astasin ve ADAM), M13 (Neprilisin), M41 (Paraplegin) ve M43 (Pappalisin) gibi aileler, insanlarda meydana gelen birçok biyokimyasal olayda rol almakta ve farklı hastalıklarla ilişkilendirilmektedirler [160-163].

*Aspergillus fumigatus* kaynaklı proteaz olan Asp f 5, metalloproteaz özelliği bulunan bir alerjendir. Farelerin Asp f 5 alerjenine maruz kalması sonrasında akciğer dokusunda Th2 sitokinlerindeki değişim ELISA testi ile ölçülmüş ve IL-4 ve IL-13 seviyelerinde artış

tespit edilmiştir [164]. Bunun yanında akciğer epitel dokusu altındaki kolajen miktarındaki farklılıklar da bu alerjenin havayolu yeniden yapılanmasında rol oynadığını göstermektedir.

## 2.8. Matriks Metalloproteazlar

Matriksin olarak da bilinen matriks metalloproteazlar, ekstraselüler matriks parçalanması başta olmak üzere geniş bir fizyopatolojik süreçte önemli bir göreve sahiptir [165]. Bu proteaz ailesi 28 üyeden oluşmaktadır ve bunların 23'ü insan kaynaklıdır [166]. Epitel hücre, fibroblast, düz kas hücresi gibi yapısal ve nötrofil, makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerde ifade olan MMP'lerin çok az bir kısmı spesifik dokulardan ifade olur [167]. Temel yapılarında pro-bölge, katalitik bölge, C-terminal hemopeksin-benzeri bölge ve bağlayıcı (linker) bölgeye sahiptirler. N-terminal pro-bölgeleri, MMP'nin enzimatik aktiviteye başlamasını önleyici bir göreve sahiptir. İnaktif halde ifade olan MMP'ler, katalitik bölgelerine bağlanan çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonu ile aktifleşirler ve sahip oldukları 'pro' kısımları, diğer proteazlar veya MMP'ler tarafından kesilir. C-terminal hemopeksin benzeri bölgelerinin substratı tanınması ile aktivite gösterirler [168, 169]. Linker bölge ise katalitik ve C-terminal hemopeksin benzeri bölgeyi birbirine bağlar ve substratın parçalanması için bir bölge oluşturur [170].

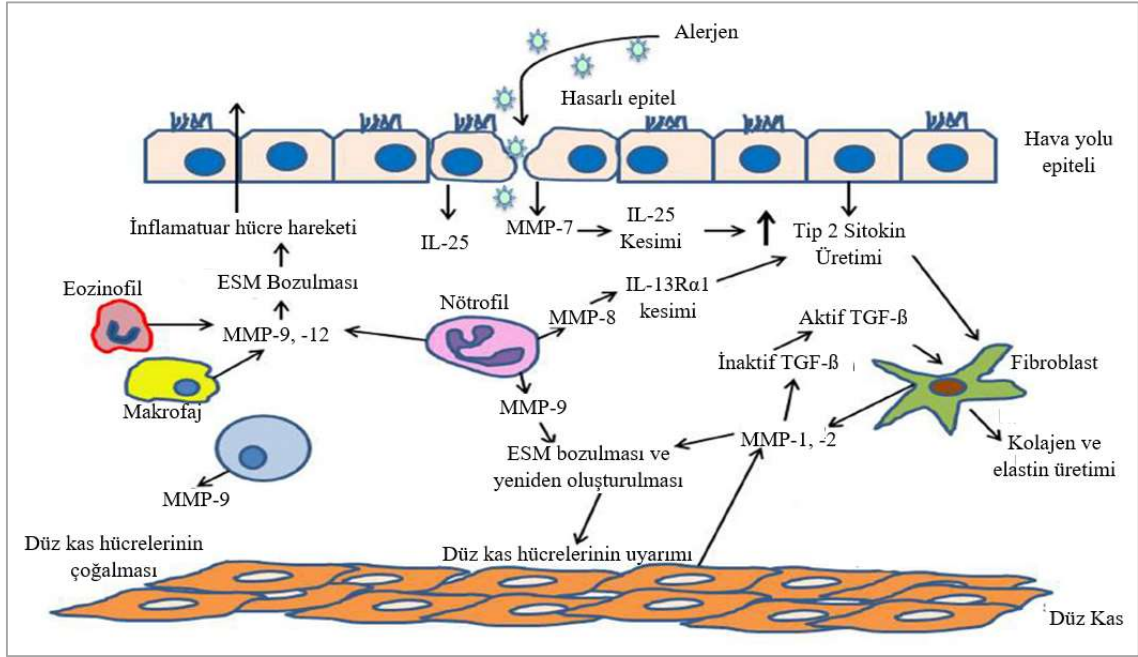
MMP'ler genellikle ekstraselüler matrikste bulunmaları ile bilinirler ancak istisna durumlar da mevcuttur. Endoplazmik retikulumda üretilen proteazlar, Golgi cisimciği ve sonrasında hücre dışına salınması için özgün protein sekans dizilerine sahiptirler. Ancak MMP-3, bu özgün sekans dizisine sahip olmadığı için hücre içinde kalırken, MMP-2 ise sahip olduğu farklı sekans bölgeleri nedeniyle hücre içindeki molekülleri de hedef alabilir [171, 172]. MMP'lerin hücre içi ve hücre dışındaki aktiviteleri birçok molekül tarafından düzenlenmektedir. IL-1, IL-4 gibi interlökinler, EGF (epidermal büyüme faktörü), HGF (hepatosit büyüme faktörü) ve TGF (transforme edici büyüme faktörü) gibi büyüme faktörleri ve inhibitörleri sayesinde negatif veya pozitif olarak kontrol edilebilirler [173].

MMP'lerin temel görevi olan ekstraselüler matriks parçalanması, dokuda meydana gelen hücre göçü ve hücre büyümesi gibi olaylarda gerekli ortam şartlarının yaratılmasında

etkilidir. Ancak MMP'lerin aktivitesini uzun süre göstermesi doku harabiyetine neden olmaktadır. Astım hastalarında görülen hava yolu yeniden yapılanmasının nedenlerinden biri MMP'lerin yoğun aktivitesi sonucu görülen doku harabiyetidir. [174]. Bu durumun önlenmesi için proteazların aktivitesi hem transkripsiyon seviyesinde kontrol edilir hem de Metalloproteazların Doku İnhibitörleri (Tissue Inhibitors of Metalloprotease - TIMP) ifadesi ile ESM parçalanması kontrol altına alınır [175]. Günümüze kadar 4 farklı TIMP (TIMP-1, -2, -3, -4) tanımlanmıştır. Sahip oldukları N-terminal bölgeleri ile MMP'lerin katalitik bölgelerine bağlanarak proteazların aktivitelerini durdururlar. TIMP-1, membran-tip MMP'lerle (MMP-14, -16, -19, -24) zayıf bağlantı kurması dışında bütün MMP'leri inhibe edebilir [176]. TIMP-2 ve TIMP-3'ün ise MMP'lerle kurduğu bağ kuvvetleri aynıdır ancak TIMP-2 serbest halde bulunurken TIMP-3 matrikse tutunmuş haldedir. Diğer TIMP'lerden farklı olarak TIMP-4 kalp, beyin ve iskelet kası gibi sınırlı dokularda bulunmaktadır [177]. TIMP'ler, sahip oldukları inhibisyon etkilerinin yanı sıra pro-MMP-2 ve pro-MMP-9 ile de bağ oluşturarak bu proteazların aktivasyonlarını düzenlerler [178, 175].

### **2.8.1. Matriks Metalloproteazların Görevleri**

Ekstraselüler matriks, kolajen, jelatin, elastin, proteoglikan ve glikoprotein gibi moleküllerden oluşur. Yapısal olarak önemli olan kolajen ve elastin, MMP'lerin tanıdığı temel substratlardandır. Bu molekülleri tanınması ile gerçekleştirdikleri proteolitik aktivite sonucunda birçok fizyolojik olay için ortam hazırlanmış olur. Dokuda meydana gelen yaralanma sırasında hücre göçü, aktivasyonu, çoğalması ve etkinliği, MMP'lerin ortamdaki miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu nedenle MMP'ler inflamatuvar süreç için de önem teşkil eder [179].



Şekil 2.6. İnflamasyon durumunda MMP'ler [180]

İnflamasyon ve hücre cevabında rol oynayan sitokin, kemokin ve büyüme faktörü gibi sinyal moleküllerinin bazıları MMP'ler tarafından uyarılır veya aktif hale getirilir (Şekil 2.6). CC- ve CXC- motifine sahip kemokinler üzerinde etki göstererek de ifadelerini düzenler ve inflamatuvar sürecin bireye zarar vermeyecek şekilde devam etmesini sağlarlar [181]. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada jelatinaz ailesinden olan MMP-9'un nötrofil uyarıcı sitokin olan IL-8, granülosit uyarıcı protein-2 (GCP-2) ve epitel hücre kaynaklı nötrofil aktivasyon peptidi-78 (ENA-78)'in ifadesini arttırdığı bulunmuştur. MMP-8'in IL-8 üzerindeki etkisinin ise MMP-9 ile aynı ancak GCP-2 ve ENA-78 üzerindeki etkisinin daha düşük olduğu aynı çalışmada gösterilmiştir [182].



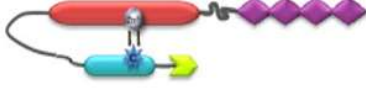

Sitokinlerin kesiminde rol oynadıkları gibi sitokinlerin bağlandığı reseptörleri de keserek düzenleyici etki gösterirler. Pro-inflamatuvar sitokin olan IL-1 $\beta$ , hücreden pro-IL-1 $\beta$  şeklinde salınır. MMP-2,-3 ve -9 bu sitokinin pro kısmını keserek aktif hale getirebilir. Aynı zamanda MMP-1, -2, -3 ve -9 aktif olan IL-1 $\beta$ 'yı keserek inaktif fragmentler haline getirebilir [181]. T hücrelerin devamlılığı için hücre yüzeyinde bulunan reseptör CD25 molekülünün IL-2 ile bağlanması gerekmektedir ancak kanserli dokuda yapılan bir çalışmada MMP-9'un CD25'i kestiği ve T hücre aktivasyonunun önlediği gösterilmiştir [183].

Yara iyileşmesi sırasında meydana gelen süreçte de MMP'lerin etkili olduğu bulunmuştur. ESM molekülleri üzerinde gerçekleştirdikleri etki ile hücrelerin hasarlı bölgeye hareketini kolaylaştırırlar. Epitel hücrelerde bulunan Gelactin-3 molekülü hücreler arasındaki bağlantıyı bozabilir ve yara iyileşmesi üzerinde etkilidir. Retinal epitel hücrelerde Gelactin-3 molekülü üzerinden gerçekleşen MMP-9 ifadesinde düşüş gözlenmiş ve yara iyileşmesinin tam olarak gerçekleşmediği tespit edilmiştir [184]. MMP-3, eklem bölgelerinde bağlayıcı doku büyüme faktörü (CTGF) üzerindeki etki ile eklem rahatsızlığı sonucu meydana gelen doku hasarının düzenlenmesini gerçekleştirir [185].

### **2.8.2. Matriks Metalloproteazların Gruplandırılması**

MMP'lerin ilk gruplandırılması, sahip oldukları moleküler yapıları, substrat özellikleri ve aktivasyon mekanizmalarına göre yapılmıştır. Buna göre temelde 4 ana gruptan oluşmaktadırlar. Bunlar: arketipik MMP'ler, matrilisinler, jelatinazlar ve furin-bağlı MMP'lerdir (Çizelge 2.2) [168, 186].

Çizelge 2.2. Sahip oldukları bölgelere ve substratlarına göre MMP'lerin gruplandırılması

<i>Grup</i>	<i>Alt grup</i>	<i>MMP</i>	<i>Substratları</i>
<b>Arketipik MMP'ler</b>	Kolajenazlar 	1	Kolajen tip-I, II, III, VII, VIII, X, jelatin, agrekan, serpin, tenaskin-C
		8	Kolajen tip-I, II, III, V, VII, VIII, X, jelatin, agrekan, elastin, laminin
		13	Kolajen tip-I, II, III, IV, jelatin, agrekan, fibronektin, laminin
		18	Kolajen tip-I, II, III, jelatin
	Stromelisinler 	3	Kolajen tip-II, III, IV, IX, X, XI, jelatin, agrekan, elastin, dekorin, laminin, proteoglikan
		10	Kolajen tip-III, IV, V, jelatin, agrekan, elastin, laminin
	Diğer MMP'ler 	12	Kolajen tip-IV, jelatin, fibronektin, elastin, laminin
		19	Kolajen tip-I, IV, jelatin, fibronektin, agrekan, nidojen, laminin, tenaskin
		20	Kolajen tip-V, kıkırdak oligomerik protein, amelojenin
	<b>Jelatinazlar</b>	Jelatinazlar 	27
2			Kolajen tip-I, II, III, IV, V, VII, X, IX, jelatin, elastin, agrekan, laminin, fibronektin, proteoglikan bağlayıcı protein,



## Matrilisinler

Matrilisinler



versikan, nidojen, proteoglikan

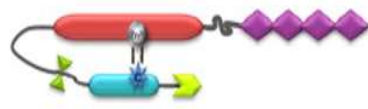
9 Kolajen tip-I, II, III, IV, V, VII, X, IX, jelatin, elastin, agrekan, laminin, fibronektin, proteoglikan bağlayıcı protein

7 Kolajen tip-IV, X, jelatin, agrekan, enaktin, elastin, laminin

26 Kolajen tip-IV, jelatin, fibrinojen, fibronektin, vitronektin

## Furin-Bağlı MMP'ler

Sekrete olan MMP'ler

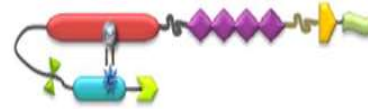


11 Agrekan, fibronektin, laminin

21 -

28 -

Tip I Transmembran MT-MMP'ler



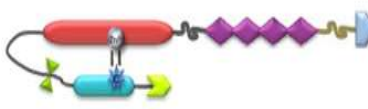
14 Kolajen tip-I, II, III, jelatin, agrekan, fibrin, fibronektin, tenaskin, vitronektin,

15 Kolajen tip-I, jelatin, agrekan, laminin, fibronektin, tenaskin, vitronektin, nidojen

16 Kolajen tip-I, agrekan, laminin, perlekan, fibronektin

24 Jelatin, dermatin sülfat, kondroitin sülfat, N-kadherin, fibrin

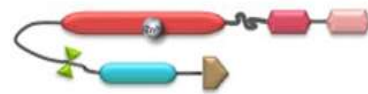
GPI bağlı MMP'ler



17 Jelatin, fibrin

25 Kolajen tip-IV, jelatin

Tip II Transmembran MT-MMP'ler



23 Jelatin

### 2.8.2.1. Arketipik MMP'ler

Arketipik MMP'ler içerisinde bulunan kolajenazlar grubu, MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 proteazlarından oluşur ve substratlar; interstitiyal kolajen tip I, II ve III'tür. Yara iyileşmesi sırasında kolajenazların da içinde bulunduğu birçok MMP'nin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [187]. Geniş substrat tanıma kapasitesine sahip olan MMP-1'in akciğer epitel hücrelerinde sigara dumanı koşullarına karşı hassas olduğu ve bunun ERK1/2-bağlı mekanizma ile gerçekleştiği bulunmuştur [188]. Astımlı hastalardan alınan fibroblastlarda yapılan bir başka çalışmada da artan MMP-1 ifadesine rastlanmış ancak bu durum hastaların FEV ve metakolin değerleri ile uyum göstermemiştir [189]. MMP-8, bazı kemokinler ve serin proteaz inhibitörleri gibi kolajen olmayan substratları kesmeleri ile özelleşmiştir. Nötrofillerin matürasyonu sırasında granüllerden salınarak inflamasyon sürecinde düzenleyici olarak davranır [190]. MMP-8<sup>-/-</sup> farelerde yapılan çalışmada, deride meydana gelen yaranın iyileşmesinin uzun sürdüğü ve inflamatuvar cevabın normale göre daha fazla olduğu bulunmuştur [191]. MMP-13, ekstraselüler matrikste bulunan temel kolajenleri kesmesi nedeniyle tümör gelişimi çalışmalarında incelenmektedir ve meme kanseri oluşumu sırasında ifadesinin artması nedeniyle meme kanser markırı olarak belirlenmiştir [192]. 16HbE140<sup>+</sup> ve NHBE hücrelerinde yapılan çalışmada epitel bariyeri etkileyen poliinosinik:polistidilik asit uyarımı sonrasında epitel hücre kaynaklı MMP-13'ün yara iyileşmesini sınırlayan faktör olduğu bulunmuştur [193].

MMP-3 ve MMP-10 ise stromelisinler grubunu oluşturur ve laminin, fibronektin, elastin kolajen tip II, III, IV ve V moleküllerini tanırlar. MMP-3, inaktif haldeki kolajenazları (pro-MMP-1, pro-MMP-8 ve pro-MMP-13) ve pro-MMP-9'u tanıyarak ve pro bölgelerini keserek aktif hale getirir [194, 195]. Pro-IL-1 $\beta$  sitokini ve sıkı bağlantı moleküllerinden olan E-kadherinler üzerinde de etkilidir. MMP-3<sup>-/-</sup> fareler kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda MMP-3'ün LPS-etkili kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini düzenleyerek nötrofil ve monositlerin inflamasyon bölgesine geçmesini sağladığı bulunmuştur [196]. MMP-10, Huntington Hastalığı'nda etkili olan Huntingtin proteinini (HTT) substrat olarak tanıması özelliği ile öne çıkmaktadır ve yapılan çalışmalar kısıtlıdır [197]. Stromelisinlerle benzer yapısal özellikleri taşıyan MMP-11, stromelisin-3 olarak da adlandırılmasına rağmen moleküler özellikleri bakımından furin-bağlı MMP'ler grubunda bulunmaktadır.

MMP-12, -19, -20 ve -27, sahip oldukları protein sekansı ve substrat özellikler nedeniyle herhangi bir alt gruba dahil edilememişlerdir. MMP-12, sıklıkla makrofaj ve epitel hücrelerde ifade olduğu görülmekte ve elastolitik enzim olarak bilinmektedir. Moleküler yapısı itibari ile hücre membranına tutunmasını sağlayacak bir kısma sahip değildir ancak hem pro-MMP-12'nin hem de aktif haldeki MMP-12'nin membrana tutunarak hücre içine girdiği HeLa hücrelerinde gösterilmiştir [198, 199]. Makrofaj kaynaklı MMP-12'nin enfekte edilmemiş HeLa ve 1HAEo<sup>-</sup> insan akciğer hücrelerinin içinde çekirdeğe girerek DNA üzerinde proteozom aktivatör kompleks altbirim 3 (PSME3)'e tutunduğu gösterilmiştir [200]. Makrofaj kaynaklı bir proteaz olması nedeniyle literatürde sıklıkla enfeksiyon ilişkili çalışmalara rastlanmaktadır. MMP-12 eksik farelerde yapılan çalışmada bakteriyel enfeksiyon sonrasında akciğer hücrelerinde ölüm görülmesi, makrofajların antibakteriyel etkisinde MMP-12'nin rolü olduğunu göstermektedir [201]. MMP-19, fraktalkin olarak adlandırılan ve epitelyal hasara neden olan dekstran sülfat sodyum (DSS) etkisini engelleyen CX3CL1 kemokinini de tanır. MMP-19-eksik farelerde yapılan çalışmada, fraktalkin kemokininin aktif hale getirilmemesi, nötrofil ve makrofaj üzerinde bulunan CX3CL1 reseptörünün boş kalmasına ve immün hücrelerin etkinliğinin azalmasına neden olmuştur [202]. MMP-20, diş oluşumu sırasında dental papilanın ameloblast ve odontoblastlarında ifade olur ve ilk olarak domuz dental organında bulunmuştur. MMP-27 ise tavuk embriyosunda tespit edilmiş ve jelatin ve kazeini substrat olarak kullandığı bulunmuştur. İnsan B-lenfositlerinde yüksek oranda bulunan MMP-27 hakkında literatür bilgileri kısıtlıdır [168].

### **2.8.2.2. Matrilisinler**

Matrilisinler, C-terminal hemopeksin bölgeleri olmamaları nedeniyle moleküler olarak daha basit bir yapıya sahiptirler. Laminin, fibronektin, tip IV kolajen, elastin entaktin gibi ESM moleküllerinin kesimini gerçekleştirirler. Bazı durumlarda kazein ve jelatini de tanıdıkları bulunmuştur [203].

Akciğer, bağırsak, böbrek ve kornea gibi epitel hücrelerden oluşan mukozal yapıya sahip dokularda özellikle de hasar durumunda ifadesi artan MMP-7, epitel hücre dokusunun yeniden oluşması (re-epitelizasyon) aşamasında etkilidir [204]. Epitel hücre yüzeyinde bulunan sindekan-1 ve e-kadherin moleküllerini tanıyıp proteolitik etkisini

gerçekleştirmesi ve bunun sonucunda hasarlı hücrelerin uzaklaştırılıp hücre göçünün meydana gelmesi, re-epitelizasyon araştırmalarında MMP-7'nin rolüne dair bulunan önemli sonuçlardandır [205, 206]. Ayrıca dokuda meydana gelen hasar sonucunda ortamdaki CXCL1(IL-8) kemokini ile baē kuran sindekan-1 molekülünün MMP-7 tarafından kesimi, nötrofillerin hasarlı dokuya geçişini kolaylaştırmaktadır [181]. Tümör gelişimi sırasında ESM moleküllerinin üzerinde olan etkisini arttırarak normalden fazla molekülün kesimine neden olur. Bu durum, hücrelerden pro-MMP-2 ve pro-MMP-9 salınımıyla ve tümör gelişimi için uygun ortamın hazırlanmasıyla sonuçlanır [207].

MMP-26'nın, insanlarda uterus, plasenta, böbrek, gastrointestinal bölge ve epitelyal kornea bölgelerinde görülen kanserli dokularda ifade olduēu bulunmuştur [208-210]. Sahip olduēu farklı moleküler yapısı ile diēer MMP'lerden ayrılır. Linker ve hemopeksin benzeri bölgesi bulunmayan MMP-26, pro-enzim halinin düzenlenmesinde etkili olan sistein bölgesine de sahip deēildir [211].

### **2.8.2.3. Jelatinazlar**

Denatüre olmuş kolajenler olarak da bilinen jelatinler, MMP-2 ve MMP-9 tarafından substrat olarak tanınır ve kesilirler. Moleküler yapılarında sahip oldukları kolajen baēlayıcı bölge (CBD) ile substratları üzerinde etkileri artmış olur. Fibroblastlarda lipoprotein reseptör-ilişkili protein-1'in düşük seviyede olması, MMP-2 ve MMP-9'un düzenlenmesinde etkilidir ve aynı zamanda ekstraselüler matrikste bulunmalarına raēmen endositoz mekanizması ile hücre içine geri dönmelerinde de rolü olduēu gösterilmiştir [212, 213]. Solli ve ark. yaptıēı çalışmada bu durum göz önüne alınarak akciēer hücrelerinin de dahil olduēu birçok farklı dokuda zimografi yöntemi kullanılarak MMP-2'nin konumu belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre hepatosit, böbrek tübül hücreleri, kardiyak miyositler ve aēız epitel hücrelerinde MMP-2'nin hem hücre içinde hem de hücre dışında olduēu bulunmuştur [214]. MMP-9 ise fare lökositlerinde ve insan nöroblastoma hücrelerinde tespit edilmiştir ancak hücre içine nasıl ulařtıēı tam olarak açıklanamamıştır [215, 216]. Jelatinazlar, re-epitalizasyon ve hücre göçü çalışmalarıında en sık araştırılan proteazlardır.

MMP-2, tümör gelişiminin erken fazlarında tespit edilmesi nedeniyle genellikle tümör oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Meme kanseri, özafagus kanseri ve beyin kanseri çalışmalarında incelenen MMP-2'nin tümör yayılmasında önemli bir rolü olduğu ve bu nedenle yayılmacı tümörlerde ifadesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [217, 218]. Kanserli mide hücre hattı olan SNU-5 ile yapılan çalışmada VEGF (Vasküler endotel büyüme faktörü)'nin ifadesinde görülen değişikliklerin MMP-2 seviyesi ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur [219]. Aktivatör protein-1 transkripsiyon bölgelerinin eksik olması nedeniyle birçok pro-inflamatuar molekül, MMP-2'nin ifade seviyesini etkileyememektedir [220]. Fare modellerinde yapılan bir çalışmada *Staphylococcus aureus* kaynaklı enfeksiyon durumunda MMP-2 aktivitesinin durdurulması, pro-inflamatuar süreçte rol oynayan TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve IL-6 sitokinlerinin de ifadesinde düşüşe neden olmuştur [221].

Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarda tespit edilen MMP-9, inflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [222, 223]. Başta makrofaj ve nötrofil olmak üzere, epitel hücre, mast hücre ve fibroblastlar tarafından ifade edilebilir. Akciğer inflamasyonu ve doku hasarında gen ifadesinin arttığı tespit edilen MMP-9, KOAH, anfizem, pulmoner fibrosis ve astım gibi havayolu hastalıklarının erken teşhisinde belirteç olarak kullanılmaktadır [224-226]. Yaşları 6 ile 14 arasında değişen astımlı çocuklarda yapılan bir çalışmada, hastalardan alınan tükürük, kan ve bronkoalveolar sıvılarda MMP-9 ifadesinin astımın şiddetine göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. MMP-9 ile ilişkili olan IL-8 ve inhibitörü olan TIMP-1 seviyelerinin de artış bulunmuştur [227].

#### **2.8.2.4. Furin-Bağlı MMP'ler**

Furin-bağlı MMP'ler, sahip oldukları pro bölgelerini endopeptidaz olan furin molekülünün bağlanması ile kaybederler ve bunun sonucunda aktifleşirler. Furin tanıma bölgelerinin yanında yapılarında sahip oldukları farklı bölgeler ile kendi aralarında ayrılırlar.

Sekrete-olan MMP'ler olarak adlandırılan grupta MMP-11, MMP-21 ve MMP-28 proteazları bulunur. MMP-11 insanlarda en fazla plasenta, uterus ve meme dokusunda

görülür. Tümör gelişimi, inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda ifade olduğu tespit edilmiştir. Embriyogenezin farklı aşamalarında ifade olduğu bilinen MMP-21 hakkında kapsamlı araştırma bulunmamaktadır. MMP-28, en son bulunan MMP olup akciğer, beyin, kalp gibi dokularda sağlıklı bireylerde ifade olduğu bulunmuştur. E-kadherin molekülünün hücrede azalması MMP-28-etkili-EMT'nin görülmesinde etkilidir [228]. İnflamatuar süreçte etkili olan makrofajların, hem *P. aeruginosa* ile hem de bleomisin ile gerçekleştirilen epitel hasarı sonrasında MMP-28 etkisi ile M2 fenotipe dönüştüğü bulunmuştur [229].

MMP'ler genellikle ekstraselüler matrikste serbest halde bulunmasına rağmen MT-MMP'ler C-terminal bölgelerinde sahip oldukları zengin hidrofobik alan ile hücre membranına tutunurlar. Moleküler yapılarına göre ikiye ayrılırlar. Tip-I Transmembran MT-MMP'ler uzun hidrofobik kısımlarının devamında sitoplazmik bir kuyruğa sahiptir. MMP-14, tanıdığı kolajen, fibronektin ve laminin gibi ESM elemanlarının yanında CD44, transglutaminaz ve sindekan-1 gibi molekülleri tanıyarak hücre gelişim aşamalarının düzenlenmesinde rol oynar. Fareler üzerinde yapılan bir çalışma ile MMP-14'ün, akut havayolu hasarı sonrasında bronş epitel hasarının iyileşmesi ve epitel hücre çoğalmasında etkili olduğu gösterilmiştir [230]. MMP-14-eksik fare modelinde yapılan çalışma sonucunda inflamatuvar sürecin negatif düzenleyicisi olduğu ve MMP-2 aktivasyonunu düzenleyerek de bağışıklık sistemi hücrelerinin ortama gelmesini sağlayan alarmin seviyesini kontrol ettiği tespit edilmiştir [231].

MMP-15 (MT1-MMP), ilk olarak farelerde tespit edilmiştir ve insanlarda da hamileliğin ilk 3 ayında plasentada ifade olduğu gösterilmiştir. Kanseri çalışmaları MT1-MMP etkisini negatif yönde MMP-2 aktivasyonunu ise pozitif yönde kontrol ettiği bulunmuştur [232]. MMP-16, MT1-MMP ile benzer substratları tanıyarak proteolitik aktivite gösterir. Ancak sindekan-1 molekülü üzerinde kendi başına etkili olamayan MMP-16, MMP-14 ile bu molekülü kesebilir. Yapılan çalışmalarda TIMP-3'ün bu proteaz için asıl inhibitör olduğu bulunmuştur [233]. MMP-24, ekstraselüler matrikse bulunan proteoglikan ve jelatin substratlarını tanımaktadırlar. Sıklıkla merkezi sinir sisteminde ve beyin gelişimi sırasında ifadesinin arttırıldığı tespit edilmiştir. *In vivo* koşullarda pro-MMP-2'yi aktif hale getirdiği bulunmuştur ancak bu mekanizma tam olarak açıklanmamıştır [234, 235].

Glikozilfosfatidilinositol (GPI)-tip MT-MMP'ler, hidrofobik kısımlarında bulunan GPI molekülü ile hücreye tutunur. MT4-MMP, eozinofil, monosit ve lenfosit gibi immün sistem hücrelerinde ifade olması nedeniyle lökolinin olarak da anılmaktadır. Pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1 ve IL-8 sitokinlerinden sonra ifadesi artmakta ve lökositlerden salınan TNF- $\alpha$  molekülünü düzenlemektedir [236]. 550'ye yakın astımlı ve KOAH'lı hastalarda yapılan bir çalışmada hastalardan alınan serumlarda MMP-25 seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [237]. Bu sonuç, MMP-25'in akciğer inflamasyon hastalıklarının markırı olarak kabul görmesinde etkili olmuştur.

Tip-II Transmembran MT-MMP'ler, terminal bölgelerinde sahip oldukları bir kanca ile integral membrana tutunabilmektedirler. Üzerlerinde gerçekleşen tek bir kesim sonrasında hem sekrete edilirler hem de aktivasyon göstermeye başlarlar [238]. MMP-23'ün üreme organları olan yumurtalık, prostat ve testis gibi bölgelerde ifade olmasının sonucu olarak üreme süreci ile ilişkilendirilmiştir [239].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan BEAS-2B (insan sağlıklı bronş epitel) hücre hattı American Type Cultural Collection (katalog numarası CRL-9609, ABD) firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan BEBM bronş epitel hücre büyüme ortamı, Tripsin/EDTA çözeltisi, tripsin nötralizasyon çözeltisi ve penisilin/streptomisin çözeltisi Lonza (İsviçre), DMEM ortamı Gibco (ABD) ve retinoik asit çözeltisi Sigma (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Bronş epitel hücrelerin uyarımı için kullanılan Der p 1 alerjeni Indoor Biotechnologies (katalog no: LTN-DP1-1, ABD), Der p 2 alerjeni Citeq (katalog no:02.01.72, Hollanda) ve Der p 6 alerjeni MyBioSource (katalog no: MBS1061377, ABD) firmalarından satın alınmıştır. Farklılaştırma için kullanılan 6.5 mm 0,4 µm çaplı pora sahip transwell malzemesi Corning (ABD) firmasından alınmıştır. Hücre canlılığının tespiti için kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür) Sigma (ABD) ve Etidyum bromür/kalsein boyası BioVision (ABD) firmalarından temin edilmiştir.

Hücrelerden RNA elde etmek için kullanılan RNA izolasyon kiti Qiagen (Almanya), komplementer DNA (cDNA) sentezi ve gerçek zamanlı PZR deneyleri için kullanılan kitler Thermo Fisher (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR deneylerinin analizleri boyunca Applied Biosystems marka 7500 Fast RT-PCR cihazı kullanılmıştır.

Protein deneyleri sırasında kullanılan Human MMP-2 ELISA kiti (Katalog No: DY902) ile Human MMP-9 ELISA Kiti (Katalog No: DY911) R&D (ABD) ve Human MMP-12 ELISA Kiti (Katalog No: DDXK-E-MMP12-1) Novus Biologicals (İngiltere) firmalarından satın alınmıştır. ELISA analizleri için Perkin Elmer firmasının (ABD) Multimode Plate Reader cihazı kullanılmıştır.



## **3.2. Hücre Kültürü Deneyleri**

### **3.2.1. BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması**

Hücre kültürü deneyleri sırasında sağlıklı bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B) kullanılmıştır. 75 cm<sup>2</sup> lik flasklarda çoğaltılmıştır. Bronş epitel büyüme besiyerinde (BEGM) (hidrokortizon (0,5 mg/mL), insülin (5 mg/mL), transferrin (10 mg/mL), epinefrin (0,5 mg/mL), triiodotironin (6,5 mg/mL), gentamisin (50 mg/mL), amfoterisin-B (50 mg/ mL), retinoik asit (0,1 ng/mL), EFG (epidermal growth factor, 0,5 ng/mL human recombinant), 100 U/mL penisilin, 5% FBS, 100 µg/mL streptomisin içeren) 2-3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Hücrelerin flaskı kaplama oranı %70-80'e ulaştığında tripsinize edilmiştir.

### **3.2.2. Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri**

#### **3.2.2.1 Canlı/Ölü Hücrelerin Boyanması**

Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenlerinin farklı konsantrasyonları ile uyarılan bronş epitel hücrelerinde canlı/ölü hücre boyaması etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM boya ile yapılmıştır. Flaskta büyütülen hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra hücre canlılığı deneyleri için  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Ertesi gün Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenleri ile belirlenen konsantrasyonlarda uyarılmıştır;

- Der p 1 için 2, 5 ve 10 µg/mL
- Der p 2 için 2, 5, 10, 20 ve 40 µg/mL
- Der p 6 için 2, 5, 10, 20 ve 40 µg/mL

24 saat sonunda 1 ml PBS içinde 0,5 µl kalsein-AM ve 2 µl etidyum homodimer-1 karıştırılarak her kuyuya 50 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra kırmızı ve yeşil ışık dalgalarında (Ex/Em = 485-495/530-635 nm) floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Canlı hücreler yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte görüntülenmiştir.

#### **3.2.2.2. Sitotoksosite Deneyleri**

Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki alerjenler ile uyarımı sonrasında hücrelerdeki sitotoksosite ölçümü MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil

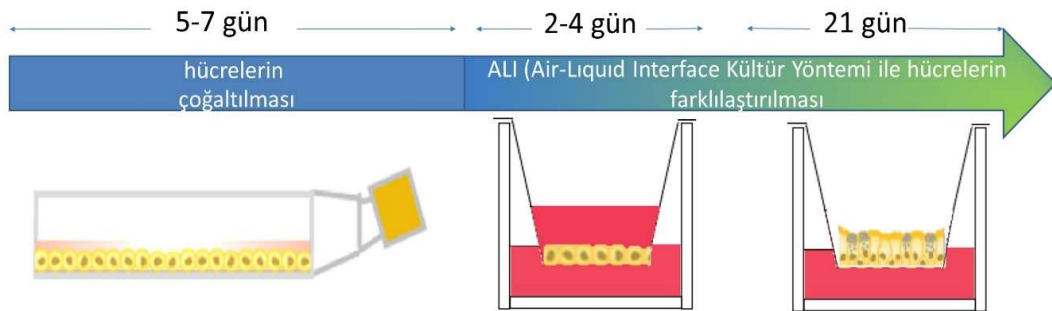
tetrazolyum bromit) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile canlı hücre oranı nicel olarak kolorimetrik yöntem kullanılarak saptanmıştır. Tripsin ile kaldırılan hücreler  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saat sonra Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenleri belirlenen miktarlarda hücre besiyerine eklenerek 24 saat boyunca uyarılmıştır;

- Der p 1 için 2, 5 ve 10  $\mu\text{g/mL}$
- Der p 2 için 2, 5, 10, 20 ve 40  $\mu\text{g/mL}$
- Der p 6 için 2, 5, 10, 20 ve 40  $\mu\text{g/mL}$

Süre sonunda besiyeri değiştirilmiş ve 10  $\mu\text{L}$  MTT solusyonu (5  $\text{mg/mL}$ ) plakadaki her kuyucuğa eklenmiştir.  $37^\circ\text{C}$ 'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri ve MTT karışımı alınmıştır. Kuyucuklarda bulunan formazan kristali 50  $\mu\text{L}$  DMSO eklenerek çözülmüş ve plaka 30 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Çözünen formazan kristallerinin yoğunluğu 550 nm'de ELISA okuyucuda ölçülmüştür.

### 3.2.3. Bronş Epitel Hücrelerin Air-Liquid Interface (ALI) Yöntemi ile Farklılaştırılması

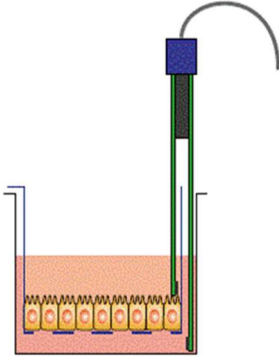
Tripsin ile kaldırılan bronş epitel hücreleri farklılaştırma için  $1.5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 0,4  $\mu\text{m}$  porları olan transwell üzerine ekilmiştir. Hücreler başlangıçta tamamen kaplayıncaya kadar BEGM besiyeri içerisinde çoğaltılmıştır. Hücreler transwelli kapladığında üst besiyerleri uzaklaştırılarak transwellin alt kısmına 25  $\mu\text{M}$  retinoik asit içeren 1:1 oranında BEGM:DMEM besiyeri konulmuştur. 21 gün süreyle hücreler  $37^\circ\text{C}$  'de %5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübe edilmiş ve transwell in alt kısmındaki besiyeri 2 günde bir değiştirilmiştir. 7 günde bir TEER (Transepitelyal Elektriksel Rezistans) ölçümü gerçekleştirilmiş ve değeri 100 Ohm üzerinde olan hücreler, deneyde kullanılmıştır. Farklılaştırılan hücreler alerjen ile uyarılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. ALI-kültür yöntemi ile hücrelerin farklılaştırılması

### 3.2.4. Transeptilyal Elektriksel Rezistans (TEER) Ölçümü

Millicell ERS-2 voltohmmetre kullanılarak Transeptilyal Elektriksel Rezistans ölçülmüştür. Ölçümden önce besiyeri ve PBS, su banyosunda 37 °C'ye ısıtılmıştır. Transwell insertine ekilmiş olan hücrelerin üstüne PBS eklenmiş ve 5 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiştir. TEER ölçüm cihazının kısa ucu üst çemberdeki, uzun ucu ise alt çemberdeki sıvı içerisine yerleştirilerek iki çember arasındaki elektriksel fark belirlenmiştir. Ölçüm sonrasında üst çember içinde bulunan PBS uzaklaştırılmış ve alt kısmına yeni besiyeri eklenerek etüve kaldırılmıştır.

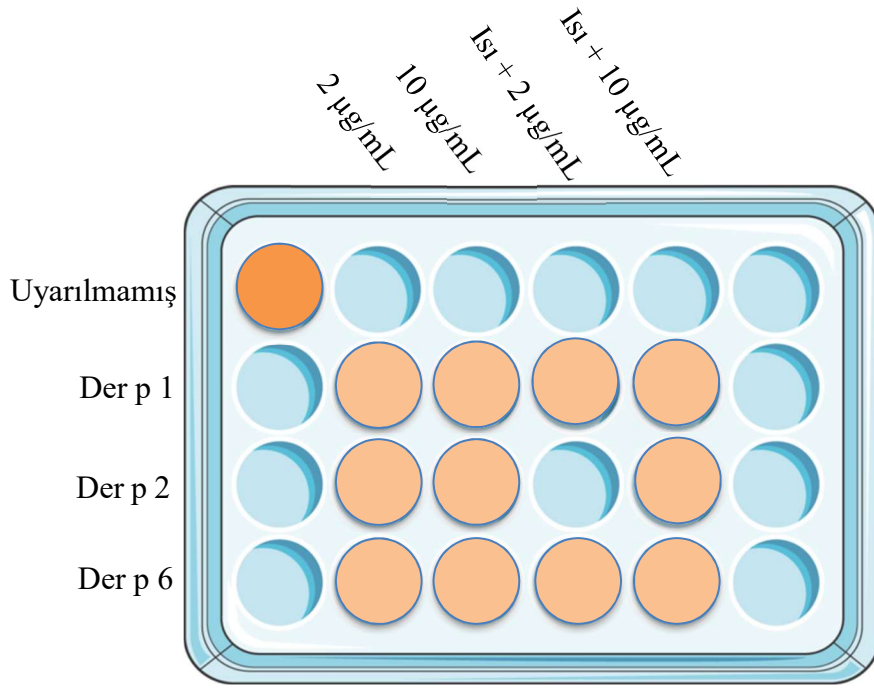


Şekil 3.2. Millicell ERS-2 TER ölçüm cihazı ve ölçüm yöntemi

### 3.2.5. BEAS-2B Hücrelerinin Alerjenler ile Uyarılması ve Koşulların Belirlenmesi

Proteaz ile uyarım için *Dermatophagoides pteronyssinus* kaynaklı sistein proteaz özellikteki Der p 1, proteaz özelliği olmayan Der p 2 ve serin proteaz özellikteki Der p 6 alerjenleri kullanılmıştır. Transwell içinde 21 günlük farklılaştırma süresi biten BEAS-2B hücreleri, hücre canlılık ve sitotoksisite deneylerinin sonuçlarına bağlı olarak 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonda alerjenler ile 24 saat boyunca uyarılmıştır.

Alerjenlerin proteaz aktivitesi dışındaki yapısal etkilerini görmek amacıyla protein yapıları ısı ile denatüre edilemiştir. Denatürasyon sonucunda alerjen proteazların epitel hücre üzerine etkileri incelenmiştir. Bunun için Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenleri 95°C'ta 5 dakika tutulmuştur. Belirlenen bu süre literatürdeki yayınlara göre belirlenmiştir [240]. Deney koşulları Şekil 3.3'te gösterilmiştir:



**Şekil 3.3.** Deney koşullarının gösterilmesi; U: Uyarılmamış koşul

Uyarım sonucunda gerçek zamanlı PZR (q-PCR) çalışmaları için RNA izolasyonu yapılırken, supernatanlar ise ELISA deneyleri için alikotlanarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'e kaldırılmıştır.

### 3.3. RNA İzolasyonu

Hücreler, %1  $\beta$ -Merkaptoetanol ilave edilmiş 300  $\mu\text{L}$  Lizis tamponu ile pipetle çekip bırakmak suretiyle parçalanmıştır. Üzerine eşit miktarda steril DEPC su ile sulandırılmış %70 etanol ilave edilmiş ve 2 mL'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan kolon üzerine pipetlenmiştir. Tüpler 10.000 rpm'de 15s santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı atılmıştır ve kolon üzerine 700  $\mu\text{L}$  Wash Buffer I (yıkama tamponu) ilave edilmiştir. Tüpler 10.000 rpm de 15 s santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer II (yıkama tamponu II) solüsyonu ilave edilmiştir. 10.000 rpm'de 15s santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış ve üzerine yine 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer II solüsyonu ilave edilmiştir. Tüpler 12000 rpm de 15 s santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış ve üzerine hiçbir şey ilave edilmeden yine 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon steril 1.5 mL ependorf tüp üzerine alınmış ve üzerine 50  $\mu\text{L}$  RNaz içermeyen su ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler 12000 rpm de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen

örneklerdeki RNA miktarı spektrofotometre ile ölçülmüş ve kullanılıncaya kadar -80 °C’ de saklanmıştır.

### **3.4. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi**

Prosedür, 1 µg ila 5 µg toplam RNA veya 1 µg ila 500 ng poli (A) + RNA'nın tek iplikçikli cDNA'ya dönüştürülmesi için tasarlanmıştır. cDNA aşamasında daha spesifik bir sentez gerçekleştirilmesi amacıyla oligo (dT)18 primer kullanılmıştır. Kullanmadan önce her bileşen karıştırılmış ve santrifüjlenmiştir. 0,2' mL 'lik PCR tüplerine 1 µL Oligo (dT)18 Primer (100 µM) eklenmiştir. Toplam hacmi 12 µL'ye tamamlamak için konsantrasyonu 1µg olan total RNA'dan hesaplanan miktarda eklenmiştir. Üzerine toplam miktarı 12µl ye tamamlayacak kadar ddH<sub>2</sub>O ilave edilmiştir. 65 °C'de 5 dakika PCR' da inkübe edilmiş, ardından 1 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Ardından 4 µL 5x Reaction Buffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL 10 mM dNTP Mix, 1 µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) eklenmiştir. Her RNA / primer karışımına 8 µL cDNA sentez karışımı eklenmiş, hafifçe karıştırılmıştır. Sonra 42 °C'de 60 dakika PZR'de inkübe edilmiştir. Böylece elde edilen cDNA'lar gerçek zamanlı PZR'de kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

### **3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş örneklerde MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR yöntemi ile ifadelerine bakılmıştır. Gerçek zamanlı PZR de kullanılacak MMP-2, -9 ve -12 primerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. İnternal kontrol olarak Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) kullanılmıştır. Reaksiyon için kullanılan malzemeler ve polimeraz zincir reaksiyon koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilen primer dizileri

	İLERİ PRİMER	TERS PRİMER
PPIA	TCTTTCACCTTTGCCAAACACC	CATCCTAAAGCATACGGGTCC
MMP-2	TTGACGGTAAGGACGGACTC	CTTGCAGTACTCCCCATCG
MMP-9	ACATCGTCATCCAGTTTGGTG	CGTCGAAATGGGCGTCT
MMP-12	ACTACACATTCAGGAGGCACA	CAGGGACTGAATGCCACGTA

Çizelge 3.2. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon ve döngü koşulları; \* : Aşama, 35 döngüde tamamlanmıştır

	Malzeme	Miktarı	
<b>Reaksiyon Koşulları</b>	2X SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µL	
	İleri Primer (10 µM)	0,1 µL	
	Ters Primer (10 µM)	0,1 µL	
	Kalıp (50 ng)	1 µL	
	Nükleazsız su	11,5 µL	
	Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre
<b>Döngü Koşulları</b>	Isıyla aktivasyon	95 °C	5 dk
	Denaturasyon *	95 °C	10 s
	Primer yapışma/uzama *	60 °C	30 s

### 3.6. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

RNA izolasyonu öncesi her bir örnekten supernatanlar toplanmış ve hücre dışına salınmış olan MMP-2, MMP-9 ve MMP-12'nin ölçümü ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Kitlerin hassasiyet aralıkları Human MMP-2 için 0,625-20 ng/mL, Human MMP-9 için 31,2-2000

pg/mL ve Human MMP-12 için 8-1000 ng/mL olarak belirtilmiştir. Deneilerin optimizasyonu sırasında elde edilen standart grafiklere göre gerekli sulandırmalar yapılmıştır. Ölçümler için kitlerin kendi protokolleri uygulanmış olup ilgili protokol aşağıda belirtilmiştir.

#### **Plaka Hazırlanması:**

- 1- Her bir kit için kendi yakalama antikoru (capture antibody) kitlerde belirtilen çalışma konsantrasyonunda kit içerisinde gelen PBS ile seyreltilip 96-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Oda sıcaklığında gece boyu inkübe edilmiştir.
- 2- Her bir kuyucuk aspire edilip kuyucuk başına 400 µL olacak şekilde yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuk içindeki bütün sıvı her yıkama sonunda tamamen uzaklaştırılmıştır.
- 3- Kuyucuk başına 300 µL olacak şekilde ayıraç seyreltme tamponu (reagent diluent) eklenmiştir ve en az 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübe edilerek plakalar bloklanmıştır.
- 4- 2. aşamadaki yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

#### **Deney Protokolü:**

- 1- Uygun miktarlarda seyreltilen standart ve örneklerden kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Plaka kit içerisinde gelen yapışkan bant ile kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 2- Her bir kuyucuk aspire edilip kuyucuk başına 400 µL olacak şekilde yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuk içindeki bütün sıvı her yıkama sonunda tamamen uzaklaştırılmıştır.
- 3- Her bir kit için kendi belirleyici antikoru (detection antibody) kitlerde belirtilen çalışma konsantrasyonunda kit içerisinde gelen Reagent Diluent ile seyreltilip 96-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Plaka yeni bir yapışkan bant ile kapatılarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 4- 2. aşamadaki yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

- 5- Kit içerisinde gelen Streptavidin-HRP çalışma konsantrasyonunda seyreltilerek kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Plaka kapatılarak oda sıcaklığında karanlıkta 20 dakika inkübe edilmiştir.
- 6- 2. aşamadaki yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
- 7- Kit içerisinde gelen Color Reagent A ve Color Reagent B eşit hacimde karıştırılarak taze olarak hazırlanan substrat solüsyonu kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. 20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir.
- 8- Kit içerisinde gelen durdurma solüsyonu (stop solution) kuyucuk başına 50 µL olacak şekilde paylaştırılıp plakaya nazikçe vurularak iyice karışması sağlanmıştır.
- 9- 450 nm ve 540 nm'ye ayarlanmış mikroparka okuyucu kullanılarak optik yoğunluk (optical density – O.D.) ölçümü gerçekleştirilmiştir. Spesifik olmayan okumaları uzaklaştırmak ve optik hataları düzeltmek amacı ile 540 nm'de elde edilen okumalar, 450 nm'deki okumalardan çıkarılmıştır.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Tez çalışmasında tüm istatistiksel analizler Graph Pad Prism 7.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler,  $\pm$  ortalama standart hata ile gösterilmiştir. Genler arasındaki ifade farklılıklarını tespit etmek amacıyla Kruskal Wallis Test uygulanmış devamında post hoc analizleri yapılmıştır.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasının ilk aşamasında bronş epitel hücreleri artan konsantrasyonlarda Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenleri ile uyarılmıştır. Bu uyarım sonucunda alerjenlerin hücre canlılığı ve sitotoksosite üzerine olan etkileri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücrelere uygulanacak olan uygun konsantrasyon belirlenmiştir. Bronş epitel hücreleri 21 gün süre boyunca ALI kültür tekniği ile farklılaştırılmış ve uygun konsantrasyondaki alerjenler ile uyarılmıştır. Ayrıca, buna ek olarak hücreler ısı ile denatüre edilmiş alerjen ile de uyarılmıştır. Hücrelerin uyarımı sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve hücre süpernatantları daha sonra kullanılmak üzere alikotlanarak -80°C de saklanmıştır. Tezin ikinci aşamasında hücrelerden elde edilen RNA'lar komplementer DNA'ya çevrilmiştir. Bu deney sonrasında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneyleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar verilmiştir. MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 gen ifadelerinden alınan sonuçlar açıklanmış ve değerlendirilmiştir. Tezin son kısmında ise MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 ifadelerini protein düzeyinde incelemek için hücrelerden alınan supernatantlar ELISA deneyi için kullanılmış ve hücre dışında bulunan MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 proteazlarının değerleri verilmiştir. Sonuçlar hücrelerin gen ifadeleri ile karşılaştırılmış ve yorumlanmıştır.

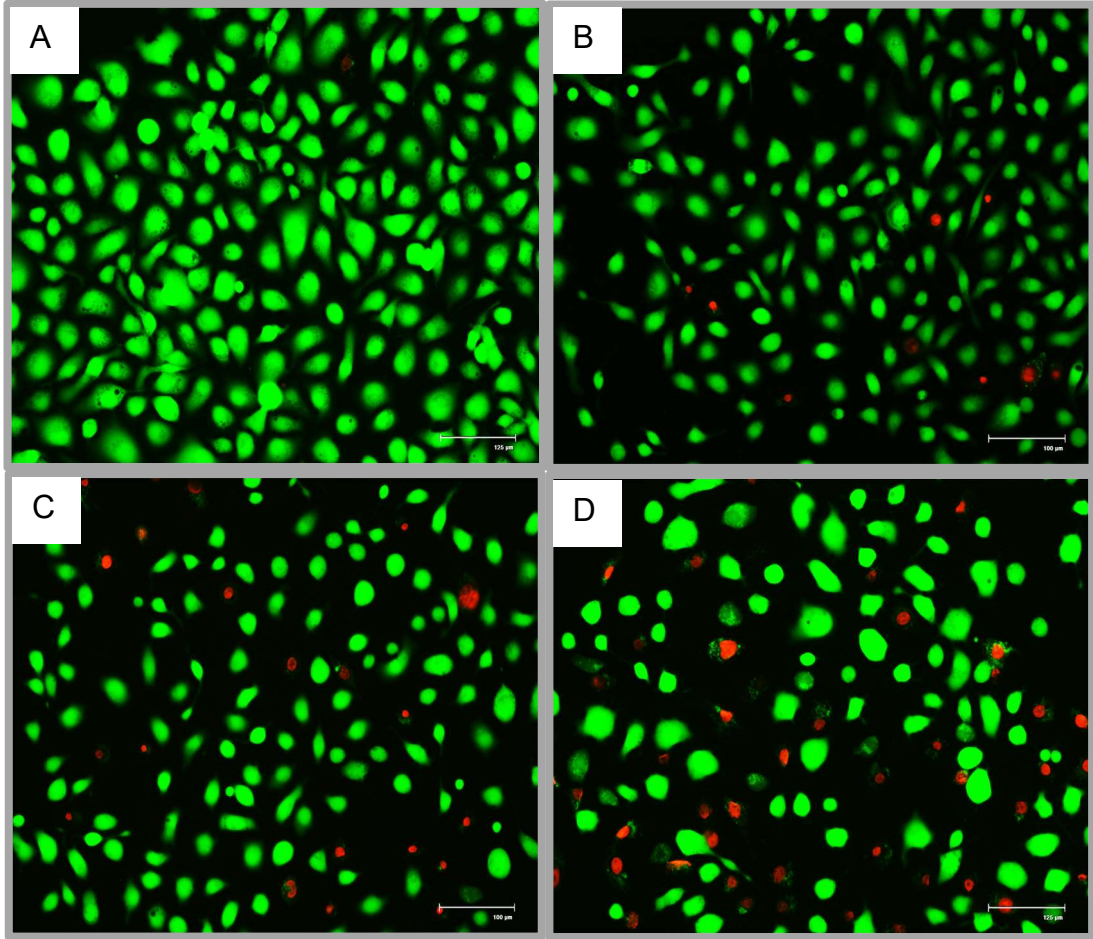
### 4.1. Bronş Epitel Hücrelerinde Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 Alerjeni ile Uyarımın Hücre Canlılığına ve Sitotoksositeye Etkisi

Bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücrelerinin sistein proteaz özellikteki Der p 1, proteaz özelliğe sahip olmayan Der p 2 ve serin proteaz özellikteki Der p 6 ile artan konsantrasyonlarda uyarımı sonrasında, hücre canlılığı etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM floresan boyma ile incelenmiştir. Sitotoksosite analizi ise MTT deneyi ile gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.1. Alerjen uyarımı sonrasında Canlı ve Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Bronş epitel hücrelerin Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenlerinin artan konsantrasyonlarında uyarımı sonrasında canlı/ölü hücre boyaması gerçekleştirilmiştir.

Hücreler Der p 1 alerjeninin 2 µg/mL, 5 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonları ile 24 saat uyarılmıştır. Uyarım sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.1’de verilmiştir.

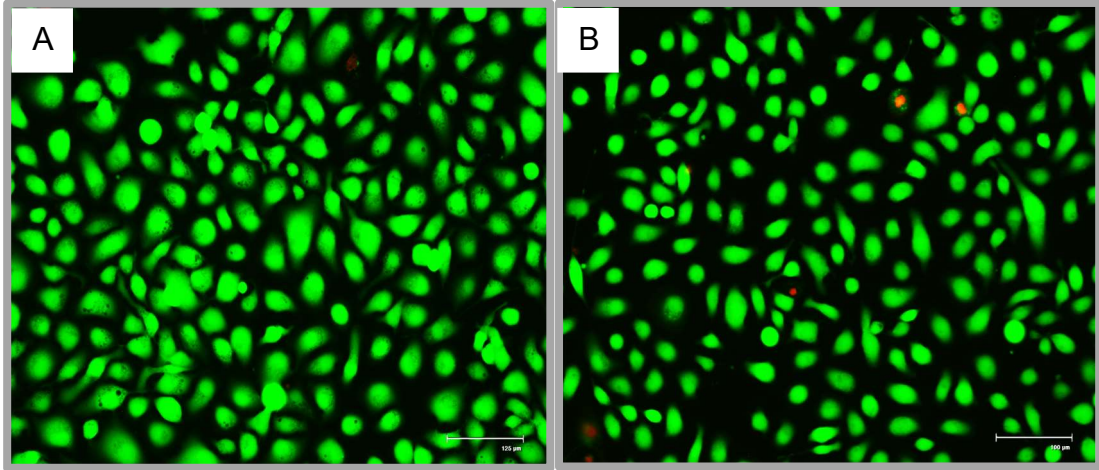


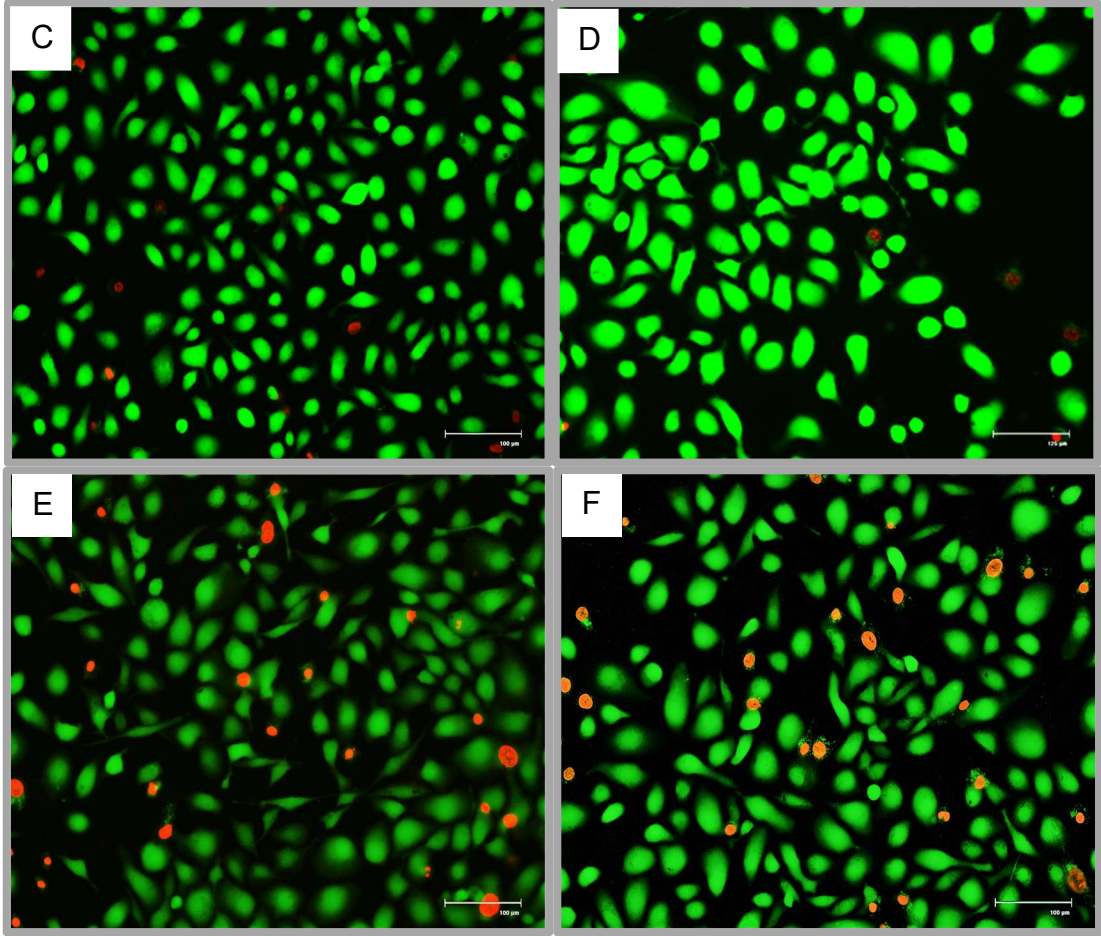
Şekil 4.1. Der p 1 alerjeni ile uyarılmamış koşulda (A) ve 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C) ve 10 µg/mL (D) konsantrasyonda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil) /ölü (kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 100 µm

Alerjenle uyarılan hücreler uyarılmamış hücreler ile karşılaştırıldığında ölü hücre sayısında konsantrasyonla doğru orantılı bir artma tespit edilmiştir. Uyarılmamış koşuldaki hücrelerin yoğunluğu fazla ve canlı olarak görünürken Der p 1 ile uyarılan diğer koşullarda konsantrasyona bağlı olarak ölen ve tutunmayan hücreler, yıkama aşamasında alınmıştır. Bu nedenle kuyucuktaki hücreler azalmış ve uyarılmamış hücrelere kıyasla daha seyrek bir görüntü elde edilmiştir. Der p 1 alerjeni sahip olduğu sistein proteaz özelliği nedeniyle epitel hücrelerde bulunan okludin ve E-cadherin gibi sıkı bağlantı moleküllerini etkiler ve hücreler arasındaki bağlantıların zayıflamasına neden olur [241].

Meydana gelen bu durum epitel hücre harabiyetine yol açmaktadır. Ayrıca Der p 1'in hücre yüzeyinde bulunan PAR aracılığı ile de epitelyal hasara yol açtığı bilinmektedir [121, 242]. Literatürde Der p 1 alerjeninin uygun konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda 1 µg/mL konsantrasyonda etkisinin olmadığı, 10 µg/mL'de hücre büzüşmesinin görüldüğü ve daha yüksek konsantrasyonlarda da hücrelerin öldüğü gösterilmiştir [243]. Laboratuvarımızın Der p1 alerjen proteaz ve bronş epitel hücrelerle ilgili deneyim ve çalışmaları literatürde vardır [244, 245]. Der p1 konsantrasyonunu belirlemede önceki deney sonuçlarımız ve literatür bilgileri göz önünde tutularak konsantrasyona karar verilmiştir.

Proteaz özelliğe sahip olmayan Der p 2 alerjeninin 2, 5, 10, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonları ile bronş epitel hücreler uyarılmıştır. Elde edilen görüntüleme sonuçları Şekil 4.2.'de verilmiştir.



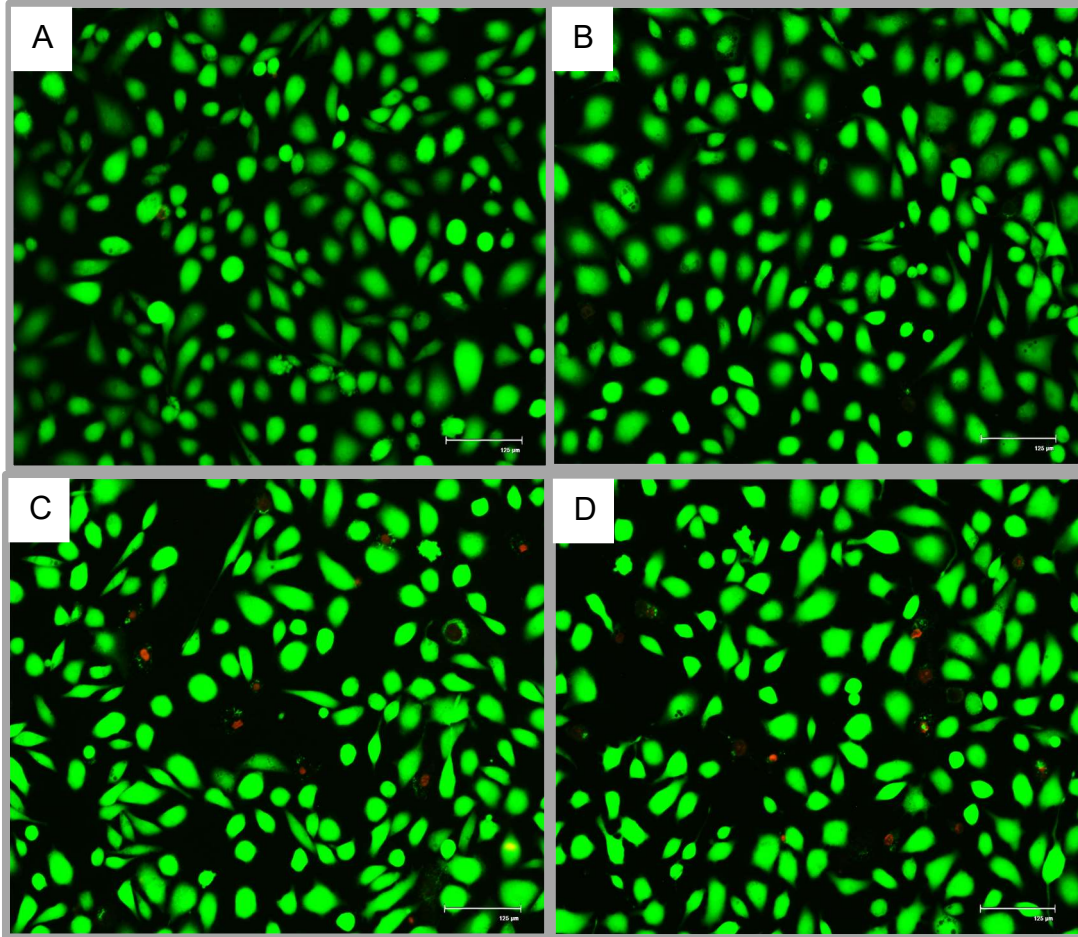


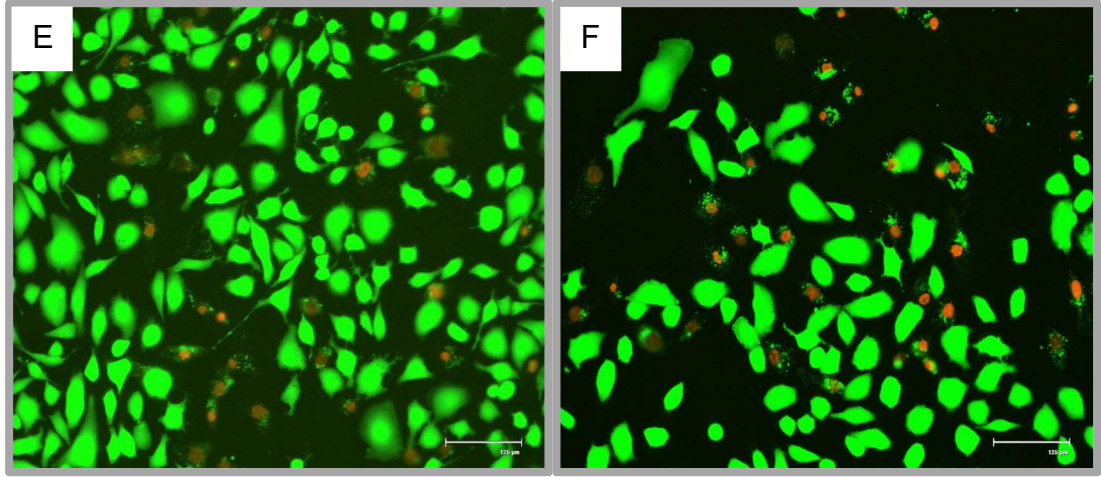
Şekil 4.2. Bronş epitel hücrelerinin Der p 2 ile uyarılmamış (A), 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C), 10 µg/mL (D), 20 µg/mL (E) ve 40 µg/mL (F) konsantrasyonda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil)/ölü(kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 100 µm

Görüntüleme sonuçlarına bakıldığında epitel hücreler üzerinde Der p 2 uyarımının, Der p 1 ile uyarım sonuçlarındaki gibi etkili bir ölüme neden olmadığı görülmektedir. Der p 2'nin 40 µg/mL konsantrasyonuna rağmen hücre canlılığının devam etmesi, bu alerjenin proteolitik aktiviteye sahip olmaması ile açıklanabilir. Farklı konsantrasyondaki Der p 2 alerjeni ile uyarılan koşullardaki canlı/ölü hücre görüntüleri karşılaştırıldığında ölü hücre sayısında artış görülmüştür. Proteolitik aktiviteye sahip olmayan Der p 2 alerjeninin epitel hücre yüzeyinde bulunan TLR4 ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Bu durum, TLR4 reseptörünün aktifleşmesine ve alerjik cevabın başlatılmasına neden olmaktadır [67]. Ölü hücre sayısında artış görülmesinde, TLR4 reseptörünün aktifleşmesinin etkili olduğu düşünülmüştür. Literatürde Der p 2 alerjeninin sıkı bağlantı moleküllerine zarar

vermediği, hatta A549 hücrelerinde sıkı bağlantı moleküllerinden olan claudin-1 molekülünün ifadesini arttırdığı gösterilmiştir [246]. BEAS-2B hücrelerinde ise hücre-hücre etkileşiminde ve hava yolu yeniden yapılanmasında etkili olan Fascin-1 molekülünün ifadesini etkilediği bilinmektedir [247]. Elde edilen görüntülerde hücrelerdeki canlılığın devam etmesinde, hücreler arasındaki bağlantı moleküllerinin ifadesinin Der p 2 uyarım sonrasında artmasının etkili olduğu düşünölmüştür.

Bronş epitel hücreleri serin proteaz özellikteki Der p 6 ile 2, 5, 10, 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda uyarılmıştır. Uyarım sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre görüntüleri Şekil 4.3'te verilmiştir.





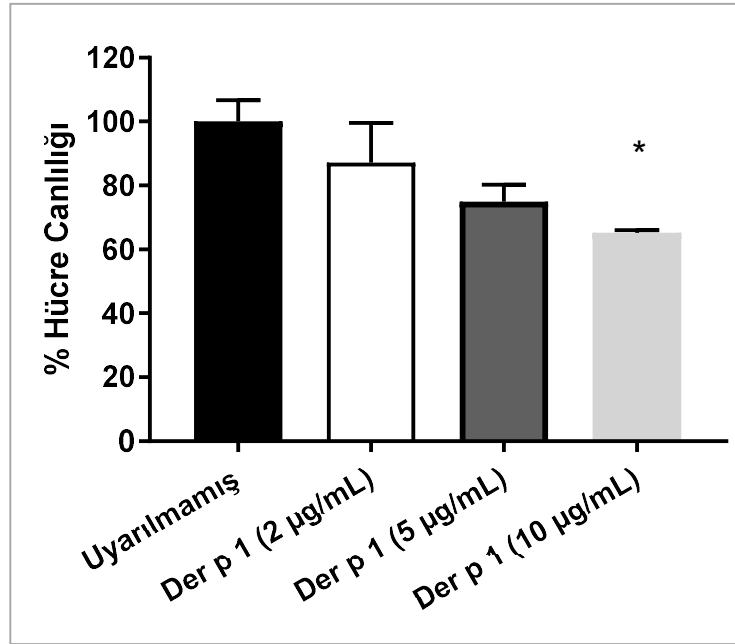
Şekil 4.3. Bronş epitel hücrelerinin Der p 6 ile uyarılmamış (A), 2 µg/mL (B), 5 µg/mL (C), 10 µg/mL (D), 20 µg/mL (E) ve 40 µg/mL (F) konsantrasyonda uyarılmış koşullarının canlı (yeşil) /ölü (kırmızı) hücre boyama fotoğrafları; 20 X, bar 100 µm

Kimotripsin benzeri serin proteaz alerjeni olan Der p 6 uyarımı sonrasında ölü hücre sayısının konsantrasyona artışına bağlı olarak arttığı görülmüştür. 2 µg/mL Der p 6 ile uyarım sonrasında elde edilen görüntüler uyarılmamış koşulun görüntülerine benzerlik göstermiştir. 5 µg/mL konsantrasyondan itibaren ölü hücre sayısında artış gözlenmiştir. 40 µg/mL Der p 6 uyarımı sonrasında ise alerjen hücelere toksik etki göstermeye başlamış ve canlılık azalmıştır. Yapılan bir çalışmada HDM kaynaklı serin proteaz alerjenlerin (Der p 3, Der p 6 ve Der p 9) etkisine Calu-3, MDCK ve 16HBE14o- hücrelerinde bakılmış ve sıkı bağlantı molekülleri olan ocludin ve ZO-1'e zarar verdiği gösterilmiştir. Sıkı bağlantıların bozulması epitelyal hasara neden olmuştur [248]. Tez kapsamında Der p 6 için yapılan canlı/ölü hücre boyama deneyinde BEAS-2B hücrelerinin Der p 6'nın sahip olduğu proteolitik etki nedeniyle 40 µg/mL ve üstü konsantrasyonlarda epitelyal hasara yol açabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

#### 4.1.2. Alerjen ile Uyarılan Hücrelerin Sitotoksisite Değerlerinin Ölçülmesi

Tez kapsamında bronş epitel hücelere uygulanan alerjenlerin toksik etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla MTT ölçümü gerçekleştirilmiştir. Epitel hücrelerin Der

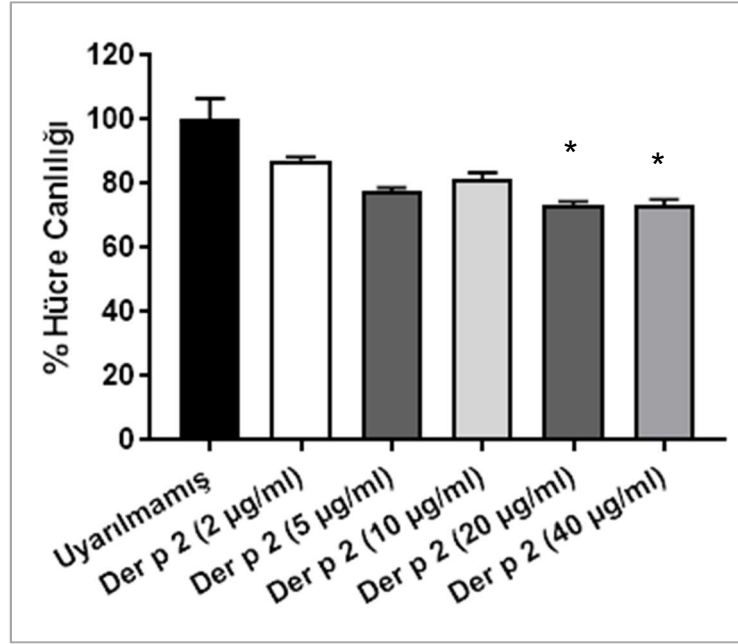
p 1 alerjeninin 2 µg/mL, 5 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonları ile uyarımı sonrasında elde edilen sitotoksosite sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyondaki Der p 1 alerjeni ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; \* p<0.05

Der p 1 alerjeni ile bronş epitel hücrelerin uyarımı sonrasında konsantrasyona bağlı olarak % hücre canlılığı oranlarında azalma bulunmuştur. 2 µg/mL Der p 1 ile uyarım sonunda hücre canlılığının %87,15 olduğu görülmüştür. Bu oran, 5 µg/mL Der p 1 ile uyarım sonrasında %74,95 ve 10 µg/mL Der p 1 ile uyarım sonrasında ise %65,23'e düşmüştür (p<0,05). Yapılan sitotoksosite testi sonrası elde edilen sonuçlar ile canlı/ölü hücre boyama görüntülerinin uyduğu bulunmuştur. Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda optimize edilen Der p 1'in 10 µg/mL konsantrasyonun üstünde hücre yapısının tamamen bozulduğu ve ölüme sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu nedenle 10 µg/mL konsantrasyonun üstüne çıkılmamış ve Der p 1'in 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılmasına karar verilmiştir.

Epitel hücrelerin Der p 2 alerjeninin 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonları ile uyarımı sonrasında elde edilen sitotoksosite sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

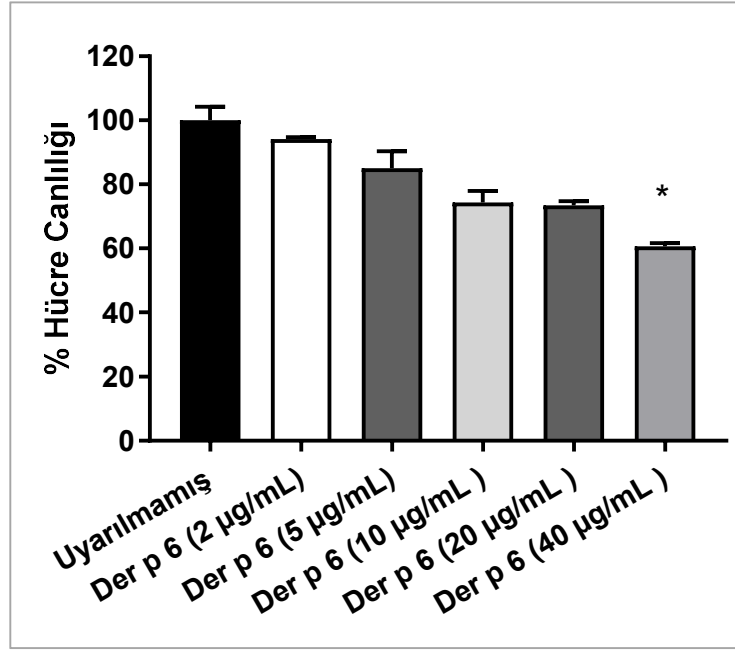


Şekil 4.5. Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki Der p 2 alerjeni ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; \* p<0,05

Der p 2 alerjeni ile uyarılan koşulların MTT sonuçları, uyarılmamış koşul ile karşılaştırılmıştır. 2 µg/mL Der p 2 ile uyarılan hücrelerin canlılık oranlarında büyük bir farklılık görülmemiş ve %87,3 olduğu görülmüştür. 5 µg/mL Der p 2 ile uyarılan hücrelerde bu oran %77,75'e inmiştir. 10 µg/mL konsantrasyonda % hücre canlılık değerleri %81,55, 20 µg/mL konsantrasyonda 73,37 ve en yüksek konsantrasyon olan 40 µg/mL Der p 2 ile uyarılan hücrelerde ise canlılık oranı %73,43 olarak tespit edilmiştir (p<0,05). Ölü hücre sayısında görülen bu artış Lin ve ark. (2015) tarafından çalışılmış ve BEAS-2B hücre hattında Der p 2 alerjeninin apoptotik yolları aktive ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışma içerisinde yapılan hücre canlılığı sonuçları, tez kapsamında yapılan MTT analizi ile uyum gösterdiği tespit edilmiştir. MTT analizi sonucunda elde edilen değerler canlı/ölü hücre boyama sonuçları ile de uyumluluk göstermiştir. Der p 1 ve Der p 6 alerjenleri ile doğru bir karşılaştırmanın yapılabilmesi için bronş epitel hücrelerinin 2 ve 10 µg/mL Der p 2 ile uyarılmasına karar verilmiştir.

Epitel hücrelerin Der p 6 alerjeninin 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonları ile uyarımı sonrasında elde edilen sitotoksite sonuçları Şekil 4.6'te gösterilmiştir.





Şekil 4.6. Bronş epitel hücrelerin farklı konsantrasyondaki Der p 6 alerjeni ile uyarılması sonrasında elde edilen MTT sonuçları; n=3; \* p<0,05;

Der p 6'nın artan konsantrasyonları ile uyarılan bronş epitel hücrelerin sonuçları karşılaştırılmıştır. 2 µg/mL Der p 6 ile uyarım sonucunda hücre canlılığının %94,15 olduğu görülmüştür. 5 µg/mL Der p 6 ile uyarım sonrasında ise hücre canlılığı değeri %85'tir. 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyondaki uyarım sonrasında %74 ve %73 değerleri elde edilmiştir. 40 µg/mL Der p 6 uyarımı sonucunda hücre canlılığının %60'a düştüğü gözlenmiş ve bu düşüşün anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Literatürde farklı serin proteaz alerjenleri ile yapılan MTT sonuçları bulunmaktadır ancak Der p 6 konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığı gösterilmemiştir. Alınan MTT sonuçları doğrultusunda HDM kaynaklı sistein proteaz alerjeni olan Der p 1'in düşük konsantrasyonda hücre canlılığı üzerinde Der p 2 ve Der p 6 alerjenlerine göre daha etkili olduğu görülmüştür.

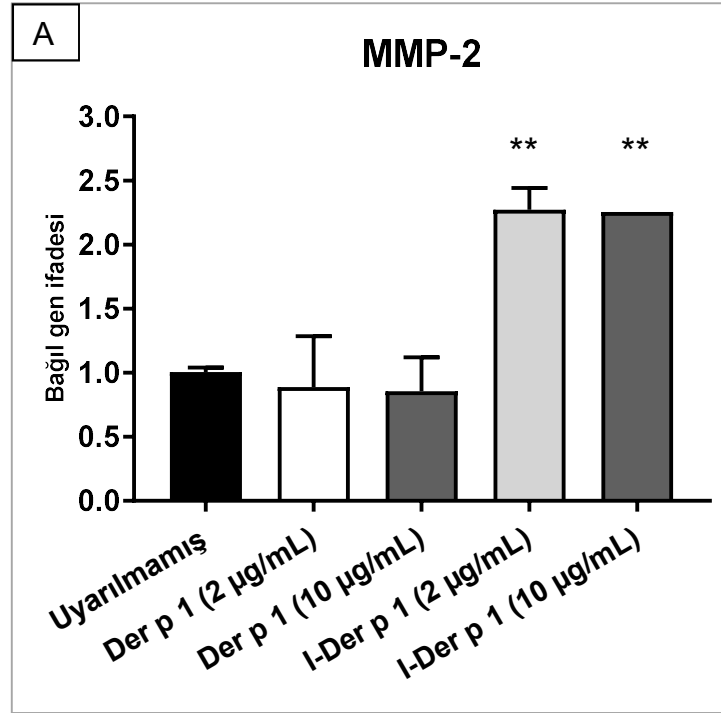
#### 4.2. Alerjen ile Uyarılan Bronş Epitel Hücrelerin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Analizi

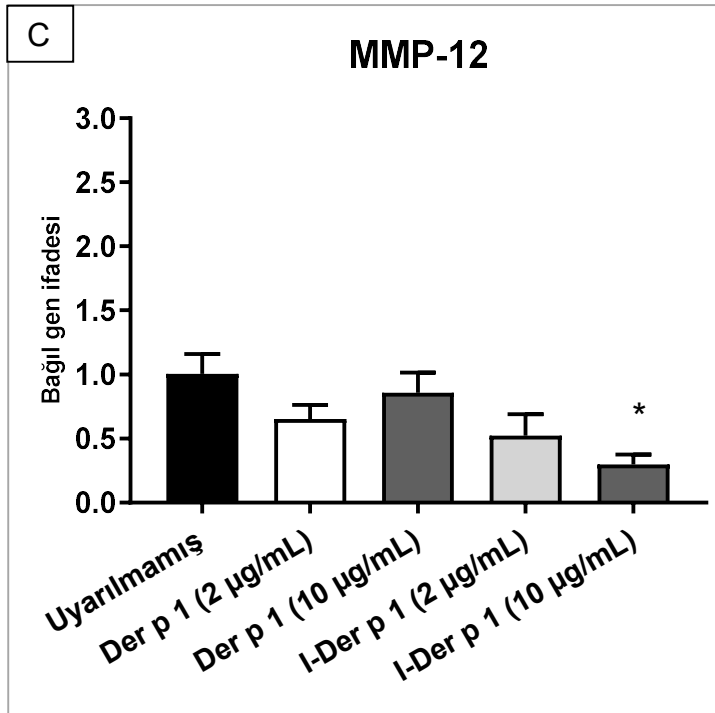
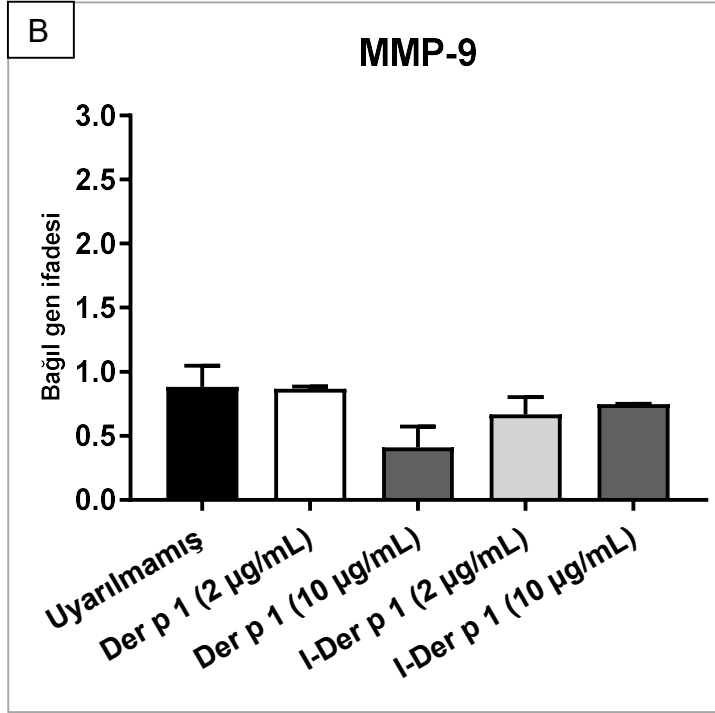
2 ve 10 µg/mL konsantrasyondaki proteaz ve proteaz olmayan alerjenler ile 24 saat uyarılan bronş epitel hücrelerinde MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 genlerinin ifadelerinin

belirlenmesi amacıyla gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu koşulların yanında alerjenler ısı ile muamele edilmiş ve etkileri kontrol edilmiştir.

#### 4.2.1. Der p 1 Sistein Proteaz Alerjeninin MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi

Bronş epitel hücrelerinin 2 ve 10 µg/mL konsantrasyona sahip Der p 1 alerjeni ile uyarımı sonrası elde edilen qPCR sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir.





Şekil 4.7. Bronş epitel hücrelerinin 24 saat 2 ve 10 µg/mL Der p 1 ile uyarımı sonrasında MMP-2 (A), MMP-9 (B) ve MMP-12(C) genlerinin ifadeleri; I:İsi ile denatüre edilmiş; n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01

MMP-2 gen ifadesine bakıldığında 2 ve 10 µg/mL Der p 1 ile uyarılan hücrelerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. MMP-2'nin kanserli dokularda ve hava yolu yeniden

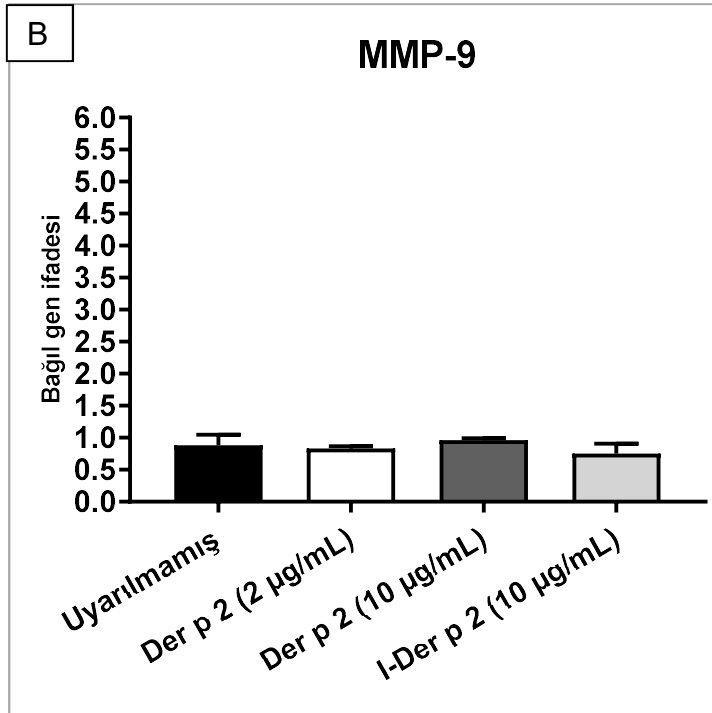
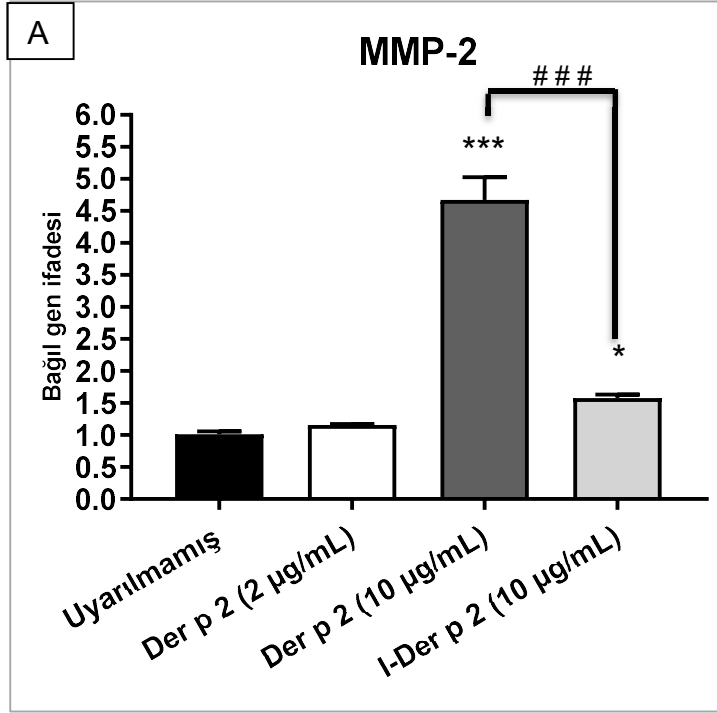
yapılanması sırasında astımlı kişilerin hava yolu epitel hücrelerinde ifadesinin arttığı bilinmektedir [249, 250]. Hücre kültürü deneyleri sırasında kullandığımız BEAS-2B hücrelerinin sağlıklı bronş epitel hücreler olması MMP-2 ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmemesinin nedeni olarak düşünülmüştür. Isı ile denatüre edilmiş 2 µg/mL ve 10 µg/mL Der p 1 ile uyarılan hücrelerde MMP-2 ifadesi artış göstermiştir (p<0,01). Elde edilen bu sonuçlar denatüre olan proteinin 3 boyutlu yapısının bozulması ve alerjen üzerinde farklı epitoplara ortaya çıkması yönünde yorumlanabilir. Ortaya çıkan epitoplara da epitel hücre yüzeyine bulunan bir reseptör tarafından tanınıp farklı bir yolağı aktive ettiği düşünülmüştür.

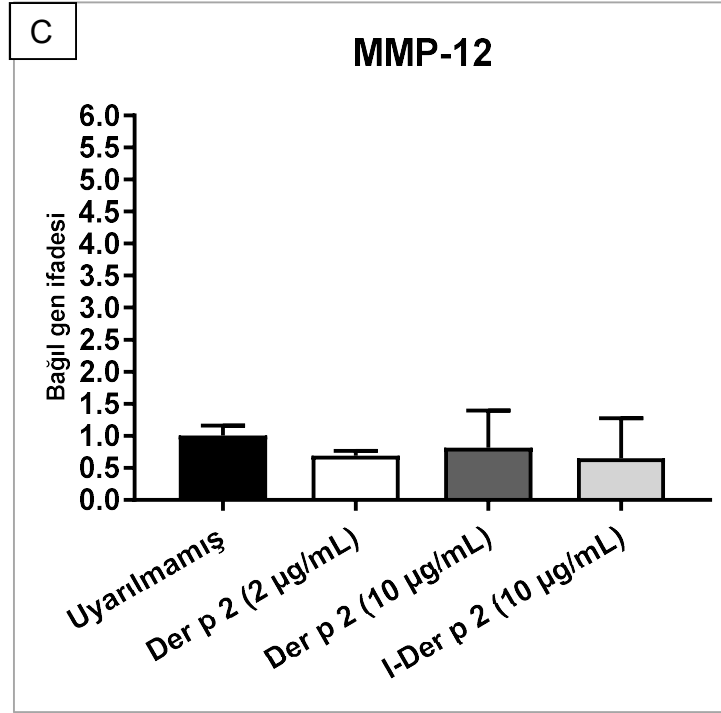
MMP-9 gen ifadesine baktığımızda 2 µg/mL konsantrasyonda gen ifadesi değişmezken 10 µg/mL Der p 1 uyarımı sonrasında düşüş gözlenmiştir. MMP-9 ifadesinin akut astımlı kişilerde arttığı literatürde gösterilmiştir ancak tez kapsamında yapılan deneylerde 10 µg/mL Der p 1 uyarımı sonrasında MMP-9 ifadesinde düşüş görülmüştür [251]. Bunun nedeni uyarımdan 24 saat sonra TIMP'ler başta olmak üzere farklı inhibitör genlerin ifadesinin arttığı ve proteaz-proteaz inhibitörü dengesinin sağlanmaya çalışıldığı düşünülmüştür. Isı ile denatüre edilmiş her iki koşulda ise literatürdeki diğer sonuçlar ile uyumlu olarak MMP-9'un gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Epitel hücre ve makrofaj gibi belirli dokularda üretilen MMP-12'nin gen ifadesine baktığımızda alerjenle uyarılan koşullarda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum alerjen konsantrasyonunun epitel hücrede etkin bir MMP-12 ifadesini uyarmadığını ve Der p 1'in sistein özelliğinin MMP-12 gen ifadesi üzerinde etkili olmadığını göstermiştir. Isı ile inaktive edilmiş alerjenlerin uyarımı sonrasında 10 µg/mL konsantrasyonda MMP-12 gen ifadesinde azalma görülmüştür (p<0,05). Bunun nedeni olarak, MMP-2 sonuçlarında olduğu gibi, bir reseptör tarafından tanınan denatüre proteinin farklı bir yolağı aktive etmiş olabileceği düşünülmektedir.

#### **4.2.2. Der p 2 Proteaz-Olmayan Alerjenin MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi**

Bronş epitel hücrelerinin proteaz aktiviteye sahip olmayan Der p 2 alerjeninin 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonları ile uyarımı sonrası elde edilen qPCR sonuçları Şekil 4.8'te verilmiştir.





Şekil 4.8. Bronş epitel hücrelerinin 24 saat 2 ve 10 µg/mL Der p 2 ile uyarımı sonrasında MMP-2 (A), MMP-9 (B) ve MMP-12(C) genlerinin ifadeleri; I:İsı ile denatüre edilmiş; n=3; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; # # # p<0,001

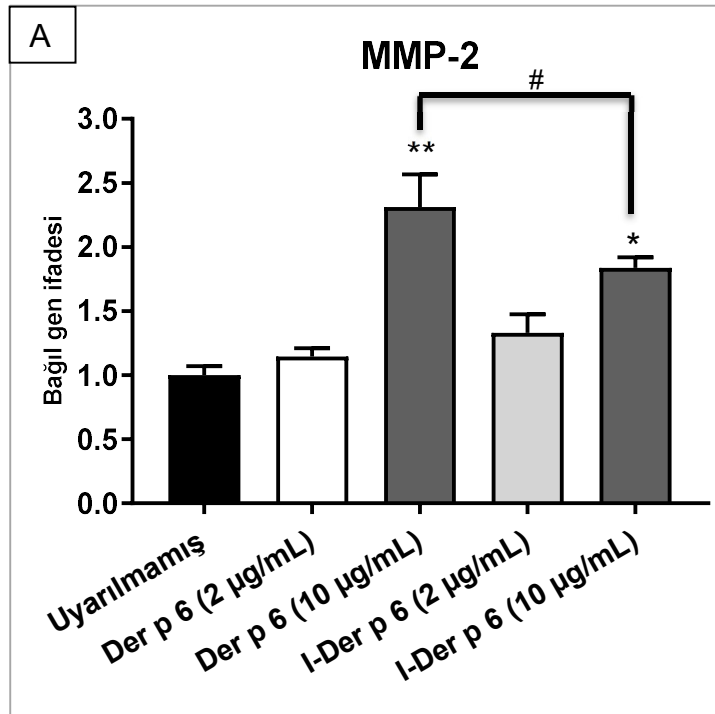
Der p 2 ile 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonda uyarılan hücrelerde MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 ifadesine bakılmıştır. MMP-2'nin gen ifadesi 2 µg/mL Der p 2 ile uyarım sonrasında uyarılmamış koşula göre değişiklik göstermemiştir. 10 µg/mL Der p 2 ile uyarılan koşulda ise anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0,001). Bu sonuç, MMP-2 ifadesinin Der p 2 alerjeninin konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. BEAS-2B hücrelerinde Der p 2 alerjeni ile uyarım sonrasında NF-κB ve MAPK moleküllerinin sitokin salımlarını düzenledikleri bulunmuştur [68]. Başka çalışmalarda ise kanserli akciğer hücreleri kullanılarak MMP-2'nin NF-κB ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [252]. Bu sonuçlar doğrultusunda MMP-2 ifadesinin BEAS-2B hücrelerinde de benzer bir yolak üzerinden arttığı düşünülmektedir. Isı ile denatüre edilmiş Der p 2 alerjeni ile uyarılan hücrelerde ise MMP-2 ifadesinde artış görülmüştür (p<0,05). Literatürde Der p 2 kullanılarak yapılan bir çalışmada bu tez çalışmasına benzer bir sistem üzerinden gidilmiş ve hücre ısı ile denatüre edilmiş Der p 2 ile uyarılmıştır. Uyarım sonucunda GM-CSF ifadesine bakıldığında ısı ile denatürasyon sonrasında gen ifadesinin tamamiyle engellenmediği tespit edilmiştir [68]. Bu çalışma ve tez kapsamında yapılan çalışmalar

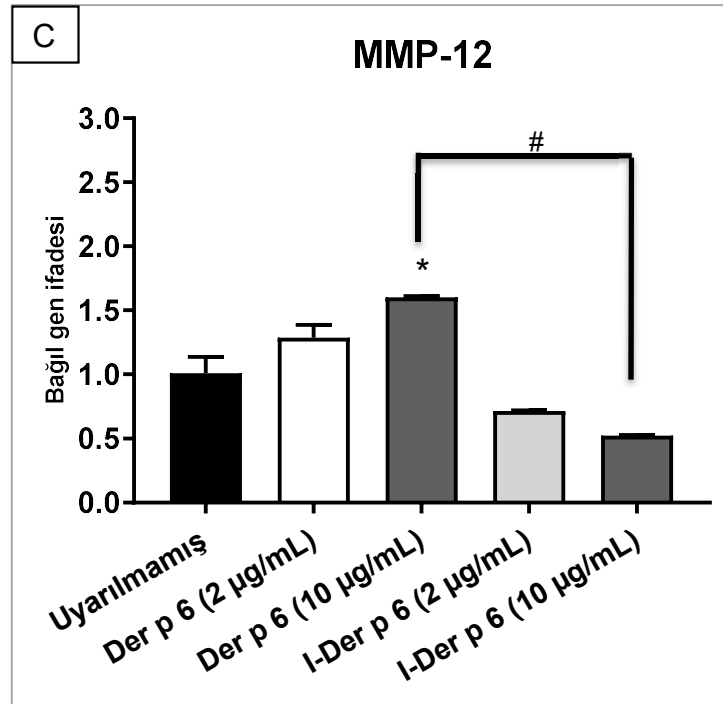
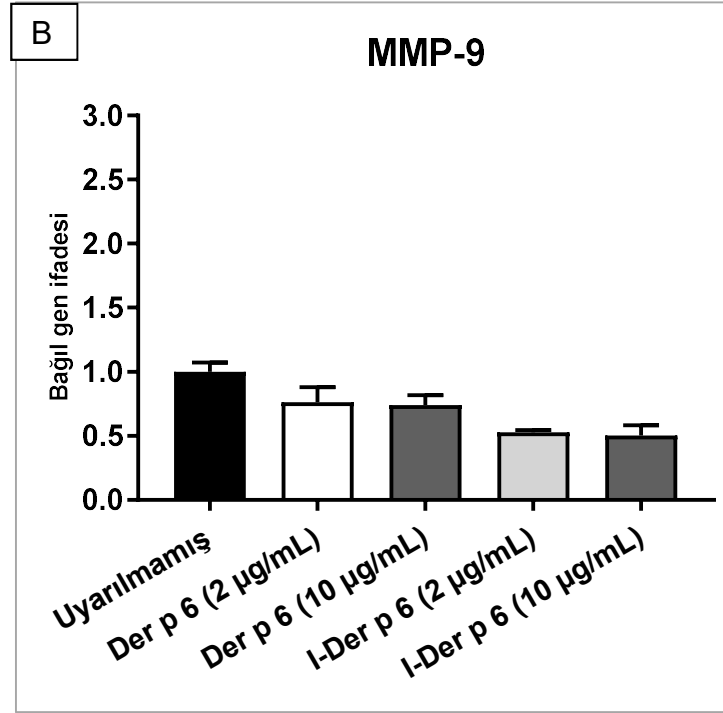
karşılaştırıldığında MMP-2 ifadesinin sahip olduğu yapısal katlanmaların gen ifadesinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

MMP-9 ve MMP-12 gen ifadelerinin Der p 2 konsantrasyonuna bağlı olarak değişmediği görülmüştür. Isı ile muamele edilmiş Der p 2 kullanılması da gen ifadelerinde değişikliğe neden olmamıştır.

#### 4.2.3. Der p 6 Serin Proteaz Alerjenin MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 Gen İfadeleri Üzerine Etkisi

Bronş epitel hücrelerin serin proteaz aktivitesine sahip Der p 6 alerjeninin 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonları ile uyarımı sonrası elde edilen qPCR sonuçları Şekil 4.6.'te verilmiştir.





Şekil 4.9. Bronş epitel hücrelerinin 24 saat 2 ve 10 µg/mL Der p 6 ile uyarımı sonrasında MMP-2 (A), MMP-9 (B) ve MMP-12(C) genlerinin ifadeleri; I:İsı ile denatüre edilmiş; n=3; \*p<0,05; \*\*p<0,01; # p<0,05

MMP-2 ifadesi Der p 6'nın 2 µg/mL konsantrasyonda artış göstermemiştir ancak 10 µg/mL Der p 6 uyarımı sonrasında anlamlı bir artış görülmüştür (p<0,001). Yapılan bir



çalışmada serin proteaz olan Per a 10 alerjeninin, epitel hücre yüzeyinde bulunan PAR-2 reseptörünü aktifleştirdiği ve Th2 alerjen cevabını STAT3 aktivasyonu üzerinden başlattığı gösterilmiştir [253]. Aktif olan STAT3 molekülünün ise kanserli cilt dokusunda MMP-2'nin ifadesini arttırdığı bilinmektedir [254]. Bu çalışmalardan yola çıkarak MMP-2'nin PAR-2 üzerinden aktifleştigi yorumunda bulunulabilir. Isı ile denatürasyon işleminin Ara h 1 gibi bazı alerjenlerin proteolitik aktivitesini etkilemediği bilinmektedir [255]. Yapılan başka bir çalışmada ise ısı ile denatüre edilmiş huş ağacı, çimen ve kedi tüyü alerjenlerinin aktivitesinin denatürasyon için kullanılan sıcaklık ve süreye bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir [256]. Elde edilen sonuçlara bakıldığında Der p 6 alerjeninin 95°C'de 5 dakika tutulmasının, alerjenin etkinliğini değiştirdiği ancak tamamiyle baskılamadığı sonucuna ulaşılmaktadır.

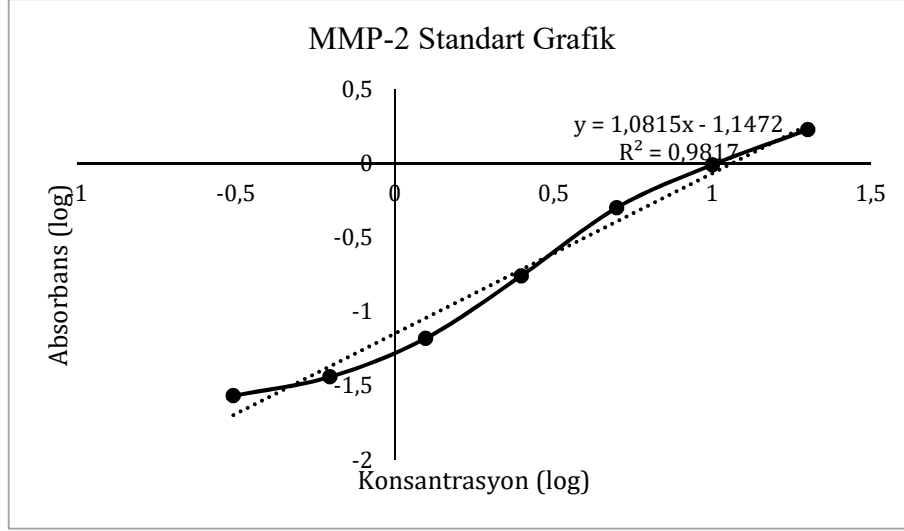
MMP-9 gen ifadesinin, 2 ve 10 µg/mL Der p 6 uyarımı sonrasında değişmediği gözlenmiş, alerjen konsantrasyonunun değişmesi, MMP-9 gen ifadesi üzerinde etkili olmamıştır. Isı ile denatüre edilen Der p 6 uyarımı sonrasında da MMP-9 gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Der p 6 alerjeninin 10 µg/mL konsantrasyonu, MMP-12 gen ifadesini anlamlı bir şekilde etkilemiştir ( $p < 0.05$ ). Der p 1 ve Der p 2 alerjenlerinin uyarımı sonucunda MMP-12 ifadesinde bir değişim görülmezken serin proteaz alerjeni olan Der p 6 ile konsantrasyona bağlı olarak bir artış görülmüştür. Bu durum serin proteazların MMP-12 uyarımı olduğunu düşündürmüştür.

### **4.3. Alerjen ile Uyarılan Bronş Epitel Hücrelerin ELISA Sonuçları**

Bronş epitel hücrelerin 2 ve 10 µg/mL konsantrasyondaki Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenleri ile 24 saat uyarımı sonrasında hücre dışında bulunan inaktif ve aktif MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 değerlerine ELISA deneyi ile bakılmıştır.

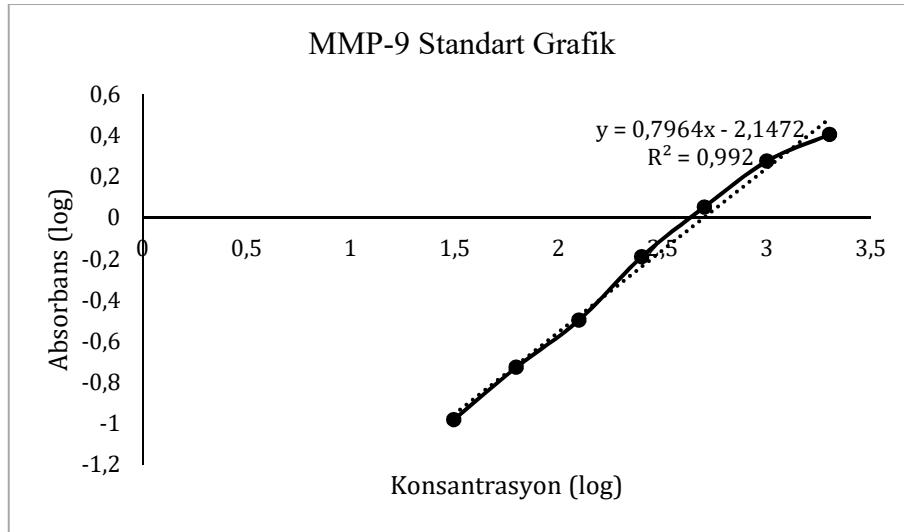
MMP-2 için elde edilen standart grafik Şekil 4.10'da verilmiştir.



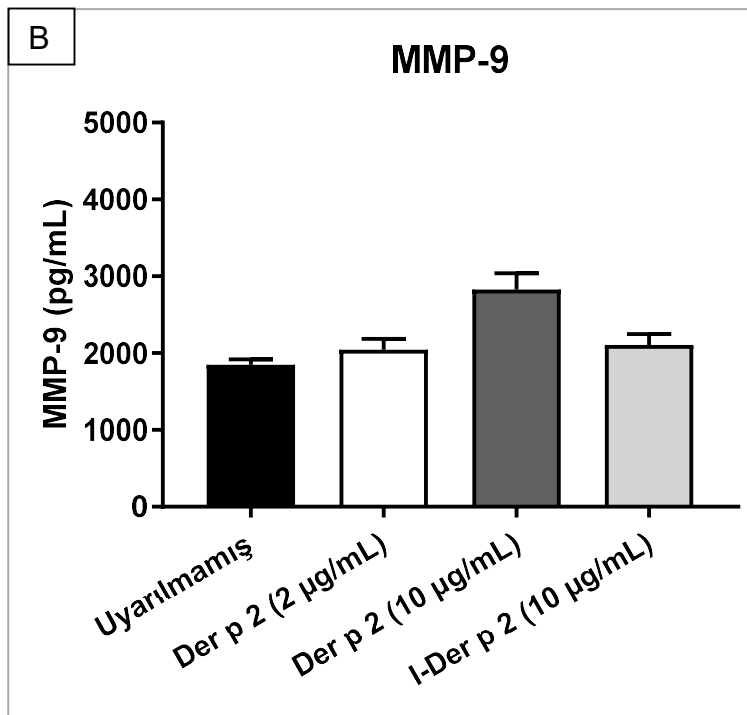
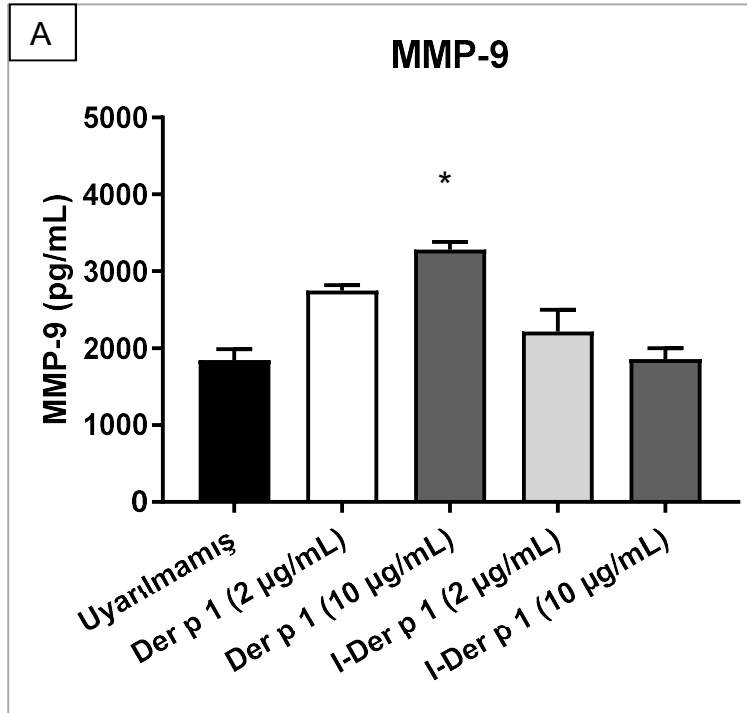
Şekil 4.10. MMP-2 proteininin ELISA deneyi için elde edilen standart grafiği

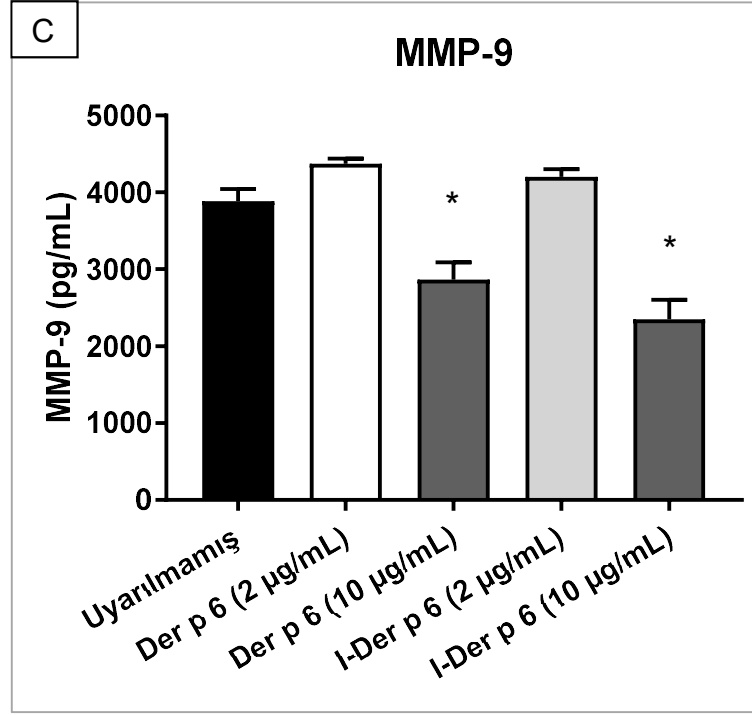
Ticari olarak satın alınan Human MMP-2 ELISA Kit'i için hassasiyet aralığı 0,625-20 ng/mL'dir. Yapılan deneyler sonucunda MMP-2'nin standart grafiği elde edilmiş ancak örneklerden protein tespiti yapılamamıştır. Örneklerden salınan MMP-2 miktarının 0,625 ng değerinin altında olduğu düşünülmüş ve MMP-2 düzeyi 0 kabul edilmiştir.

MMP-9 için elde edilen standart grafik Şekil 4.11'de, Der p1, Der p2 ve Der p6 alerjisi ile uyarılan hücrelerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'te verilmiştir.



Şekil 4.11. MMP-9 proteininin ELISA deneyi için elde edilen standart grafiği





Şekil 4.12. Der p 1 (A), Der p 2 (B) ve Der p 6 (C) ile uyarılan hücrelerde MMP-9 proteininin değerleri; I: Isı ile uyarılmış; n=3; \*p<0,05

MMP-9 için hassasiyet aralığının 31,2-2000 pg/mL arasında olduğu tespit edilmiştir. Buna göre farklı alerjenlerle uyarılan örneklerin hücre dışında bulunan MMP-9 seviyeleri ölçülmüştür.

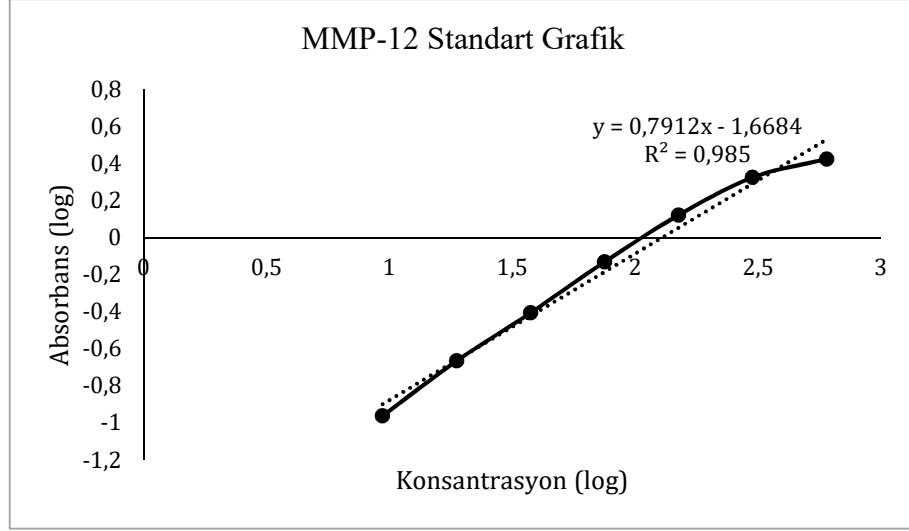
Hücre dışına salınan MMP-9 protein seviyesinin 2 µg/mL ve 10 µg/mL Der p 1 ile uyarım sonrasında konsantrasyona bağlı olarak artış görülmüştür. 10 µg/mL konsantrasyonda uyarım sonrası gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Aynı koşullarda MMP-9'un gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Görülen bu farklılık ortamdaki MMP-9 protein miktarına bağlı olarak düzenleyici bir mekanizmanın devreye girdiği ve gen ifadesini azalttığı düşünülmüştür. Isı ile uyarılmış alerjenlerin kullanıldığı koşullarda da artış gözlenmemiştir.

Der p 2 ile uyarılan hücrelerde MMP-9 protein seviyelerine bakılmıştır. 2 µg/mL ve 10 µg/mL Der p 2 ile uyarım sonrasında görülen sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Isı ile uyarım sonrasında da MMP-9 protein seviyesinde anlamlı

bir değişiklik gözlenmemiştir. Der p 2 alerjeni ile uyarım sonrasında MMP-9 gen ifadesinde bir farklılık görülmemiştir ancak protein seviyelerinde artış mevcuttur. Bu durum proteaz inhibitör genlerle ilişkili olduğu düşünölmektedir. Ticari olarak satın alınan Human MMP-9 ELISA Kit'i ortamdaki inaktif ve aktif MMP-9'ları tespit etmektedir. Alerjen uyarımı sonrasında 24 saat içerisinde alerjene cevap olarak MMP-9 gen ifadesi artmış ve 24 saat sonunda gen ifadesi uyarılmamış koşula denk hale gelmiş olabilir. Bunun yanı sıra artan gen ifadesi ile oluşturulan aktif ve inaktif MMP-9'ların bir kısmı ortamda kaldığı ve ELISA deneyi ile tespit edildiği düşünölmektedir.

Hücrelerin 2 µg/mL Der p 6 ile uyarımı sonrasında anlamlı bir değişiklik görülmezken, 10 µg/mL Der p 6 ile uyarımın sonucunda MMP-9 protein seviyesinde düşüş gözölmüştür ( $p<0,05$ ). Isı ile uyarılan Der p 6 alerjeninin 2 µg/mL konsantrasyonu hücrelerde MMP-9 protein miktarında etkili olmamıştır. Isı ile uyarılan 10 µg/mL Der p 6 alerjeninin hücrelere uygulanması sonrasında ise hücrelerde düşüş gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Der p 6 ile uyarılan hücrelerin MMP-9 gen ifadelerinde konsantrasyona bağlı değişiklik gözlenmemiştir ancak protein miktarı 10 µg/mL Der p 6 ile uyarılan koşulda 2 µg/mL Der p 6 koşuluna göre daha az bulunmuştur. Bu durumun nedeni, epitel hücrelerde Der p 6'e yanıt oluşturulması sırasında MMP-9 ifadesini ve buna bağlı olarak protein miktarını azaltacak bir molekülün varlığı ile ilişkilendirilebilir.

MMP-12 için elde edilen standart grafik Şekil 4.13'de verilmiştir.



**Şekil 4.13.** MMP-12 proteininin ELISA deneyi için elde edilen standart grafiği

MMP-12 ELISA Kiti'nin hassasiyet aralığı 8-1000 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Deney sırasında toplanan örneklerden MMP-12 protein düzeyi ile ilgili sonuç alınmamıştır. Bu nedenle MMP-12 protein düzeyi 0 olarak kabul edilmiştir.

## 5. YORUM

Yapılan tez çalışması kapsamında bronş epitel hücrelerde serin proteaz, sistein proteaz ve proteaz özellikte olmayan alerjenlerin MMP-2, -9 ve -12 üzerine olan etkileri RNA ve protein düzeyinde araştırılmıştır. Hücelere uygulanacak optimum alerjen konsantrasyonunu belirlemek amacıyla artan konsantrasyonlarda alerjen uyarımı gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin canlı kaldığı ve sitotoksitenin görülmediği dozu tespit etmek için MTT ve EtBr/kalsein boyama yöntemleri kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda Der p 1, 2 ve 6 için kullanılacak uygun konsantrasyonlar seçilmiştir. 21 gün süresince ALI kültürde farklılaştırılan BEAS-2B hücreleri Der p 1, Der p 2 ve Der p 6 alerjenlerinin belirlenen konsantrasyonu ile 24 saat uyarılmıştır. Uyarım sonucunda RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve hücre süpernatantları toplanmıştır. İzole edilen RNA'lar cDNA çevrilmiş ve gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre süpernatantlarında ELIZA yöntemi kullanılarak MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 protein düzeylerine bakılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir;

- Der p 1'in farklı konsantrasyonları için yapılan MTT sonuçları, literatür ile uyumlu bulunmuştur. Konsantrasyonla doğru orantılı olarak hücre canlılığı düşmüştür. En belirgin düşüş 10 µg/mL konsantrasyonda gözlenmiştir.
- Der p 2 alerjeni ile yüksek konsantrasyonlarda (40 µg/mL) dahi hücre canlılığı üzerinde diğer alerjenlere göre etkisinin düşük olduğu saptanmıştır. En yüksek konsantrasyonda (40 µg/mL) uyarım yaptığımız hücrelerde canlılık %73,43 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak bulunmuştur.
- Literatürde Der p 6 alerjeni ile yapılan MTT ve görüntüleme sonucu bulunmamaktadır. Der p 6 ile hava yolu epitel hücre çalışmaları literatürde sınırlı sayıda olup verilerimizin literatüre katkı sağlayacağına inanmaktayız.
- Serin proteaz özellikteki Der p 6 alerjeni ile 40 µg/mL konsantrasyonda uyarılan hücrelerde hücre canlılığı %60 olarak gözlenmiştir. Uygulama sonrası Der p1 ve Der p2 ile benzer hücre canlılık oranlarının gözlendiği Der p 6 konsantrasyonu MMP deneyleri için seçilmiştir.
- Hazırlanan deney sisteminde her alerjen için 2 ve 10 µg/mL konsantrasyon seçilmiştir. Bunun yanında alerjenler ısı ile denatüre edilerek bu işlem sonrasında

değişen gen ve protein ifadeleri de değerlendirilmiştir. Bu koşulların MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 ifadeleri üzerine olan etkileri karşılaştırılmıştır.

- Der p 1 ile 2 ve 10 µg/mL uyarım sonrasında MMP-2 ifadesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ancak ısı ile denatürasyonu sonrasında MMP-2 ifadesi artmıştır. Der p 1 molekülünün üç boyutlu yapısının bozulmasının farklı patern tanıma reseptörleriyle etkileşime giren yeni epitopların ortaya çıkmasına yol açmış olabileceğini düşünmekteyiz.
- MMP-12 ifadesi Der p 1 alerjeninin denatüre edildiği koşulda azalmıştır. Bu durumun moleküler yapısı bozulan alerjenin farklı bir moleküler yolağı aktive etmesi sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir.
- 10 µg/mL Der p 2 alerjeni ile uyarılan hücrelerde MMP-2 ifadesinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artışın literatürle uyumlu olarak NF-κB yolağı üzerinden gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.
- Der p 2'nin 2 ve 10 µg/mL konsantrasyonda uyarımı sonrasında MMP-9 ve MMP-12 gen ifadelerinin değişmediği gözlenmiştir. Der p 2 alerjeninin epitel hücrede aktive ettiği yolakların bu genler üzerinde etkisi olmadığı düşünülmüştür.
- Literatürde serin proteaz alerjen olan Der p 6 uyarımı sonrasında matriks metalloproteaz genlerine bakılan bir çalışma bulunmamaktadır. Tez kapsamında Der p 6 uyarımı sonrasında MMP-2, MMP-9 ve MMP-12'nin gen ifadeleri ile protein verileri, tezin özgün değerini oluşturmaktadır.
- Der p 6 uyarımı sonrasında konsantrasyona bağlı olarak MMP-2 gen ifadesinin seviyesi artmıştır. Isı ile denatürasyon sonucunda gen ifadesinde görülen düşüşün, alerjeninin moleküler yapısının bozulması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.
- Der p 6 uyarımı sonrasında MMP-9 ifadesinde konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Der p 6'nın epitel hücrede etkilediği yolakların MMP-9 ifadesini değiştirmediği sonucuna ulaşılmıştır.
- Der p 6 alerjeni uyarımı sonrasında MMP-12 gen ifadesinin 10 µg/mL konsantrasyonda arttığı tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak MMP-12 ifadesinde Der p 6 alerjeninin etkili olduğu düşünülmektedir. Isı ile denatüre edilen hücrelerde anlamlı olarak değişim gözlenmemiştir.



- MMP-2 ve MMP-12 için yapılan ELISA deneylerinde, hücre dışına salınan protein miktarlarının hassasiyet aralıklarının altında kalması nedeniyle sonuç alınamamıştır.
- Der p 1 uyarımı sonrasında hücre dışına salınan MMP-9 miktarı 2 µg/mL’de 2747 pg/mL, 10 µg/mL’de 3282 pg/mL değerlerinde çıkmıştır. MMP-9 protein miktarında ölçülen bu artmanın Der p 1 konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmüştür.
- Der p 1 uyarımı sonrasında hücre dışına salınan MMP-9 protein düzeyinde artış gözlemlenirken gen ifadesinde düşme görülmektedir. Hücrelerde proteaz-proteaz inhibitörleri arasındaki dengenin sağlanması amacıyla ifade olan genlerin, MMP-9’un gen ifadesini düşürerek denge oluşturmaya çalıştığı düşünülmektedir.
- Der p 2 uyarımı sonrasında 10 µg/mL konsantrasyonda MMP-9’un protein miktarında artış gözlenmiş ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Alınan bu sonuçlar, hücre dışına salınan MMP-9 miktarının Der p 2’nin konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir.
- Tez çalışması sırasında bronş epitel hücre hatı kullanılmıştır. BEAS-2B hücreleri sağlıklı bireylerden alınan bronş epitel hücreler oldukları için astımlı hücre genetik alt yapısına ve astımlı bireylerden alınan primer bronş epitel hücrelerin mikro çevresine sahip değildir. Bu çalışma temel olarak alerjen proteazların epitel hücre kökenli MMP’ler üzerine olan etkilerini gösteren mekanizmayı açıklamaya yönelik bir çalışma olup astım patogenezinde ve hava yolu yeniden yapılanmasındaki rolü için sağlıklı ve astımlı bireylerden alınan primer bronş epitel hücreleriyle daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.
- Çalışmanın diğer bir kısıtlayıcı yönü BEAS-2B hücrelerinin primer bronş epitel hücrelerinden farklı olarak ALI kültürde 21 gün farklılaştırma sonucunda TEER düzeylerinde yüksek artış gözlenmemesidir. Literatürde BEAS-2B hücrelerinde farklılaşma sonrasında TEER artışının sınırlı olduğu bizim deneylerimize benzer şekilde gösterilmiştir.
- Protein sonuçlarıyla RNA sonuçları arasında tam bir korelasyon tespit edilememiştir. RNA ifadesindeki erken dönem değişikliğin 24 saat uygulama sonrasında gözlenmemiş olması muhtemeldir. Bu durumun uyarım sonrasında erken dönem RNA cevabından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. 12 - 18

saat olmak üzere iki farklı uyarı zamanı daha seçilerek RNA düzeyindeki farklılığın nedenlerinin araştırılması planlanmıştır.

Tez kapsamında yapılan deneyler doğrultusunda ALI-kültür yöntemi ile farklılaştırılmış bronş epitel hücrelerinin sistein proteaz alerjen Der p 1, proteaz özelliğe sahip olmayan alerjen Der p 2 ve serin proteaz alerjen Der p 6 ile uyarımının MMP-2, MMP-9 ve MMP-12 üzerinde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Astım patogenezinde etkili olan matriks metalloproteazların farklı proteaz alerjen uyarımı sonrası görülen gen ve protein ifadelerindeki değişiklikler ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Isı ile denatüre edilen alerjenlerin uyarımı sonrasında alınan farklı sonuçlar, alerjenlerin 3 boyutlu yapılarının ısı sonucunda değiştiği ve bunun da MMP'leri etkilediği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] M. Kudo, Y. Ishigatsubo, I. Aoki, *Front Microbiol*, 4 (2013) 263.
- [2] G.I.N.A. (GINA), Global strategy for asthma management and prevention, in: G.I.N.A. (GINA) (Ed.), *Global Initiative for Asthma (GINA)*, 2017.
- [3] K.F. Chung, *The Lancet*, 386 (2015) 1086-1096.
- [4] J.G. Zein, S.C. Erzurum, *Current allergy and asthma reports*, 15 (2015) 28-28.
- [5] G.M. Chabra R, *Asthma, Allergic And Environmental*, in: S. [Internet] (Ed.), *StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)*, 2018, Jan.
- [6] H. Fuseini, D.C. Newcomb, *Current allergy and asthma reports*, 17 (2017) 19-19.
- [7] G.I.N.A. (GINA), *Global Strategy for Asthma Management and Prevention - Appendix 2018*, in: G.I.N.A. (GINA) (Ed.), *Global Initiative for Asthma (GINA)*, 2018.
- [8] Poongadan M.N., Gupta N., K. R., *Indian J Allergy Asthma Immunol*, 30 (2016) 80-90.
- [9] Y. Sun, J. Hou, Y. Sheng, X. Kong, L.B. Weschler, J.J.I.A.o.O. Sundell, E. Health, (2019).
- [10] H. Tarraf, O. Aydin, D. Mungan, M. Albader, B. Mahboub, A. Doble, A. Lahlou, L. Tariq, F. Aziz, A. El Hasnaoui, *BMC pulmonary medicine*, 18 (2018) 68-68.
- [11] B. Sekerel, S. Malhan, *Value Health*, 17 (2014) A593.
- [12] S.T. Holgate, *Clinical & Experimental Allergy*, 38 (2008) 872-897.
- [13] P. Chanaz, S.E. Wenzel, G.P. Anderson, J.M. Anto, E.H. Bel, L.-P. Boulet, C.E. Brightling, W.W. Busse, M. Castro, B. Dahlen, S.E. Dahlen, L.M. Fabbri, S.T. Holgate, M. Humbert, M. Gaga, G.F. Joos, B. Levy, K.F. Rabe, P.J. Sterk, S.J. Wilson, I. Vachier, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (2007) 1337-1348.
- [14] H. Kim, A.K. Ellis, D. Fischer, M. Noseworthy, R. Olivenstein, K.R. Chapman, J. Lee, *Allergy Asthma Clin Immunol*, 13 (2017) 48.
- [15] A. Licari, R. Castagnoli, I. Brambilla, A. Marseglia, M.A. Tosca, G.L. Marseglia, G. Ciprandi, *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*, 31 (2018) 44-55.

- [16] D.E. Shaw, A.R. Sousa, S.J. Fowler, L.J. Fleming, G. Roberts, J. Corfield, I. Pandis, A.T. Bansal, E.H. Bel, C. Auffray, C.H. Compton, H. Bisgaard, E. Bucchioni, M. Caruso, P. Chanez, B. Dahlén, S.-E. Dahlen, K. Dyson, U. Frey, T. Geiser, M. Gerhardsson de Verdier, D. Gibeon, Y.-k. Guo, S. Hashimoto, G. Hedlin, E. Jeyasingham, P.-P.W. Hekking, T. Higenbottam, I. Horváth, A.J. Knox, N. Krug, V.J. Erpenbeck, L.X. Larsson, N. Lazarinis, J.G. Matthews, R. Middelveld, P. Montuschi, J. Musial, D. Myles, L. Pahuš, T. Sandström, W. Seibold, F. Singer, K. Strandberg, J. Vestbo, N. Vissing, C. von Garnier, I.M. Adcock, S. Wagers, A. Rowe, P. Howarth, A.H. Wagener, R. Djukanovic, P.J. Sterk, K.F. Chung, *European Respiratory Journal*, 46 (2015) 1308-1321.
- [17] H.G. Ortega, S.W. Yancey, B. Mayer, N.B. Gunsoy, O.N. Keene, E.R. Bleecker, C.E. Brightling, I.D. Pavord, *Lancet Respir Med*, 4 (2016) 549-556.
- [18] J.V. Fahy, *Nature reviews. Immunology*, 15 (2015) 57-65.
- [19] D. Cheng, Z. Xue, L. Yi, H. Shi, K. Zhang, X. Huo, L.R. Bonser, J. Zhao, Y. Xu, D.J. Erle, G. Zhen, 190 (2014) 639-648.
- [20] D. Al-Sajee, R. Sehmi, T.J. Hawke, A. El-Gammal, K.J. Howie, R.M. Watson, M. Londei, G.M. Gauvreau, P.M. O'Byrne, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198 (2018) 805-807.
- [21] M.E. Kuruvilla, F.E.-H. Lee, G.B.J.C.R.i.A. Lee, *Immunology*, (2018).
- [22] M.E. Kuruvilla, F.E.-H. Lee, G.B. Lee, *J Clinical Reviewa in Allergy Immunology*, (2018).
- [23] A. Matucci, A. Vultaggio, E. Maggi, I.J.R.R. Kasujee, 19 (2018) 113.
- [24] M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, R. Beasley, *Allergy*, 59 (2004) 469-478.
- [25] C. Miranda, A. Busacker, S. Balzar, J. Trudeau, S.E. Wenzel, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113 (2004) 101-108.
- [26] H. Bisgaard, K. Bønnelykke, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126 (2010) 187-197.
- [27] B. Hesselmar, A.C. Enelund, B. Eriksson, L. Padyukov, L.A. Hanson, N. Aberg, *J Allergy (Cairo)*, 2012 (2012) 163089.

- [28] D.J. Jackson, R.E. Gangnon, M.D. Evans, K.A. Roberg, E.L. Anderson, T.E. Pappas, M.C. Printz, W.-M. Lee, P.A. Shult, E. Reisdorf, K.T. Carlson-Dakes, L.P. Salazar, D.F. DaSilva, C.J. Tisler, J.E. Gern, R.F. Lemanske, Jr., *American journal of respiratory and critical care medicine*, 178 (2008) 667-672.
- [29] P. Wu, W.D. Dupont, M.R. Griffin, K.N. Carroll, E.F. Mitchel, T. Gebretsadik, T.V. Hartert, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 178 (2008) 1123-1129.
- [30] D.A. Stern, W.J. Morgan, M. Halonen, A.L. Wright, F.D. Martinez, *Lancet* (London, England), 372 (2008) 1058-1064.
- [31] P.G. Gibson, V.M. McDonald, G.B. Marks, *Lancet*, 376 (2010) 803-813.
- [32] R. De Marco, F. Locatelli, I. Cerveri, M. Bugiani, A. Marinoni, G. Giammanco, *J Allergy Clin Immunol*, 110 (2002) 228-235.
- [33] M. Amelink, S.B. de Nijs, M. Berger, E.J. Weersink, A. ten Brinke, P.J. Sterk, E.H. Bel, *Clin Exp Allergy*, 42 (2012) 769-774.
- [34] M. Berry, A. Morgan, D.E. Shaw, D. Parker, R. Green, C. Brightling, P. Bradding, A.J. Wardlaw, I.D. Pavord, *Thorax*, 62 (2007) 1043-1049.
- [35] W. Wu, E. Bleecker, W. Moore, W.W. Busse, M. Castro, K.F. Chung, W.J. Calhoun, S. Erzurum, B. Gaston, E. Israel, D. Curran-Everett, S.E. Wenzel, *J Allergy Clin Immunol*, 133 (2014) 1280-1288.
- [36] S.E. Wenzel, *Nature Medicine*, 18 (2012) 716.
- [37] M. Wang, P. Gao, X. Wu, Y. Chen, Y. Feng, Q. Yang, Y. Xu, J. Zhao, J. Xie, *Respir Res*, 17 (2016) 153.
- [38] L.G. Wood, K.J. Baines, J. Fu, H.A. Scott, P.G. Gibson, *Chest*, 142 (2012) 86-93.
- [39] L. Cosmi, F. Liotta, F. Annunziato, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 16 (2016) 1-6.
- [40] F.L.M. Ricciardolo, V. Sorbello, A. Folino, F. Gallo, G.M. Massaglia, G. Favata, S. Conticello, D. Vallese, F. Gani, M. Malerba, G. Folkerts, G. Rolla, M. Profita, T. Mauad, A. Di Stefano, G. Ciprandi, *J Allergy Clin Immunol*, 140 (2017) 395-406.
- [41] E. Bettelli, T. Korn, M. Oukka, V.K. Kuchroo, *Nature*, 453 (2008) 1051-1057.

- [42] C.S. Kuo, S. Pavlidis, M. Loza, F. Baribaud, A. Rowe, I. Pandis, A. Sousa, J. Corfield, R. Djukanovic, R. Lutter, P.J. Sterk, C. Auffray, Y. Guo, I.M. Adcock, K.F. Chung, *Eur Respir J*, 49 (2017).
- [43] Y.S. Kim, J.P. Choi, M.H. Kim, H.K. Park, S. Yang, Y.S. Kim, T.B. Kim, Y.S. Cho, Y.M. Oh, Y.K. Jee, S.D. Lee, Y.K. Kim, *Allergy, asthma & immunology research*, 8 (2016) 198-205.
- [44] T.F. Carr, A.A. Zeki, M. Kraft, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197 (2018) 22-37.
- [45] E.R. Sutherland, *Immunology and allergy clinics of North America*, 28 (2008) 589-ix.
- [46] U. Peters, A.E. Dixon, E. Forno, *J Allergy Clin Immunol*, 141 (2018) 1169-1179.
- [47] A.E. Dixon, R.E. Pratley, P.M. Forgiione, D.A. Kaminsky, L.A. Whittaker-Leclair, L.A. Griffes, J. Garudathri, D. Raymond, M.E. Poynter, J.Y. Bunn, C.G. Irvin, *J Allergy Clin Immunol*, 128 (2011) 508-515.e501-502.
- [48] I. Esteban-Gorgojo, D. Antolín-Amérigo, J. Domínguez-Ortega, S. Quirce, *Journal of asthma and allergy*, 11 (2018) 267-281.
- [49] J.L. Ather, M. Chung, L.R. Hoyt, M.J. Randall, A. Georgsdottir, N.A. Daphtary, M.I. Aliyeva, B.T. Suratt, J.H.T. Bates, C.G. Irvin, S.R. Russell, P.M. Forgiione, A.E. Dixon, M.E. Poynter, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 55 (2016) 176-187.
- [50] A.E. Dixon, M.E. Poynter, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 54 (2016) 601-608.
- [51] F.D. Finkelman, D. Vercelli, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (2007) 544-550.
- [52] H.J. Gould, B.J. Sutton, *Nature Reviews Immunology*, 8 (2008) 205.
- [53] E. Untersmayr, G. Bises, P. Starkl, C.L. Bevins, O. Scheiner, G. Boltz-Nitulescu, F. Wrba, E. Jensen-Jarolim, *PloS one*, 5 (2010) e9023-e9023.
- [54] J.C.A. Jr, T. P., W. M., *The production of IgE, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, Garland Science, New York, 2001.

- [55] B. Laffleur, O. Debeaupuis, Z. Dalloul, M. Cogné, *Frontiers in immunology*, 8 (2017) 1277-1277.
- [56] C.S. Lantz, M. Yamaguchi, H.C. Oettgen, I.M. Katona, I. Miyajima, J.P. Kinet, S.J. Galli, *The Journal of Immunology*, 158 (1997) 2517.
- [57] A.M. Greer, N. Wu, A.L. Putnam, P.G. Woodruff, P. Wolters, J.-P. Kinet, J.-S. Shin, *The Journal of clinical investigation*, 124 (2014) 1187-1198.
- [58] B.N. Lambrecht, H. Hammad, *Nature Medicine*, 18 (2012) 684.
- [59] R.P. Schleimer, A. Kato, R. Kern, D. Kuperman, P.C. Avila, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (2007) 1279-1284.
- [60] B.N. Lambrecht, H. Hammad, *Immunity*, 31 (2009) 412-424.
- [61] M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.-P. Kraehenbuhl, P. Ricciardi-Castagnoli, *Nature Immunology*, 2 (2001) 361.
- [62] H. Hammad, M. Chieppa, F. Perros, M.A. Willart, R.N. Germain, B.N. Lambrecht, *Nature Medicine*, 15 (2009) 410.
- [63] H. Kumar, T. Kawai, S. Akira, *International Reviews of Immunology*, 30 (2011) 16-34.
- [64] D. Tang, R. Kang, C.B. Coyne, H.J. Zeh, M.T. Lotze, *Immunological reviews*, 249 (2012) 158-175.
- [65] M. Molteni, S. Gemma, C. Rossetti, *Mediators of Inflammation*, 2016 (2016) 9.
- [66] T. Ve, N.J. Gay, A. Mansell, B. Kobe, S. Kellie, *Curr Drug Targets*, 13 (2012) 1360-1374.
- [67] A. Trompette, S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R.S. Hegde, R. Madan, P.S. Thorne, M. Wills-Karp, T.L. Gioannini, J.P. Weiss, C.L. Karp, *Nature*, 457 (2008) 585.
- [68] C. Österlund, H. Grönlund, N. Polovic, S. Sundström, G. Gafvelin, A. Bucht, *Clinical & Experimental Allergy*, 39 (2009) 1199-1208.
- [69] C. Pantano, J.L. Ather, J.F. Alcorn, M.E. Poynter, A.L. Brown, A.S. Guala, S.L. Beuschel, G.B. Allen, L.A. Whittaker, M. Bevelander, C.G. Irvin, Y.M.W.

- Janssen-Heininger, American journal of respiratory and critical care medicine, 177 (2008) 959-969.
- [70] G.M. Gauvreau, P.M. O'Byrne, L.-P. Boulet, Y. Wang, D. Cockcroft, J. Bigler, J.M. FitzGerald, M. Boedigheimer, B.E. Davis, C. Dias, K.S. Gorski, L. Smith, E. Bautista, M.R. Comeau, R. Leigh, J.R. Parnes, New England Journal of Medicine, 370 (2014) 2102-2110.
- [71] M. Paplińska-Goryca, E.M. Grabczak, M. Dąbrowska, J. Hermanowicz-Salamon, M. Proboszcz, P. Nejman-Gryz, M. Maskey-Warzęchowska, R. Krenke, Postepy dermatologii i alergologii, 35 (2018) 462-469.
- [72] S. Goswami, P. Angkasekwinai, M. Shan, K.J. Greenlee, W.T. Barranco, S. Polikepahad, A. Seryshev, L.-z. Song, D. Redding, B. Singh, S. Sur, P. Woodruff, C. Dong, D.B. Corry, F. Kheradmand, Nature immunology, 10 (2009) 496-503.
- [73] D. Préfontaine, J. Nadigel, F. Chouiali, S. Audusseau, A. Semlali, J. Chakir, J.G. Martin, Q. Hamid, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125 (2010) 752-754.
- [74] M.A. Willart, K. Deswarte, P. Pouliot, H. Braun, R. Beyaert, B.N. Lambrecht, H. Hammad, J Exp Med, 209 (2012) 1505-1517.
- [75] D. Bartis, N. Mise, R.Y. Mahida, O. Eickelberg, D.R. Thickett, Thorax, 69 (2014) 760-765.
- [76] K. Nihlberg, A. Andersson-Sjöland, E. Tufvesson, J.S. Erjefält, L. Bjermer, G. Westergren-Thorsson, Thorax, 65 (2010) 670-676.
- [77] H. Fehrenbach, C. Wagner, M. Wegmann, Cell and tissue research, 367 (2017) 551-569.
- [78] Z. Zhou-Suckow, J. Duerr, M. Hagner, R. Agrawal, M.A. Mall, Cell Tissue Res, 367 (2017) 537-550.
- [79] P.K. Jeffery, American journal of respiratory and critical care medicine, 164 (2001) S28-S38.
- [80] T.-L. Hackett, H.G. de Bruin, F. Shaheen, M. van den Berge, A.J. van Oosterhout, D.S. Postma, I.H. Heijink, American journal of respiratory cell and molecular biology, 49 (2013) 662-671.



- [81] A.P. Nayak, D.A. Deshpande, R.B. Penn, *F1000Res*, 7 (2018).
- [82] H. Bisgaard, M.N. Hermansen, L. Loland, L.B. Halkjaer, F. Buchvald, *New England Journal of Medicine*, 354 (2006) 1998-2005.
- [83] C.L. Grainge, L.C. Lau, J.A. Ward, V. Dulay, G. Lahiff, S. Wilson, S. Holgate, D.E. Davies, P.H. Howarth, *N Engl J Med*, 364 (2011) 2006-2015.
- [84] Y. Gon, S. Hashimoto, *Allergology International*, 67 (2018) 12-17.
- [85] H. Hammad, B.N. Lambrecht, *Nat Rev Immunol*, 8 (2008) 193-204.
- [86] A. Jiang, O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J.A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, I. Mellman, *Immunity*, 27 (2007) 610-624.
- [87] I.H. Heijink, P.M. Kies, H.F. Kauffman, D.S. Postma, A.J. van Oosterhout, E. Vellenga, *J Immunol*, 178 (2007) 7678-7685.
- [88] M. Ahdieh, T. Vandenbos, A. Youakim, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281 (2001) C2029-C2038.
- [89] Y. Matsumura, *Journal of allergy*, 2012 (2012) 903659-903659.
- [90] O.A. Henriquez, K. Den Beste, E.K. Hoddeson, C.A. Parkos, A. Nusrat, S.K. Wise, *Int Forum Allergy Rhinol*, 3 (2013) 630-635.
- [91] J. Zhang, J. Chen, G.K. Newton, T.R. Perrior, C. Robinson, *Mol Pharmacol*, 94 (2018) 1007-1030.
- [92] M.A. Calderón, A. Linneberg, J. Kleine-Tebbe, F. De Blay, D. Hernandez Fernandez de Rojas, J.C. Virchow, P. Demoly, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136 (2015) 38-48.
- [93] J. Zhang, J. Chen, J. Zuo, G.K. Newton, M.R. Stewart, T.R. Perrior, D.R. Garrod, C. Robinson, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018) 3166.
- [94] V. Bordas-Le Floch, M. Le Mignon, L. Bussieres, K. Jain, A. Martelet, V. Baron-Bodo, E. Nony, L. Mascarell, P. Moingeon, *PLoS One*, 12 (2017) e0185830.
- [95] J. Zhang, J. Chen, C. Robinson, *International journal of molecular sciences*, 19 (2018) 3549.
- [96] B.N. Lambrecht, H. Hammad, *The Lancet*, 376 (2010) 835-843.

- [97] J. Deckers, K. De Bosscher, B.N. Lambrecht, H. Hammad, *Immunological Reviews*, 278 (2017) 131-144.
- [98] F. Fassio, F. Guagnini, *Clinical and molecular allergy : CMA*, 16 (2018) 15-15.
- [99] M. Hisbergues, M. Magi, P. Rigaux, J. Steuve, L. Garcia, D. Goudercourt, B. Pot, J. Pestel, A. Jacquet, *Clinical & Experimental Allergy*, 37 (2007) 1286-1295.
- [100] A. Jacquet, *ISRN Allergy*, 2013 (2013) 735031.
- [101] T. Osinski, A. Pomés, K.A. Majorek, J. Glesner, L.R. Offermann, L.D. Vailes, M.D. Chapman, W. Minor, M. Chruszcz, *The Journal of Immunology*, 195 (2015) 307-316.
- [102] X.S. Puente, L.M. Sanchez, C.M. Overall, C. Lopez-Otin, *Nat Rev Genet*, 4 (2003) 544-558.
- [103] N.I. Affara, P. Andreu, L.M. Coussens, *Delineating Protease Functions During Cancer Development*, in: T.H. Bugge, T.M. Antalis (Eds.) *Proteases and Cancer: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2009, pp. 1-32.
- [104] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, P.D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R.D. Finn, *Nucleic Acids Research*, 46 (2017) D624-D632.
- [105] H. Gunawan, T. Takai, S. Ikeda, K. Okumura, H. Ogawa, *Allergology International*, 57 (2008) 83-91.
- [106] S.L. Kale, K. Agrawal, S.N. Gaur, N. Arora, *Scientific Reports*, 7 (2017) 42341.
- [107] O.E. McKenna, G. Posselt, P. Briza, P. Lackner, A.O. Schmitt, G. Gadermaier, S. Wessler, F. Ferreira, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 1433.
- [108] M. Reithofer, B. Jahn-Schmid, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [109] A. POMÉS, M.D. CHAPMAN, L.D. VAILES, T.L. BLUNDELL, V. DHANARAJ, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165 (2002) 391-397.
- [110] A. Gustchina, M. Li, S. Wünschmann, M.D. Chapman, A. Pomés, A. Wlodawer, *Journal of Molecular Biology*, 348 (2005) 433-444.
- [111] I.P. Lewkowich, S.B. Day, J.R. Ledford, P. Zhou, K. Dienger, M. Wills-Karp, K. Page, *Respir Res*, 12 (2011) 122.

- [112] J. Zeng, R.A. Dunlop, K.J. Rodgers, M.J. Davies, *The Biochemical journal*, 398 (2006) 197-206.
- [113] A. Rossi, Q. Deveraux, B. Turk, A. Sali, *Biol Chem*, 385 (2004) 363-372.
- [114] J.R. Pungercar, D. Caglic, M. Sajid, M. Dolinar, O. Vasiljeva, U. Pozgan, D. Turk, M. Bogoyo, V. Turk, B. Turk, *Febs j*, 276 (2009) 660-668.
- [115] A. Chevigné, V. Campizi, M. Szpakowska, D. Bourry, M.-E. Dumez, J.C. Martins, A. Matagne, M. Galleni, A. Jacquet, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 1087.
- [116] H. Wan, H.L. Winton, C. Soeller, E.R. Tovey, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, G.A. Stewart, G.W. Taylor, D.R. Garrod, M.B. Cannell, C. Robinson, *The Journal of Clinical Investigation*, 104 (1999) 123-133.
- [117] J.D. Miller, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, (2018).
- [118] A. Chevigne, A. Jacquet, *J Allergy Clin Immunol*, 142 (2018) 398-400.
- [119] M.H. Yi, H.P. Kim, K.Y. Jeong, C.R. Kim, T.Y. Kim, T.S. Yong, *Cytokine*, 75 (2015) 356-364.
- [120] G. Liang, T. Barker, Z. Xie, N. Charles, J. Rivera, K.M. Druey, *J Allergy Clin Immunol*, 129 (2012) 1377-1386 e1313.
- [121] N. Asokanathan, P.T. Graham, D.J. Stewart, A.J. Bakker, K.A. Eidne, P.J. Thompson, G.A. Stewart, *The Journal of Immunology*, 169 (2002) 4572-4578.
- [122] C. Phillips, W.R. Coward, D.I. Pritchard, C.R.A. Hewitt, *Journal of Leukocyte Biology*, 73 (2003) 165-171.
- [123] C.L. Sokol, G.M. Barton, A.G. Farr, R. Medzhitov, *Nat Immunol*, 9 (2008) 310-318.
- [124] E. Di Cera, *IUBMB life*, 61 (2009) 510-515.
- [125] L. Hedstrom, *Chemical Reviews*, 102 (2002) 4501-4524.
- [126] M. Noris, G. Remuzzi, *Seminars in nephrology*, 33 (2013) 479-492.
- [127] R. Gupta, V. Sharma, S. Sridhara, B.P. Singh, N. Arora, *Allergy*, 59 (2004) 421-427.

- [128] H. Chou, M.F. Tam, S.S. Lee, H.Y. Tai, C.Y. Chang, C.T. Chou, H.D. Shen, *International Archives of Allergy and Immunology*, 138 (2005) 134-141.
- [129] V. Pöll, U. Denk, H.-D. Shen, R.C. Panzani, O. Dissertori, P. Lackner, W. Hemmer, A. Mari, R. Cramer, F. Lottspeich, R. Rid, K. Richter, M. Breitenbach, B. Simon-Nobbe, *Molecular Immunology*, 46 (2009) 1360-1373.
- [130] H.-Y. Tai, M.F. Tam, H. Chou, H.-J. Peng, S.-N. Su, D.-W. Perng, H.-D. Shen, *Allergy*, 61 (2006) 382-388.
- [131] H.-D. Shen, M.F. Tam, R.-B. Tang, H. Chou, *Current Allergy and Asthma Reports*, 7 (2007) 351-356.
- [132] S.L. Kale, K. Agrawal, S.N. Gaur, N. Arora, *Scientific reports*, 7 (2017) 42341-42341.
- [133] M.-E. Dumez, N. Teller, F. Mercier, T. Tanaka, I. Vandenberghe, M. Vandenberghe, B. Devreese, A. Luxen, J.-M. Frère, A. Matagne, A. Jacquet, M. Galleni, A. Chevigné, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2008) 30606-30617.
- [134] J. Herman, N. Thelen, N. Smargiasso, A.-C. Mailleux, A. Luxen, M. Cloes, E. De Pauw, A. Chevigné, M. Galleni, M.-E. Dumez, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840 (2014) 1117-1124.
- [135] A. Jacquet, V. Campisi, M. Szpakowska, M.E. Dumez, M. Galleni, A. Chevigne, *Int J Mol Sci*, 18 (2017).
- [136] G. Sun, M.A. Stacey, M. Schmidt, L. Mori, S. Mattoli, *J Immunol*, 167 (2001) 1014-1021.
- [137] S. Post, M.C. Nawijn, T.L. Hackett, M. Baranowska, R. Gras, A.J.M. van Oosterhout, I.H. Heijink, *Thorax*, 67 (2012) 488-495.
- [138] Y. Sakata, K. Arima, T. Takai, W. Sakurai, K. Masumoto, N. Yuyama, Y. Suminami, F. Kishi, T. Yamashita, T. Kato, H. Ogawa, K. Fujimoto, Y. Matsuo, Y. Sugita, K. Izuhara, *J Biol Chem*, 279 (2004) 5081-5087.
- [139] T. Roelandt, C. Heughebaert, J.-P. Hachem, *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (2008) 1878-1880.

- [140] J.C. Powers, J.L. Asgian, Ö.D. Ekici, K.E. James, *Chemical Reviews*, 102 (2002) 4639-4750.
- [141] T.T. Baird, Jr., W.D. Wright, C.S. Craik, *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15 (2006) 1229-1238.
- [142] C. Lopez-Otin, J.S. Bond, *J Biol Chem*, 283 (2008) 30433-30437.
- [143] Y.H. Chen, M.F. Lee, J.L. Lan, C.S. Chen, H.L. Wang, G.Y. Hwang, C.H. Wu, *Allergy*, 60 (2005) 1518-1523.
- [144] P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68 (2008) 12-28.
- [145] V. Laurent-Matha, S. Maruani-Herrmann, C. Prebois, M. Beaujouin, M. Glondu, A. Noel, M.L. Alvarez-Gonzalez, S. Blacher, P. Coopman, S. Baghdigian, C. Gilles, J. Loncarek, G. Freiss, F. Vignon, E. Liaudet-Coopman, *J Cell Biol*, 168 (2005) 489-499.
- [146] E. Liaudet-Coopman, M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondu-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prébois, H. Rochefort, F. Vignon, *Cancer Letters*, 237 (2006) 167-179.
- [147] P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek, *Critical reviews in oncology/hematology*, 68 (2008) 12-28.
- [148] L.K. Arruda, L.D. Vailes, B.J. Mann, J. Shannon, J.W. Fox, T.S. Vedvick, M.L. Hayden, M.D. Chapman, *J Biol Chem*, 270 (1995) 19563-19568.
- [149] R. Sporik, S.P. Squillace, J.M. Ingram, G. Rakes, R.W. Honsinger, T.A. Platts-Mills, *Thorax*, 54 (1999) 675-680.
- [150] D.C. Do, Y. Zhao, P. Gao, *Allergy*, 71 (2016) 463-474.
- [151] D. C, S. Yang, X. Yao, R.G. Hamilton, J.T. Schroeder, P. Gao, *Immunity, Inflammation and Disease*, 5 (2017) 386-399.
- [152] N.W. Wilson, N.P. Robinson, M.B. Hogan, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 83 (1999) 27-30.
- [153] M.F. Lee, C.W. Chang, P.P. Song, G.Y. Hwang, S.J. Lin, Y.H. Chen, *Allergy Asthma Immunol Res*, 7 (2015) 376-383.

- [154] G. Sircar, B. Saha, R.S. Mandal, N. Pandey, S. Saha, S. Gupta Bhattacharya, PLOS ONE, 10 (2015) e0144547.
- [155] K. Jensen, P.R. Østergaard, R. Wilting, S.F. Lassen, BMC biochemistry, 11 (2010) 47-47.
- [156] A.H. Sims, N.S. Dunn-Coleman, G.D. Robson, S.G. Oliver, FEMS Microbiol Lett, 239 (2004) 95-101.
- [157] A.J. O'Donoghue, C.S. Mahon, D.H. Goetz, J.M. O'Malley, D.M. Gallagher, M. Zhou, P.G. Murray, C.S. Craik, M.G. Tuohy, J Biol Chem, 283 (2008) 29186-29195.
- [158] D.S. Auld, Chapter 78 - Catalytic Mechanisms for Metallopeptidases, in: N.D. Rawlings, G. Salvesen (Eds.) Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition), Academic Press 2013, pp. 370-396.
- [159] K.M. Fukasawa, T. Hata, Y. Ono, J. Hirose, Journal of Amino Acids, 2011 (2011).
- [160] N. Giebeler, P. Zigrino, Toxins, 8 (2016) 122-122.
- [161] P.S. Jhund, J.J.V. McMurray, Heart, 102 (2016) 1342-1347.
- [162] Y. Tauchi, H. Tanaka, K. Kumamoto, M. Tokumoto, C. Sakimura, K. Sakurai, K. Kimura, T. Toyokawa, R. Amano, N. Kubo, K. Muguruma, M. Yashiro, K. Maeda, M. Ohira, K. Hirakawa, Cancer Sci, 107 (2016) 1101-1109.
- [163] P. Chaksuwat, S. Sirichotiyakul, S. Luewan, T. Tongsong, Obstetrics and gynecology international, 2018 (2018) 9687042-9687042.
- [164] S. Namvar, P. Warn, E. Farnell, M. Bromley, M. Fraczek, P. Bowyer, S. Herrick, Clinical & Experimental Allergy, 45 (2015) 982-993.
- [165] D. Sbardella, G.F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G.R. Tundo, S. Marini, M. Coletta, Mol Aspects Med, 33 (2012) 119-208.
- [166] P. Cieplak, A.Y. Strongin, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1864 (2017) 1952-1963.
- [167] T. Klein, R. Bischoff, Amino Acids, 41 (2011) 271-290.
- [168] M. Fanjul-Fernández, A.R. Folgueras, S. Cabrera, C. López-Otín, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1803 (2010) 3-19.

- [169] D. Sbardella, G.F. Fasciglione, M. Gioia, C. Ciaccio, G.R. Tundo, S. Marini, M. Coletta, *Molecular Aspects of Medicine*, 33 (2012) 119-208.
- [170] C.M. Overall, G.S. Butler, *Structure*, 15 (2007) 1159-1161.
- [171] K.L. Shaffer, A. Sharma, E.L. Snapp, R.S. Hegde, *Developmental Cell*, 9 (2005) 545-554.
- [172] M.A.M. Ali, A.K. Chow, A.D. Kandasamy, X. Fan, L.J. West, B.D. Crawford, T. Simmen, R. Schulz, *Journal of Cellular Physiology*, 227 (2012) 3397-3404.
- [173] P. Cieplak, A.Y. Strongin, *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1864 (2017) 1952-1963.
- [174] L.M. Crosby, C.M. Waters, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 298 (2010) L715-L731.
- [175] V. Arpino, M. Brock, S.E. Gill, *Matrix Biology*, 44-46 (2015) 247-254.
- [176] A.H. Baker, D.R. Edwards, G. Murphy, *Journal of Cell Science*, 115 (2002) 3719-3727.
- [177] S.V. Yim, S.K. Kim, H.J. Park, H.S. Jeon, B.C. Jo, W.S. Kang, S.M. Lee, J.W. Kim, J.H. Chung, *Molecular Medicine Reports*, 7 (2013) 489-494.
- [178] E. Ganea, M. Trifan, A.C. Laslo, G. Putina, C. Cristescu, *Biochemical Society Transactions*, 35 (2007) 689-691.
- [179] T.N. Wight, C.W. Frevert, J.S. Debley, S.R. Reeves, W.C. Parks, S.F. Ziegler, *Cellular immunology*, 312 (2017) 1-14.
- [180] J.L. Ingram, M. Kraft, *Metalloproteinases In Medicine*, 2 (2015) 61.
- [181] K.S. Smigiel, W.C. Parks, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 147 (2017) 167-195.
- [182] P.E. Van Den Steen, A. Wuyts, S.J. Husson, P. Proost, J. Van Damme, G. Opdenakker, *Eur J Biochem*, 270 (2003) 3739-3749.
- [183] M.-J. Park, J.-S. Shin, Y.-H. Kim, S.-H. Hong, S.-H. Yang, J.-Y. Shin, S.-Y. Kim, B. Kim, J.-S. Kim, C.-G. Park, *Stem Cell Reviews and Reports*, 7 (2011) 381-393.
- [184] J. Mauris, A.M. Woodward, Z. Cao, N. Panjwani, P. Argüeso, *Journal of Cell Science*, 127 (2014) 3141-3148.
- [185] T. Eguchi, S. Kubota, K. Kawata, Y. Mukudai, J. Uehara, T. Ohgawara, S. Ibaragi, A. Sasaki, T. Kuboki, M. Takigawa, *Molecular and Cellular Biology*, 28 (2008) 2391-2413.

- [186] E. Hadler-Olsen, B. Fadnes, I. Sylte, L. Uhlin-Hansen, J.-O. Winberg, *The FEBS Journal*, 278 (2011) 28-45.
- [187] S.E. Gill, W.C. Parks, *Int J Biochem Cell Biol*, 40 (2008) 1334-1347.
- [188] B.A. Mercer, A.M. Wallace, C.E. Brinckerhoff, J.M. D'Armiento, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40 (2009) 4-12.
- [189] L. Todorova, L. Bjermer, A. Miller-Larsson, G. Westergren-Thorsson, *Respiratory Medicine*, 104 (2010) 1799-1808.
- [190] L. Nissinen, V.M. Kahari, *Biochim Biophys Acta*, 1840 (2014) 2571-2580.
- [191] A. Gutiérrez-Fernández, M. Inada, M. Balbín, A. Fueyo, A.S. Pitiot, A. Astudillo, K. Hirose, M. Hirata, S.D. Shapiro, A. Noël, Z. Werb, S.M. Krane, C. López-Otín, X.S. Puente, *The FASEB Journal*, 21 (2007) 2580-2591.
- [192] M. Kotepui, C. Punsawad, C. Chupeerach, A. Songsri, L. Charoenkijkajorn, S. Petmitr, *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 20 (2016) 225-228.
- [193] C. Howell, J.R. Smith, J.K. Shute, *Clinical & Experimental Allergy*, 48 (2018) 1214-1221.
- [194] H. Barksby, J. Milner, A. Patterson, N. Peake, W. Hui, T. Robson, R. Lakey, J. Middleton, T. Cawston, C. Richards, *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 54 (2006) 3244-3253.
- [195] N. Geurts, E. Martens, I. Van Aelst, P. Proost, G. Opdenakker, P.E. Van den Steen, *Biochemistry*, 47 (2008) 2689-2699.
- [196] I. Vanlaere, C. Libert, *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (2009) 224-239.
- [197] J.P. Miller, J. Holcomb, I. Al-Ramahi, M. De Haro, J. Gafni, N. Zhang, E. Kim, M. Sanhueza, C. Torcassi, S. Kwak, *Neuron*, 67 (2010) 199-212.
- [198] R.K. Koppiseti, Y.G. Fulcher, A. Jurkevich, S.H. Prior, J. Xu, M. Lenoir, M. Overduin, S.R. Van Doren, *Nature communications*, 5 (2014) 5552.
- [199] D.J. Marchant, C.L. Bellac, T.J. Moraes, S.J. Wadsworth, A. Dufour, G.S. Butler, L.M. Bilawchuk, R.G. Hendry, A.G. Robertson, C.T. Cheung, *Nature medicine*, 20 (2014) 493.
- [200] D.J. Marchant, C.L. Bellac, T.J. Moraes, S.J. Wadsworth, A. Dufour, G.S. Butler, L.M. Bilawchuk, R.G. Hendry, A.G. Robertson, C.T. Cheung, J. Ng, L. Ang, Z.



- Luo, K. Heilbron, M.J. Norris, W. Duan, T. Bucyk, A. Karpov, L. Devel, D. Georgiadis, R.G. Hegele, H. Luo, D.J. Granville, V. Dive, B.M. McManus, C.M. Overall, *Nature Medicine*, 20 (2014) 493.
- [201] A.M. Houghton, W.O. Hartzell, C.S. Robbins, F.X. Gomis-Rüth, S.D. Shapiro, *Nature*, 460 (2009) 637.
- [202] O. Medina-Contreras, D. Geem, O. Laur, I.R. Williams, S.A. Lira, A. Nusrat, C.A. Parkos, T.L. Denning, *The Journal of clinical investigation*, 121 (2011) 4787-4795.
- [203] F. Travascio, *The Role of Matrix Metalloproteinase in Human Body Pathologies*, IntechOpen 2017.
- [204] M.G. Rohani, W.C. Parks, *Matrix Biology*, 44-46 (2015) 113-121.
- [205] P. Chen, L.E. Abacherli, S.T. Nadler, Y. Wang, Q. Li, W.C. Parks, *PloS one*, 4 (2009) e6565.
- [206] P. Friedl, D. Gilmour, *Nature reviews Molecular cell biology*, 10 (2009) 445.
- [207] G.-E. Kim, J.S. Lee, Y.-D. Choi, K.-H. Lee, J.H. Lee, J.H. Nam, C. Choi, S.S. Kim, M.H. Park, J.H. Yoon, S.-S. Kweon, *BMC cancer*, 14 (2014) 959-959.
- [208] H.I. Park, J. Ni, F.E. Gerkema, D. Liu, V.E. Belozarov, Q.-X.A. Sang, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 20540-20544.
- [209] J.A. Uría, C. López-Otín, *Cancer research*, 60 (2000) 4745-4751.
- [210] G.N. MARCHENKO, B.I. RATNIKOV, D.V. ROZANOV, A. GODZIK, E.I. DERYUGINA, A.Y. STRONGIN, *Biochemical Journal*, 356 (2001) 705-718.
- [211] E. Pirilä, J.T. Korpi, T. Korkiamäki, T. Jahkola, A. Gutierrez-Fernandez, C. Lopez-Otin, U. Saarialho-Kere, T. Salo, T. Sorsa, *Wound Repair and Regeneration*, 15 (2007) 47-57.
- [212] E. Hahn-Dantona, J.F. Ruiz, P. Bornstein, D.K. Strickland, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 15498-15503.
- [213] Z. Yang, D.K. Strickland, P. Bornstein, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 8403-8408.
- [214] A.I. Solli, B. Fadnes, J.-O. Winberg, L. Uhlin-Hansen, E. Hadler-Olsen, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 61 (2013) 444-461.

- [215] M.G. Sans-Fons, S. Sole, C. Sanfeliu, A.M. Planas, *The American journal of pathology*, 177 (2010) 2870-2885.
- [216] Z. Zhang, L.F. Amorosa, S.M. Coyle, M.A. Macor, S.E. Lubitz, J.L. Carson, M.J. Birnbaum, L.Y. Lee, B. Haimovich, *The Journal of Immunology*, 195 (2015) 2452-2460.
- [217] H. Nagase, R. Visse, G. Murphy, *Cardiovasc Res*, 69 (2006) 562-573.
- [218] N. Cui, M. Hu, R.A. Khalil, *Progress in molecular biology and translational science*, 147 (2017) 1-73.
- [219] D. Mao, Y. Zhang, H. Lu, H. Zhang, *Tumor Biology*, 35 (2014) 8217-8223.
- [220] N.S. Templeton, W.G. Stetler-Stevenson, *Cancer Res*, 51 (1991) 6190-6193.
- [221] S. Sultana, R. Adhikary, A. Nandi, B. Bishayi, *Microb Pathog*, 99 (2016) 148-161.
- [222] A. Kaminari, N. Giannakas, A. Tzinia, E.C. Tsilibary, *Scientific Reports*, 7 (2017) 683.
- [223] X. Li, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28 (2018) 31-46.
- [224] M. Abel, H. Vliagoftis, *The Journal of Immunology*, 180 (2008) 3543-3550.
- [225] A.T. Hsu, C.D. Barrett, G.M. DeBusk, C.D. Ellson, S. Gautam, D.S. Talmor, D.C. Gallagher, M.B. Yaffe, *Shock*, 44 (2015) 128-136.
- [226] M. Stankovic, S. Kojic, V. Djordjevic, A. Tomovic, L. Nagorni-Obradovic, N. Petrovic-Stanojevic, M. Mitic-Milikic, D. Radojkovic, *Environ Mol Mutagen*, 57 (2016) 447-454.
- [227] R. Gagliardo, S. La Grutta, P. Chanez, M. Profita, A. Paternò, F. Cibella, J. Bousquet, G. Viegi, M. Gjomarkaj, *Pediatric Allergy and Immunology*, 20 (2009) 780-790.
- [228] S.A. Illman, J. Lohi, J. Keski-Oja, *Exp Dermatol*, 17 (2008) 897-907.
- [229] A.M. Manicone, T.P. Birkland, M. Lin, T. Betsuyaku, N. van Rooijen, J. Lohi, J. Keski-Oja, Y. Wang, S.J. Skerrett, W.C. Parks, *The Journal of Immunology*, 182 (2009) 3866-3876.
- [230] J.J. Atkinson, H.M. Toennies, K. Holmbeck, R.M. Senior, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293 (2007) L600-L610.

- [231] K.J. Greenlee, D.B. Corry, D.A. Engler, R.K. Matsunami, P. Tessier, R.G. Cook, Z. Werb, F. Kheradmand, *The Journal of Immunology*, 177 (2006) 7312-7321.
- [232] B.C. E, *Matrix Metalloproteinases In Health And Disease: Sculpting The Human Body*, World Scientific Publishing Company 2017.
- [233] Y. Itoh, *Matrix Biology*, 44-46 (2015) 207-223.
- [234] E. Llano, A.M. Pendás, J.P. Freije, A. Nakano, V. Knäuper, G. Murphy, C. López-Otín, *Cancer research*, 59 (1999) 2570-2576.
- [235] H. Hayashita-Kinoh, H. Kinoh, A. Okada, K. Komori, Y. Itoh, T. Chiba, M. Kajita, I. Yana, M. Seiki, *Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research*, 12 (2001) 573.
- [236] T. Kang, J. Yi, A. Guo, X. Wang, C.M. Overall, W. Jiang, R. Elde, N. Borregaard, D. Pei, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 21960-21968.
- [237] M.N. Blumenthal, W. Zhong, M. Miller, C. Wendt, J.E. Connett, D. Pei, *Clin Exp Allergy*, 40 (2010) 859-866.
- [238] D. Pei, T. Kang, H. Qi, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2000) 33988-33997.
- [239] G. Velasco, A.M. Pendás, A. Fueyo, V. Knäuper, G. Murphy, C. López-Otín, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (1999) 4570-4576.
- [240] R. Roychaudhuri, G. Sarath, M. Zeece, J. Markwell, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1699 (2004) 207-212.
- [241] S.N. Georas, F. Rezaee, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134 (2014) 509-520.
- [242] J. Shi, Q. Luo, F. Chen, D. Chen, G. Xu, H. Li, *ORL*, 72 (2010) 256-265.
- [243] H.F. Kauffman, M. Tamm, J.A.B. Timmerman, P. Borger, *Clinical and molecular allergy : CMA*, 4 (2006) 5-5.
- [244] H. Akel, D. Karaguzel, E. Birben, O. Kalayci, C. Karaaslan, SERPINB3 response to Der p1 stimulation in airway epithelial cell is partially PAR-2 dependent, *ALLERGY, WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA*, 2018, pp. 244-244.

- [245] H. Akel, D. Karaguzel, E. Birben, C. Karaaslan, O. Kalayci, The protease inhibitor profile of the airway epithelial cell lines after Der p1 stimulation, *ALLERGY, WILEY 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA*, **2018**, pp. 827-828.
- [246] W.-C. Wang, J.-J. Tsai, C.-Y. Kuo, H.-M. Chen, S.-H. Kao, *Journal of Cellular Biochemistry*, 112 (**2011**) 1544-1551.
- [247] W.-C. Wang, C.-Y. Kuo, B.-S. Tzang, H.-M. Chen, S.-H. Kao, *Journal of Cellular Biochemistry*, 113 (**2012**) 3567-3575.
- [248] H. Wan, H.L. Winton, C. Soeller, G.W. Taylor, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, M.B. Cannell, G.A. Stewart, D.R. Garrod, C. Robinson, *Clinical & Experimental Allergy*, 31 (**2001**) 279-294.
- [249] A.A. Kamat, M. Fletcher, L.M. Gruman, P. Mueller, A. Lopez, C.N. Landen, Jr., L. Han, D.M. Gershenson, A.K. Sood, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12 (**2006**) 1707-1714.
- [250] R. Roy, G. Louis, K.R. Loughlin, D. Wiederschain, S.M. Kilroy, C.C. Lamb, D. Zurakowski, M.A. Moses, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14 (**2008**) 6610-6617.
- [251] H. Lemjabbar, P. Gosset, C. Lamblin, I. Tillie, D. Hartmann, B. Wallaert, A.B. Tonnel, C. Lafuma, *Am J Respir Crit Care Med*, 159 (**1999**) 1298-1307.
- [252] C.-Y. Huang, Y.-C. Fong, C.-Y. Lee, M.-Y. Chen, H.-C. Tsai, H.-C. Hsu, C.-H. Tang, *Biochemical pharmacology*, 77 (**2009**) 794-803.
- [253] K. Agrawal, N. Arora, *Allergy*, 73 (**2018**) 569-575.
- [254] T.-x. Xie, D. Wei, M. Liu, A.C. Gao, F. Ali-Osman, R. Sawaya, S. Huang, *Oncogene*, 23 (**2004**) 3550-3560.
- [255] S.J. Koppelman, C.A. Bruijnzeel-Koomen, M. Hessing, H.H. de Jongh, *J Biol Chem*, 274 (**1999**) 4770-4777.
- [256] P. Johansen, G. Senti, J.M. Martínez Gómez, B. Wüthrich, A. Bot, T.M. Kündig, *European Journal of Immunology*, 35 (**2005**) 3591-3598.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19 /07 /2019

Tez Başlığı / Konusu: Hava Yolu Epitel Hücrelerinde Alerjen Proteazların Matriks Proteazların Salımı Üzerine olan Etkileri

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 61 sayfalık kısmına ilişkin, 19/07/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Dilara KARAGÜZEL  
Öğrenci No: N16123833  
Anabilim Dalı: Biyoloji  
Programı:  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

19.07.2019

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilara KARAGÜZEL  
Doğum yeri : Kadıköy - İSTANBUL  
Doğum tarihi : 14.01.1994  
Medeni hali : Bekar  
Yazışma adresi : Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Biyoloji Bölüm,  
Moleküler Biyoloji A.B.D. 06800 Çankaya ANKARA  
Telefon : 05379718190  
Elektronik posta adresi : dilarakaraguzel@gmail.com  
Yabancı dili : İngilizce (iyi)  
Fransızca (başlangıç)

### EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans :  
Doktora :

### İş Tecrübesi

2018- ----- Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü – Araştırma Görevlisi

### Diğer