

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNFLAMATUVAR HÜCRE GÖÇÜ SÜRECİNDE  
PYRİN VE AKTİN İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN  
MOLEKÜLER ANALİZİ**

**Cansın GÜLER**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2014**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNFLAMATUVAR HÜCRE GÖÇÜ SÜRECİNDE  
PYRİN VE AKTİN İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN  
MOLEKÜLER ANALİZİ**

**Cansın GÜLER**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU**

**ANKARA  
2014**

Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji  
 Program :Tıbbi Biyoloji  
 Tez Başlığı :İnflamatuvar Hücre Göçü Sürecinde Pyrin ve Aktin  
 ile İlişkili Proteinlerin Moleküler Analizi  
 Öğrenci Adı-Soyadı :Cansın GÜLER  
 Savunma Sınavı Tarihi :12.02.2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

**Prof. Dr. Engin YILMAZ**

**Hacettepe Üniversitesi**

Tez danışmanı:

**Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU**

**Hacettepe Üniversitesi**

Üye:

**Prof. Dr. Serap DÖKMECİ**

**Hacettepe Üniversitesi**

Üye:

**Prof. Dr. Nuhan PURALI**

**Hacettepe Üniversitesi**

Üye:

**Doç. Dr. Didem DAYANGAÇ-ERDEN**

**Hacettepe Üniversitesi**

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür Y.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgisi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve desteğiyle her zaman yanımda olan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'na;

Görüşleri ve fikirleri ile çalışmalarına her zaman önemli katkılarda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Engin YILMAZ'a,

Konfokal mikroskopu ile görüntüleme sürecinde bana içtenlikle ve sabırla zamanını ayırarak yardımcı olan Prof. Dr. Nuhan PURALI'ya;

Tez çalışmam sürecinde yardımlarına, fikirlerine ve deneyimlerine başvurduğum çalışma arkadaşım Uzm. Bio. Yeliz AKKAYA-ULUM'a;

İyi ve kötü her anımda yanımda olan ve bu zorlu süreçte bana yol arkadaşı olan Uzm. Bio. Gülsüm KAYMAN-KÜREKÇİ'ye;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana bilgileriyle ışık tutan tüm değerli hocalarıma;

Her türlü desteğiyle yardımlarını eksik etmeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışanlara ve sevgili arkadaşlarıma;

Yüksek lisans tez dönemim boyunca TÜBİTAK-1001-SBAG-111S507 projesi kapsamında aldığım burs için TÜBİTAK'a;

Sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, en kötü zamanlarımda beni neşelendirerek yanımda olan çok değerli dostlarıma;

Maddi ve manevi sonsuz destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiğim canım aileme;

Bugünlere kadar başarılı bir şekilde gelmemi sağlayan, her şeyden önce bana iyi bir insan olmayı öğreten, varlığını her zaman içimde hissettiğim, hayatımdan zamansız şekilde ayrılan canımdan çok sevdiğim melek yüzlü biricik ANNEM'e;

En içten ve sonsuz duygularıyla teşekkür ederim.

## ÖZET

**Güler, C. İnflamatuvar Hücre Göçü Sürecinde Pyrin ve Aktin ile İlişkili Proteinlerin Moleküler Analizi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014.** Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığına neden olan MEFV geni, inflamasyonda önemli bir işlevi olduğu düşünülen Pyrin proteinini kodlamaktadır. Öncelikli olarak nötrofiller ve monositlerde ifade olan Pyrin proteininin, AAA hastalığındaki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Pyrinin hücre iskeleti elemanları ile yakın ilişkide olduğunu gösteren birçok çalışma, bu proteinin inflamatuvar hücre göçü sürecinde işlevi olabileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında; literatür bilgilerinden yola çıkılarak belirlenen, aktin iskeleti düzeneğinde işlev gören ve daha önceden hücre göçü süreci ile ilişkilendirilmiş olan PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1, DAAM1 ve ACTR2 proteinlerinin, inflamatuvar hücre göçü sürecinde Pyrin ile olan ilişkileri araştırılmıştır. İlgili genler, hücre göçü modeli oluşturulmuş nötrofil-benzeri HL-60 hücrelerinde kGZ-PZR, PZR ve IF boyama yöntemleri ile RNA ve protein seviyesinde incelenmiştir. Aktin ile ilişkili ilgili genlerin, HL-60 hücrelerinde ifade olduğu ve ifadelerinin özellikle farklılaşma sürecinde arttığı görülmüştür. MEFV geninin ise, farklılaşmış ve göçe-uyarılmış hücrelerde ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Pyrinin normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada, farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize uçlara ve hücre uzantılarına doğru yerleşimi olduğu gösterilmiştir. Aktin ile ilişkili ilgili proteinlerin de; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde Pyrin ile birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Göç sürecinde ise, Pyrinin bu proteinlerle hücrelerin polarize uçlarında ve hücre uzantılarında birlikte yerleşimleri olduğu gösterilmiştir. Bu proteinlerden PSTPIP2, LPXN, LSP1 ve FMNL1'in, özellikle göç sürecinde Pyrin ile kuvvetli birliktelikleri olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışması, Pyrinin güçlü birliktelik gösterdiği proteinler aracılığıyla aktin düzeneğine dahil olabileceğini göstermesi ve Pyrinin aktin iskeleti üzerinden inflamatuvar hücre göçü sürecinde rol alabileceğini desteklemesi açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** AAA, inflamasyon, hücre göçü, Pyrin, aktin

**Destekleyen Kurum:** TÜBİTAK, 1001-SBAG-111S507

## ABSTRACT

**Güler, C. Molecular Analysis of Pyrin and Actin-Related Proteins During Inflammatory Cell Migration. Hacettepe University Institute of Health Sciences, M.Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2014.** MEFV gene, encodes Pyrin protein, cause familial Mediterranean fever (FMF). Pyrin which is primarily expressed in neutrophils and monocytes, appears to be a regulator of inflammation, but its exact role on FMF pathophysiology is still controversial. Several studies have been demonstrated a close relation between Pyrin and the cytoskeletal elements. Therefore we hypothesized that Pyrin can play role in inflammatory cell migration. In this thesis, we analyzed known actin-related proteins that have roles in cell migration; PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNA1, WDR1, FMNL1, DAAM1, ACTR2 and the interaction of Pyrin with these proteins during inflammatory cell migration process. Related genes were investigated on both RNA and protein levels using qRT-PCR, PCR and IF staining techniques in neutrophil-like HL-60 cells. We demonstrated that actin-related genes are expressed in HL-60 cells and RNA levels increase significantly during differentiation. MEFV expression is also increased in differentiated and differentiated-stimulated HL-60 cells. IF stainings showed that Pyrin is cytoplasmic in normal and differentiated cells but it localizes much more in polarized edge of the cells and in cell protrusions during cell migration. We also demonstrated that actin-related proteins co-localize with Pyrin in normal, differentiated and differentiated-stimulated cells. During migration, co-localization was observed mostly in polarized edges and protrusions. PSTPIP2, LPXN, LSP1 and FMNL1 proteins demonstrate a strong co-localization with Pyrin especially in migration process. This study has importance in terms of showing the potential involvement of Pyrin to actin machinery via actin-related proteins that have strong co-localization, and supporting the idea of the possible role of Pyrin in inflammatory cell migration through actin skeleton.

**Keywords:** FMF, inflammation, cell migration, Pyrin, actin

**Supporting institution:** TUBITAK, 1001-SBAG-111S507

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xiii
TABLOLAR	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Göçü	3
2.2. İnflamatuvar Hücre Göçü	3
2.2.1. Nötrofiller	4
2.2.2. İnflamatuvar hücre göçünde hücre dışı süreçler	4
2.2.3. İnflamatuvar hücre göçünde hücre içi süreçler	6
2.3. İnflamatuvar Hücre Göçü ve Otoinflamatuvar Hastalıklar	7
2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA)	8
2.4.1. MEFV geni	9
2.4.2. Pyrin proteini	9
2.5. Aktin ve Aktin ile İlişkili Proteinler	14
2.5.1. PSTPIP2 ( <i>Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2</i> )	15
2.5.2. LSP1 ( <i>Leukocyte-specific protein 1</i> )	16
2.5.3. LPXN ( <i>Leupaxin</i> )	18
2.5.4. CORO2A ( <i>Coronin 2A</i> )	19
2.5.5. CTNNB1 ( <i><math>\beta</math>-catenin 1</i> )	20
2.5.6. WDR1 ( <i>WD-repeat containing protein 1</i> )	21
2.5.7. FMNL1 ( <i>Formin-like protein 1</i> )	22
2.5.8. DAAM1 ( <i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1</i> )	23
2.5.9. ACTR2 ( <i>Arp2, Actin-related protein 2</i> )	24



	Sayfa
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Gereçler	26
3.1.1. RNA izolasyonu	26
3.1.2. cDNA sentezi	26
3.1.3. Kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ-PZR)	26
3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	27
3.1.5. Agaroz jel elektroforezi	27
3.1.6. İmmünfloresan (IF) boyama	27
3.2. Yöntemler	28
3.2.1. RNA izolasyonu	29
3.2.2. RNA derişimlerinin ölçümü ve saflık kontrolü	30
3.2.3. cDNA sentezi	31
3.2.4. Kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ-PZR)	32
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	37
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi	38
3.2.7. İmmünfloresan (IF) boyama	39
3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler	42
4. BULGULAR	44
4.1. RNA Derişimleri ve Saflıkları	44
4.2. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kGZ-PZR)	45
4.2.1. cDNA kontrolü	45
4.2.2. ACTB geni ifade analizi	45
4.2.3. PSTPIP2 geni ifade analizi	46
4.2.4. LSP1 geni ifade analizi	47
4.2.5. LPXN geni ifade analizi	48
4.2.6. CORO2A geni ifade analizi	49
4.2.7. CTNNB1 geni ifade analizi	50
4.2.8. WDR1 geni ifade analizi	51
4.2.9. FMNL1 geni ifade analizi	52
4.2.10. DAAM1 geni ifade analizi	53
4.2.11. ACTR2 geni ifade analizi	54

	Sayfa
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	56
4.3.1. MEFV geni ifade analizi	56
4.4. İmmü floresan (IF) Boyama	57
4.4.1. Optimizasyon boyamaları	57
4.4.2. Pürin ve aktin ile ilişkili proteinlerin eş boyamaları	60
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	94
EKLER	
EK 1. cDNA örneklerinin kontrolünde kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları	
EK.2. ACTB gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 3. PSTPIP2 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 4. LSP1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 5. LPXN gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 6. CORO2A gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 7. CTNFB1gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 8. WDR1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 9. FMNL1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 10.DAAM1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	
EK 11.ACTR2 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
ACTB	$\beta$ -aktin
ACTR2	<i>Actin-related protein 2, Arp2</i>
ADP	Adenozin difosfat
ARM	<i>Armadillo</i>
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i>
Arp3	<i>Actin-related protein 3</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein with CARD domain</i>
ATP	Adenozin trifosfat
BB-ZF	<i>B-box zinc finger</i>
bç	Baz çifti
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
$\beta$ -Me	$\beta$ -merkaptetanol
CC	<i>Coiled-coil</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
cDNA	Komplementer DNA
CIP4	<i>Cdc4-interacting protein 4</i>
CORO2A	<i>Coronin 2A</i>
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTNNB1	<i><math>\beta</math>-catenin 1</i>
COS-7	<i>CV-7 in origin from kidney cells, carrying the SV40</i>
DAAM1	<i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1</i>
DAD	<i>Diaphanous auto-regulatory domain</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietil pirokarbonat
DID	<i>Diaphanous inhibitory domain</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
DRF	<i>Diaphanous-related formins</i>

Dvl	<i>Dishevelled</i>
EtBr	Etidyum bromür
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
Fc	<i>Fragment, crystallizable</i>
FCH	<i>Fes-CIP4 homology</i>
FH	<i>Formin homology</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine</i>
FMNL1	<i>Formin-like protein 1</i>
FRL	<i>Formin-related gene in leukocytes</i>
Fz	<i>Frizzled</i>
GBD	<i>GTPase binding domain</i>
gDNA	Genomik DNA
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptors</i>
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cell line</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell line</i>
IF	İmmünfloresan
IFN- $\gamma$	İnterferon- $\gamma$
IL-1 $\beta$	İnterlökin-1- $\beta$
kb	Kilobaz
kGZ-PZR	Kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
LD	<i>Leucine-aspartate</i>
LIM	<i>Lin-11 Isl-1 Mec-3</i>
LPS	Lipopolisakkarit
LPXN	<i>Leupaxin</i>
LSP1	<i>Leukocyte-specific protein 1</i>
MAPKAPK2	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>
MEFV	<i>Mediterranean fever</i>
MTLn3	<i>Metastatic rat mammary adenocarcinoma cell line</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NF- $\kappa$ B	Nucleer faktör kappa-B
PAPA	<i>Pyogenic sterile arthritis pyoderma gangrenosum and acne</i>

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC-3	<i>Human prostate cancer cell line</i>
PCH	<i>Pombe Cdc 15 homology</i>
PEST	<i>Proline-glutamic acid-serine-threonine rich</i>
PFA	<i>Paraformaldehyt</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PSTPIP1	<i>Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1</i>
PSTPIP2	<i>Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2</i>
PTP-HSCF	<i>Protein tyrosine phosphatase hematopoietic stem cell fraction</i>
PTP-PEST	<i>PEST-type protein tyrosine phosphatase</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
Pyk2	<i>Proline-rich tyrosine kinase 2</i>
PZR	<i>Polimeraz zincir reaksiyonu</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rho	<i>Ras homolog gene family</i>
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
TAE	<i>Tris-asetat-EDTA</i>
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tümör nekroz faktör-<math>\alpha</math></i>
TRIM20	<i>Tripartite motif-containing protein 20</i>
U937	<i>Human leukemic monocyte lymphoma cell line</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
WASp	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome protein</i>
WD	<i>Tryptophan-aspartate</i>
WDR1	<i>WD-repeat containing protein 1</i>
WIPF3	<i>WAS/WASL interacting protein family, member</i>

## ŞEKİLLER

	Sayfa	
Şekil 2.1.	Dolaşımında bulunan nötrofillerin inflamatuvar dokulara göç etmeleri sürecinde gerçekleşen aşamalar	5
Şekil 2.2.	Hareket eden hücrelerin oluşturdukları uzantılar ve bu süreçte geçirdikleri aşamalar	7
Şekil 2.3.	Pyrin proteininin domainleri	10
Şekil 2.4.	Aktin-Pyrin, Arp3-Pyrin ve VASP-Pyrin proteinlerinin insan monositlerinde birlikte yerleşimleri	12
Şekil 2.5.	Yara iyileşmesi deney sisteminde HeLa hücrelerinde Pyrin-GFP yerleşiminin floresan ve ışık mikroskobu görüntüleri	13
Şekil 2.6.	Pyrin ve PSTPIP1'in nötrofile farklılaştırılan ve göçe tetiklenen HL-60 hücrelerinin polarize öncü ucundaki birlikte yerleşimleri	13
Şekil 2.7.	F-aktin ve PSTPIP2'nin makrofaj hücre hatlarındaki yerleşimleri	16
Şekil 2.8.	Fosforlanmış ve fosforlanmamış LSP1'in göçe tetiklenmiş nötrofillerde F-aktin ile birlikte yerleşimleri	17
Şekil 2.9.	LPXN ve F-aktinin lenfoblastoid hücre hatlarındaki yerleşimleri	18
Şekil 2.10.	CORO2A ve F-aktinin adenokarsinoma hücre hatlarındaki yerleşimleri	19
Şekil 2.11.	CTNNB1'in sitoplazma ve çekirdekteki farklı işlevleri	21
Şekil 2.12.	Kaspaz-11-WDR1-F-aktin-kofilin aracılı aktin depolimerizasyonu	22
Şekil 2.13.	F-aktin ve FMNL1'in sitotoksik T hücrelerindeki birlikte yerleşimleri	23
Şekil 2.14.	DAAM1'in <i>non-canonical</i> Wnt sinyal yolağındaki rolü	24
Şekil 2.15.	Arp2/3 kompleksinin üç boyutlu yapısı ve aktin filamentlerine bağlanma bölgesi	25
Şekil 3.1.	<i>SYBR Green</i> boyası kullanılarak gerçekleştirilen kGZ-PZR yönteminin aşamaları	32
Şekil 3.2.	Birlikte yerleşim gösteren iki protein için çizilen korelasyon eğrisinin beklenen görüntüsü	43

	Sayfa
Şekil 4.1. cDNA örneklerinde ACTB geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	45
Şekil 4.2. PSTPIP2 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	46
Şekil 4.3. LSP1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	47
Şekil 4.4. LPXN geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	48
Şekil 4.5. CORO2A geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	49
Şekil 4.6. CTNNB1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	50
Şekil 4.7. WDR1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	51
Şekil 4.8. FMNL1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	52
Şekil 4.9. DAAM1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	53
Şekil 4.10. ACTR2 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları	54
Şekil 4.11. Aktin ile ilişkili ilgili genlerin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları ve istatistiksel anlamlılıkları	55
Şekil 4.12. Normal, farklılaşmış, farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücreleri ve THP-1 hücrelerinde MEFV ve ACTB genlerinin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	56
Şekil 4.13. Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde yapılan aktin ve DAPI boyamalarının immünfloresan mikroskop görüntüleri	57
Şekil 4.14. IF boyamaların negatif kontrollerinin görüntüsü	58
Şekil 4.15. PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1 ve DAAM1 proteinlerinin optimizasyon boyamalarının immünfloresan mikroskop görüntüleri	59

Şekil 4.16.	Pyrinin normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerindeki yerleşiminin konfokal mikroskobu görüntüleri	60
Şekil 4.17.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	61
Şekil 4.18.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	62
Şekil 4.19.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	63
Şekil 4.20.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-LSP1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	64
Şekil 4.21.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LSP1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	65
Şekil 4.22.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LSP1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	66
Şekil 4.23.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	67
Şekil 4.24.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	68
Şekil 4.25.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	69



Şekil 4.26.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-CORO2A proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	70
Şekil 4.27.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CORO2A proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	71
Şekil 4.28.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CORO2A proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	72
Şekil 4.29.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-CTNNB1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	73
Şekil 4.30.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CTNNB1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	74
Şekil 4.31.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CTNNB1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	75
Şekil 4.32.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-WDR1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	76
Şekil 4.33.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-WDR1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	77
Şekil 4.34.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-WDR1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	78
Şekil 4.35.	Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-FMNL1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	79

Şekil 4.36.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pýrin-FMNL1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	80
Şekil 4.37.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pýrin-FMNL1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	81
Şekil 4.38.	Normal HL-60 hücrelerinde Pýrin-DAAM1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	82
Şekil 4.39.	Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pýrin-DAAM1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	83
Şekil 4.40.	Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pýrin-DAAM1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri	84

## TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 3.1. kGZ-PZR deneylerinde uygulanan reaksiyon koşulları	35
Tablo 3.2. Primer dizileri ve amplikon boyları	36
Tablo 3.3. PZR deneylerinde uygulanan reaksiyon koşulları	38
Tablo 3.4. IF boyamalarda kullanılan primer antikorlara ait dilüsyon oranları	41
Tablo 3.5. IF boyamalarda kullanılan sekonder antikorlara ait dilüsyon oranları	42
Tablo 4.1. Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış hücrelerden elde edilen RNA derişim değerleri ve saflık oranları	44

## 1. GİRİŞ

Doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olan inflamasyon; patojenler, hasarlı hücreler ya da irritanlar gibi zararlı uyarılara karşı organizmanın verdiği biyolojik bir cevaptır. Hasarlı bölgedeki çeşitli hücreler, vasküler sistem ve bağışıklık sistemini kapsayan bir yolak ile inflamatuvar cevap oluşturulur (1).

İnflamasyon süreci, ilk olarak nötrofillerin ve daha sonra diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin hasarlı dokudan gelen kemoatraktan sinyaller doğrultusunda inflamatuvar bölgeye doğru göç etmeleri ile başlamaktadır. Hasarlı dokuda bir araya gelerek bölgedeki ilk savunmayı gerçekleştiren nötrofiller, bu süreçte rol oynayan önemli bir hücre grubudur (2, 3). Nötrofilleri göçe tetikleyecek sinyallerin algılanmasıyla hücre içerisinde ilgili yolaklar aktive olur, hücre iskeleti organizasyonu yeniden düzenlenir ve hücreler hareket edebilecekleri bir morfoloji kazanır (4, 5). Bu aşamada, hücre iskeletinin önemli bir yapıtaşı olan aktin ve aktine-bağlanan proteinler, hücrelerin göç etme sürecinde önemli işlevlere sahiptir (6).

Organizma açısından önemli bir süreç olan inflamatuvar hücre göçü, özellikle otoinflamatuvar hastalıkların patogenezi açısından dikkat çekmektedir (7). Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) (OMIM:249100), doğal bağışıklık sisteminin kontrolsüz inflamatuvar cevap oluşturması sonucu ortaya çıkan monogenik otoinflamatuvar bir hastalıktır. Mutant durumda AAA hastalığına neden olan MEFV (*MEditerranean FeVer*) (MIM:608107) geni, inflamasyonda önemli bir işlevi olduğu düşünülen Pyrin proteinini kodlamaktadır (8). Öncelikli olarak nötrofiller ve monositlerde ifade olan Pyrin proteininin, AAA hastalığındaki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar, Pyrinin hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar işlevleri olabileceğini göstermektedir (9).

Pyrin, interaksiyona girdiği proteinler aracılığı ile hücre iskeleti organizasyonu, apoptoz ve sitokin salınımı gibi inflamasyonla ilişkili süreçlerde rol oynamaktadır (10). Son yıllarda, Pyrinin hücre iskeleti elemanları ile yakın ilişkide olduğunu gösteren birçok çalışma da, bu proteinin inflamatuvar hücre göçü sürecinde işlevi olabileceğini düşündürmektedir. Pyrinin, özellikle hücre iskeleti elemanlarıyla

ilişkili ve hücre göçünde işlevi olduğu düşünülen PSTPIP1 (*Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1*) proteini ile interaksiyona girdiğini (11) ve göç eden hücrelerde aktin ve aktin ile ilişkili proteinlerle birlikte yerleşimi olduğunu gösteren çalışmalar (12), Pürinin inflamatuvar hücre göçü sürecinde rol alabileceğini destekleyen önemli çalışmalardır.

Pürinin inflamatuvar hücre göçü yolağındaki rolünün belirlenebilmesi için ön araştırma niteliğinde olan bu tez çalışması; Pürinin inflamatuvar hücre göçü sürecinde, aktin ile ilişkili PSTPIP2 (*Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2*), LSP1 (*Leukocyte-specific protein 1*) ([MIM:153432](#)), LPXN (*Leupaxin*) ([MIM:605390](#)), CORO2A (*Coronin 2A*) ([MIM:602159](#)), CTNNB1 ( $\beta$ -*catenin*) ([MIM:116806](#)), WDR1 (*WD-repeat containing protein 1*) ([MIM:604734](#)), FMNL1 (*Formin-like 1*) ([MIM:604656](#)), DAAM1 (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*) ([MIM:606626](#)) ve ACTR2 (*Arp2, Actin-related protein 2*) ([MIM:604221](#)) proteinleri ile olan ilişkisinin incelenmesini kapsamaktadır. Bu amaçla, *in vitro* göç modeli oluşturulmuş nötrofil-benzeri HL-60 hücre hatları kullanılarak ilgili 10 gen/gen ürünü RNA ve protein seviyesinde incelenmiştir.

Yapılan deneysel araştırmalar ile inflamatuvar hücre göçü sürecinde ilgili genlerin ifadelerinde anlamlı değişiklikler olduğu ve proteinlerinin de Pürin ile birlikte yerleşim gösterdiği bulguları elde edilmiştir.

Bu tez sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda yapılacak ileri araştırmalar, inflamatuvar hücre göçü yolağının ve Pürinin bu yolaktaki rolünün aydınlatılmasına olanak sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücre Göçü

Hücre göçü, çok hücreli organizmaların gelişimi ve sürekliliğinde merkezi rol oynayan bir süreçtir. Bazı hücreler, çeşitli amaçlar için buldukları yerden başka bir yere doğru hareket etme özelliğine sahiptir. Ökaryotik hücrelerde oldukça karmaşık mekanizmalarla gerçekleşen hücre göçü, organizmanın devamlılığı için kritik öneme sahip olan bir süreçtir (13).

Çeşitli hücre tipleri, farklı zamanlarda farklı işlevleri yerine getirmek için göç etmelidirler. Örneğin, gelişim sürecinde embriyonik kök hücreler, bir doku veya bir organı oluşturmak üzere programlandıkları yere doğru göç ederler. Doku yenilenmesi sürecinde, fibroblastlar ve epitel hücreler tamiri yapılacak dokuya doğru göç etmelidir. Bunun dışında, kanser hücrelerinin buldukları dokudan sağlıklı dokulara metastaz yapması da bir göç hareketidir. Diğer bir göç hareketi de; nötrofil, makrofaj, monosit ve lenfosit gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin, vücutta meydana gelen bir inflamasyon sonucu bağışıklık sistemi cevabını oluşturmak üzere inflamatuvar bölgeye doğru göç etmesidir (13, 14).

### 2.2. İnflamatuvar Hücre Göçü

Doğal bağışıklık, vücudun zararlı iç ve dış etkilere karşı özgül olmayan şekilde korunmasını sağlayan bir savunma sistemidir. Patojenler ve zararlı uyarılar gibi enfeksiyon ya da irritasyon oluşturabilecek durumlara karşı organizmanın oluşturduğu ilk biyolojik cevap olan inflamasyon, doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçasını oluşturmaktadır (15).

İnflamasyon; hasarlı bölgedeki hücreler, bağışıklık sistemi hücreleri ve vasküler sistemden oluşan bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Hasarlı bölgedeki hücreler tarafından salınan sinyaller, bağışıklık sistemi hücrelerinin inflamatuvar bölgeye doğru hareketini tetiklemektedir. Hücrelerin inflamasyon kaynağına doğru göç etmesi, inflamasyon sürecinin en önemli basamağını oluşturmaktadır (16)

İnflamatuvar hücre göçü, doğal bağışıklık sistemi hücreleri olan lökositler tarafından gerçekleşmektedir. Hasarlı dokuya ilk ulaşan hücreler nötrofiller olup daha sonra monositler, lenfositler ve diğer bağışıklık sistemi hücreleri de bu sürece katılmaktadır (17).

### **2.2.1. Nötrofiller**

Nötrofiller, tüm lökositler içerisinde kanda en çok bulunan (% 50-70) doğal bağışıklık sistemi hücreleridir. Bazofil ve eozinofillerle birlikte polimorfonükleer hücre grubunu oluşturan nötrofiller, sahip oldukları özel granüler yapıları ile vücut savunmasında ön saflarda rol oynarlar. Dolaşımda serbest halde inaktif olarak bulunan nötrofiller, küre biçiminde bir morfolojiye sahiptir. Aktive olduklarında ise, daha amorf ya da amip-benzeri bir yapı alarak pseudopod yapılarını membrandan dışarı doğru uzatırlar. Dolaşımda serbest bulunan nötrofillerin ortalama yaşam süresi yaklaşık 5 gündür. Aktive olup dokulara göç ettikleri zaman ise, dokularda 1-2 gün hayatta kalabilmektedirler (18).

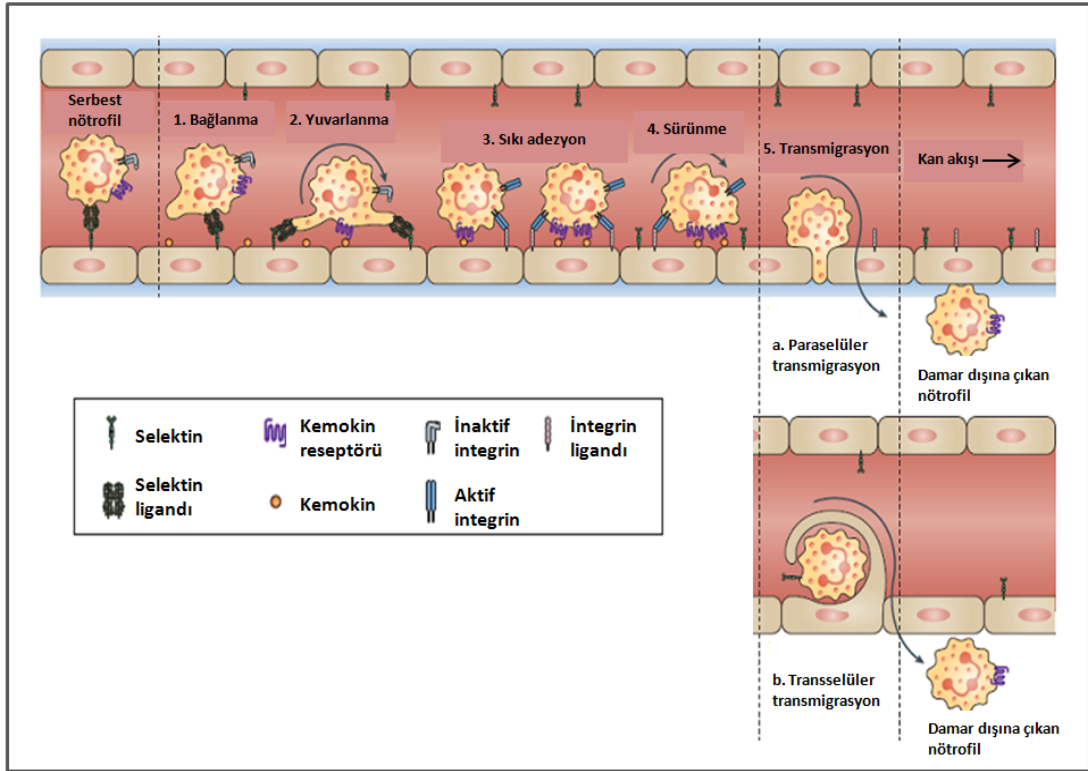
Dokulara göç eden nötrofiller, birkaç saat içinde inflamasyon bölgesine toplanarak orada ilk savunmayı gerçekleştirirler. Çok hareketli hücreler oldukları için hızlı bir şekilde bir araya gelebilmektedirler. Nötrofillerin hasarlı bölgeye göçü; aktive olmuş endotel hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar tarafından salınan sitokinlerce tetiklenmektedir (18).

Nötrofiller, patojenleri fagositoz ve anti-mikrobiyal granül salınımı gibi mekanizmalarla hücre içinde veya hücre dışında elimine edebilmektedir. İnflamasyon sürecinde dokularda sayıca artan nötrofiller, oradaki görevlerini tamamladıktan sonra apoptoza girerler. Hücre kalıntıları ise, makrofaj ve dendritik hücreler tarafından fagositozla yok edilir (18).

### **2.2.2. İnflamatuvar hücre göçünde hücre dışı süreçler**

Nötrofillerin, inflamatuvar bölgeye toplanması genel olarak 5 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar; bağlanma, yuvarlanma, adezyon, sürünme ve transmigrasyondur (Şekil 2.1). Dokulardaki lökositler patojenlerle karşılaştığında,

bazı inflamatuvar sinyaller salarak endotel hücrelerinin yüzeyinde değişiklikler meydana getirmektedir. Bu durum, nötrofillerin bir araya gelerek toplanması ve hasarlı dokuya doğru göç etmesini başlatır (18).



**Şekil 2.1.** Dolaşımda bulunan nötrofillerin inflamatuvar dokulara göç etmeleri sürecinde gerçekleşen aşamalar (18).

İnflamasyonun ilk aşamasında, hasarlı dokudaki hücreler tarafından üretilen kemoatraktan sinyaller, endotel hücrelerinin yüzeyinde selektinlerin sentezlenmesini sağlayarak bu hücreleri aktive eder. Endotelysel selektinler, dolaşımda bulunan nötrofillerin yüzeyindeki selektinlerle birleşerek, nötrofillerin yüzeye bağlanmasını ve endotel üzerinde yuvarlanmasını sağlar (Şekil 2.1. - 1. ve 2. aşama). Nötrofillerin membranlarındaki GPCR (*G-protein coupled receptors*) ile hasarlı dokudan salınan kemoatraktan sinyaller tanınır ve nötrofiller aktive olur. Bu süreçte, nötrofillerin yüzeyindeki integrinlerin de aktive olmasıyla birlikte hücreler endotele sıkıca tutunur (Şekil 2.1. - 3. aşama). Bu sıkı adezyon ile nötrofiller endotel yüzeyi boyunca sürünmeye başlar (Şekil 2.1. - 4. aşama). Son olarak, nötrofiller diyapedez hareketi ile endotel hücreleri arasından (paraselüler) veya içerisinden (transselüler) geçerek

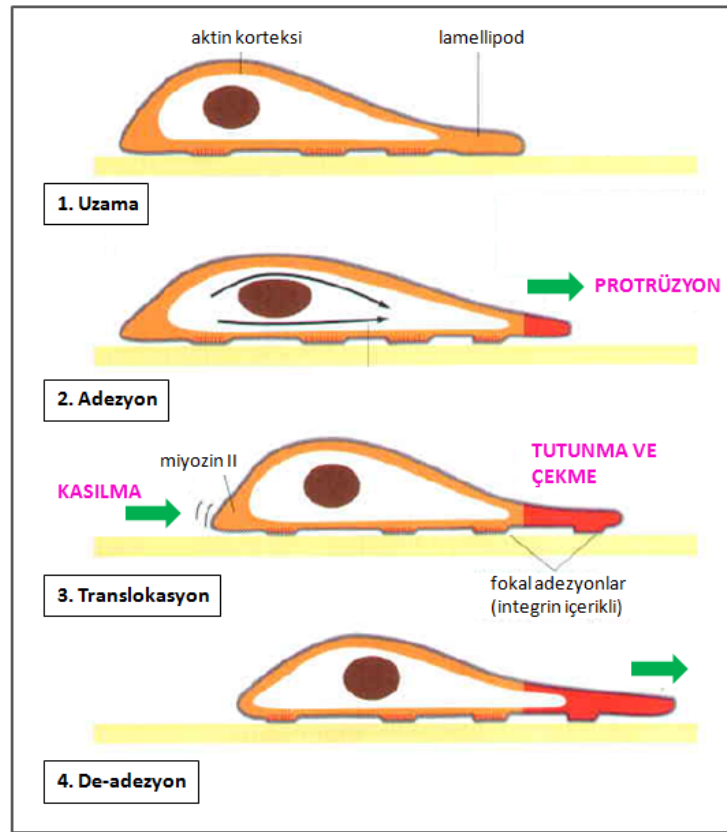


hasarlı dokuya ulaşmaya çalışır (Şekil 2.1. - 5. aşama). Dokuya ulaşan nötrofiller, doku içerisinde kemoatraktan sinyallerin oluşturduğu gradiente yönünde ilerleyip (kemotaksis) inflamatuvar sinyal kaynağını ortadan kaldırmaya çalışırlar (2, 18).

### 2.2.3. İnflamatuvar hücre göçünde hücre içi süreçler

İnflamatuvar hücre göçü; kemoatraktan sinyallerin nötrofil yüzeyindeki reseptörlerce algılanması, hücreyi göç ettirecek sinyal yollarının aktive olması ve birçok aktive-bağlanan proteinin aktivasyonu/inhibisyonu yoluyla hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi şeklinde gelişen olaylar ile meydana gelmektedir. Nötrofiller gibi göç etme kabiliyetine sahip hücrelerin harekete geçebilmesinde, aktin dinamikleri ve hücre adezyon süreçleri önemli bir yere sahiptir. Hareket, hücre iskeleti tarafından oluşturulan mekanik güçler ile hücre adezyonu tarafından oluşturulan direnç güçleri arasındaki dengeyle sağlanır (15).

Hücre göçü, hücrenin öncü ucunda aktin polimerizasyonu ile büyük geniş zar çıkıntılarının oluşmasıyla başlar. Hücre tipine göre lamellipod, filopod ya da pseudopod olabilen bu çıkıntılar, öncü uçtaki aktin filamentlerinin değişik şekillerde organize olup öne doğru ilerleyen bir ağ oluşturması şeklinde yapılır (Şekil 2.2. - 1. aşama). Genellikle epitel hücrelerde ve fibroblastlarda görülen lamellipodlar, aktin filamentlerinin çapraz-bağlanması sonucu oluşan çıkıntılardır. Filopodlar, aktin filamentlerinin demetler oluşturmasıyla oluşan ince, uzun, parmak şeklindeki uzantılardır ve fibroblastlarda görülür. Nötrofillerde görülen pseudopodlar ise, daha kısa ve küçük çıkıntılardır. Hücre iskeleti, zar uzantıları şeklinde yapılandığı zaman, öncü uçtaki aktin demetleri fokal adezyonlara yapışır ve yüzeye sıkıca tutunur. Bu şekilde, öncü uçtaki zarın geri çekilmesi önlenir ve hücrenin üzerinde bulunduğu yüzeye iyice tutunması sağlanır (Şekil 2.2. - 2. aşama). İleri yöndeki tutunmalar yapıldıktan sonra, hücre gövdesinin yoğun içeriği de ileri doğru yer değiştirir. Sitoplazma, hücrenin arka tarafındaki miyozin-bağımlı kortikal kasılma ile ileri doğru hareket eder (Şekil 2.2. - 3. aşama). Son olarak, hücrelerin arka ucundaki fokal adezyonlar kırılır, integrinler yeniden döngüye girer, serbest bırakılmış kuyruk ileri doğru götürülür (19, 20) (Şekil 2.2. - 4. aşama).



**Şekil 2.2.** Hareket eden hücrelerin oluşturdukları uzantılar ve bu süreçte geçirdikleri aşamalar (19).

Hareketli hücrelerin bir diğer önemli özelliği de polarite kazanmalarındır. Göç eden hücrelerde belirgin bir şekilde ön ve arka uç şekillenmektedir. Öncü uç ve burada oluşan yapılar, hücrenin öne doğru ilerlemesini sağlayan protrüzyon hareketini sağlarken, arka kısım da kasılma hareketiyle hücrenin öne doğru itilmesine yardımcı olur (Şekil 2.2). Polarize olan hareketli hücrelerin ön ve arka uçlarında gelişen olayların koordinasyonunu, Ras ile ilişkili küçük GTPaz süper ailesi üyeleri olan Rho, Rac ve Cdc42 proteinleri sağlamaktadır (19).

### 2.3. İnflamatuvar Hücre Göçü ve Otoinflamatuvar Hastalıklar

Otoinflamatuvar hastalıklar; doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesindeki hatalar sonucu, nedensiz olarak ortaya çıkan tekrarlı ateş atakları ve sistemik inflamasyon ile karakterize edilen kalıtsal hastalıklardır. Otoinflamatuvar hastalıklar, doğal bağışıklık sistemi ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Bu

mutasyonlar, inflamasyonla ilişkili sinyal yolları ve sitokin aktivasyon yollarında birtakım düzensizliklerin meydana gelmesine neden olmaktadır (21).

Pek çok hastalıkta önemli bir süreç olan hücre göçünün, otoinflamatuvar hastalıklarda da önemli olduğu bilinmektedir (7). İnflamasyon sürecinde, doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin hasarlı dokulara göç etmesi, inflamasyon kaynağının ortadan kaldırılması için önemli bir basamaktır. Otoinflamatuvar bir hastalık olan AAA'da da, doğal bağışıklık sisteminin belirli aralıklarla ve nedeni bilinmeyen bir şekilde kontrolsüz inflamatuvar cevaplar oluşturması (22), bu hastalığın patogeneğinde inflamatuvar hücre göçünün önemli bir süreç olabileceğini düşündürmektedir.

#### **2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi**

AAA, 16. kromozomda bulunan MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan otozomal resesif kalıtıma sahip otoinflamatuvar bir hastalıktır (22). AAA ile ilişkili 200'ün üzerinde varyasyon tanımlanmıştır ve yaygın olarak görülen M694V, M680I, M694I ve V726A mutasyonları genin 10. ekzonunda bulunmaktadır (22, 23). Doğu Akdeniz kökenli insanlar arasında özellikle Yahudiler, Türkler, Ermeniler ve Araplar'da çok sık rastlanan (1/250-1/1000) AAA, Avrupa toplumlarında da görülmektedir (24).

AAA, tekrarlı ateş atakları ile serozal, sinoviyal ve kutanöz inflamasyon ile karakterize edilen bir hastalıktır. Hastalığın en önemli komplikasyonu sekonder amiloidozisdir. Bazı hastalarda, ilerleyen amiloid birikimine bağlı olarak nefrotik sendrom ve böbrek yetmezliği de görülebilmektedir (24).

AAA'nın en etkili tedavi yöntemi, günlük kolşisin kullanımudur. Kolşisin, klasik AAA ataklarını kontrol etmek ve amiloid birikimini önlemek için gereklidir. Kolşisin, mikrotübülleri depolimerize eden bir ajandır ve AAA inflamasyonundaki majör etkisinin, mikrotübüller üzerinde olduğu düşünülmektedir. Ancak yapılan bir çalışmada, kolşisinin aktin iskeleti üzerinde de etkili olduğu ve MEFV geni ifadesini azalttığına dair bulgular elde edilmiştir (25). Bir başka çalışmada ise, kolşisinin

hastalarda nötrofil kemotaksisini inhibe ederek ve inflamatuvar serum sitokin seviyelerini düşürerek inflamasyonu engellediği gösterilmiştir (26).

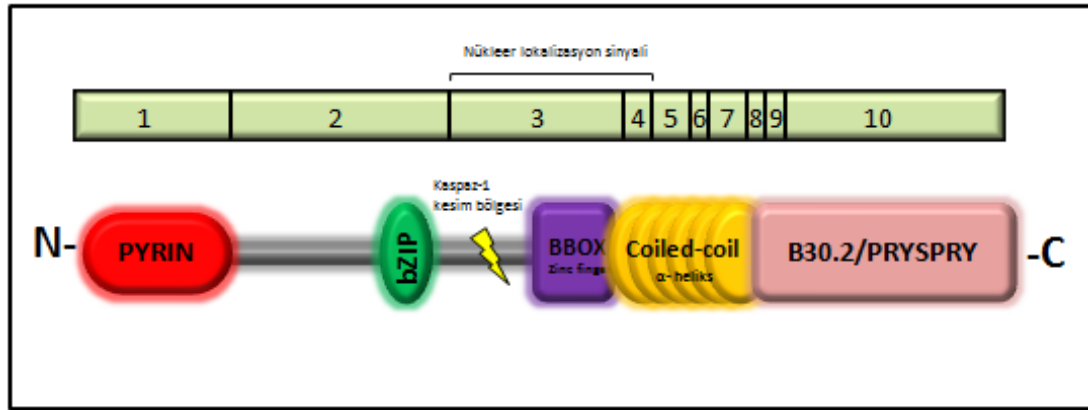
#### 2.4.1. MEFV geni

10 ekzondan oluşan ve 3.7 kb uzunluğunda bir transkripte sahip olan MEFV geni, miyelopoiezis sırasında aktive olmaktadır. Çoğunlukla nötrofillerde ifade olmakla birlikte eozinofil, bazofil, monosit, dendritik hücreler ve sinoviyal fibroblastlarda da ifade olan MEFV geni, lenfositlerde ifade olmamaktadır (8). Bunun yanında, MEFV'in U937 ve THP-1 gibi monositik hücre hatlarında ifade olduğu, ancak promiyelositik bir hücre hattı olan HL-60'da granülositik veya monositik farklılaşmadan sonra ifade olduğu görülmüştür (10). İnflamasyon sürecinde rol alan çeşitli hücrelerde ifade olan MEFV'in bazal ifade seviyesinin düşük olduğu ve tetiklenme sonucu ifadesinde artış görüldüğü de bilinmektedir (22).

MEFV ifadesi; türden türe, hücreden hücreye, inflamatuvar duruma, deneysel koşullara, pro ve anti inflamatuvar sitokinlerin varlığına göre değişkenlik göstermektedir. İnsan monositlerinde; LPS (Lipopolisakkarit), TNF- $\alpha$  (Tümör nekroz faktör- $\alpha$ ) ve IFN- $\gamma$  (İnterferon-  $\gamma$ ) ile inkübasyon sonucu MEFV ifadesi artarken, anti-inflamatuvar sitokinler olan IL-4 (İnterlökin-4) ve IL-10 (İnterlökin-10) ile ifadesi azalmaktadır. Nötrofillerde ise; IFN- $\gamma$  MEFV ifadesini arttırırken; LPS, TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-10'un MEFV ifadesine hiçbir etkisi olmamaktadır. MEFV ifadesindeki bu değişkenliğin, MEFV'in hem RNA hem de protein düzeyinde çeşitli düzenlemelere uğramasından kaynaklandığı düşünülmektedir (8, 22, 27).

#### 2.4.2. Pyrin proteini

AAA hastalığından sorumlu olan MEFV geni, TRIM20 (*Tripartite motif 20*) protein ailesi üyesi olan 781 aminoasit uzunluğundaki Pyrin proteinini kodlamaktadır. Pyrin; PYD (Pyrin) domaini, bZIP (*Basic leucine zipper*) transkripsiyon faktörü domaini, BB-ZF (*B-box-zinc finger*) domaini, CC (*Coiled-coil*) domaini ve B30.2 (PRYSPRY) domaini olarak isimlendirilen 5 domainden oluşmaktadır (28) (Şekil 2.3.).



**Şekil 2.3.** Pyrin proteininin domainleri.

Pyrinin ifadesi ve hücre içi yerleşimi hücre tipine ve protein izoformlarına göre çeşitlilik göstermektedir. Transfekte hücrelerde yapılan çalışmalarda; tam-uzunluktaki Pyrinin sitoplazmada olduğu, nadir görülen ekzon 2-*skip* formunun da çekirdekte yerleşim gösterdiği bulunmuştur. Endojen Pyrinin ise; polimorfonükleer hücrelerde, sinoviyal fibroblastlarda ve dendritik hücrelerde çekirdekte, monositlerde ise sitoplazmada olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hücrelerde görülen Pyrinin hangi protein izoformu olduğu bilinmemektedir (27).

Pyrinin, 3. ve 4. ekzonlar arasında nükleer lokalizasyon dizilerine ve bZIP transkripsiyon faktör domainine sahip olması, Pyrinin çekirdekte de bir işlevi olabileceğini düşündürmektedir. Transfekte hücrelerde Pyrinin ekzon 2-*skip* formunun çekirdekte yerleşimi olduğunun gösterildiği, Asp330 bölgesinden kaspaz-1 ile kesilmesiyle oluşan N-terminal parçasının da çekirdekte bulunduğu ve burada NF- $\kappa$ B (Nükleer faktör kappa-B) aktivasyonunu indüklediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (28, 29).

Pyrinin işlevini aydınlatmak amacıyla, nötrofil cDNA kütüphanesi kullanılarak yapılan maya-2-hibrit sistemi çalışmaları sonucunda Pyrinin; ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein with CARD domain*), Siva ve PSTPIP1 proteinleri ile interaksiyona girdiği gösterilmiştir (Şekil 2.3.). Bu 3 protein; inflamasyon, apoptoz, sitokin salınımı ve hücre iskeleti sinyal yollarında rol oynayan önemli proteinlerdir (22).

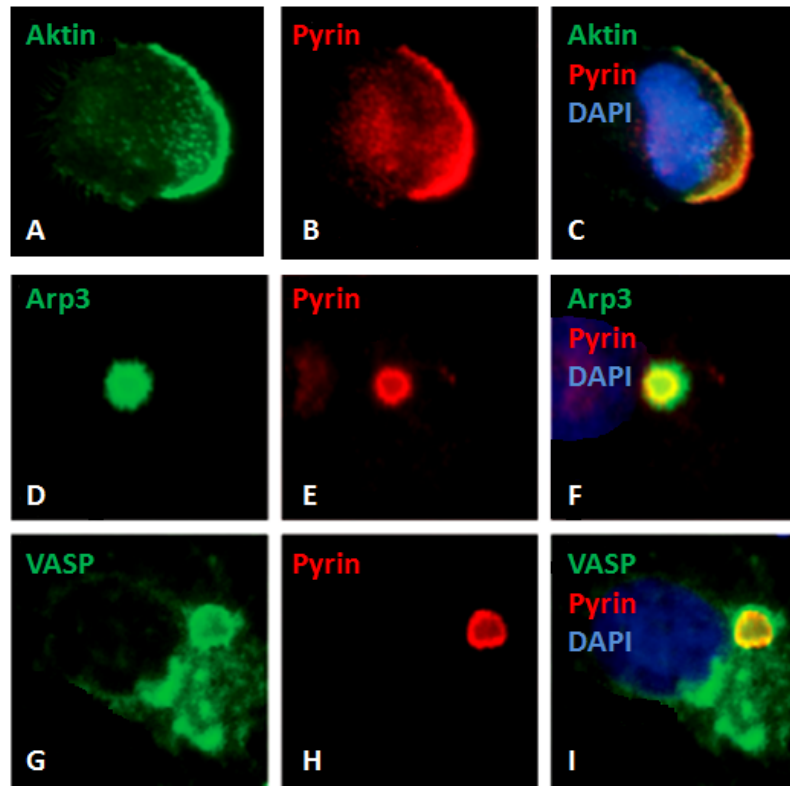
ASC, sitoplazma ve çekirdekte ifade olabilen apoptoz sürecinde kritik öneme sahip bir proteindir. ASC, apoptotik hücrelerde kendi üzerine asosiye olarak “*speck*” adı verilen büyük sitozolik agregatlar oluşturmakta ve hücre dışına salınmaktadır. Ayrıca, IL-1 $\beta$  salınımı yolağında aktive olan ve inflamazom adı verilen pro-inflamatuvar protein kompleksinin de önemli bir bileşenidir (22, 28). Pyrin ile interaksiyona giren diğer bir protein olan Siva da, lenfosit, monosit ve nötrofillerde ifade olan pro-apoptotik özelliklere sahip bir proteindir (30). PSTPIP1 ise, hücre iskeleti elemanları ile yakın ilişkide ve hücre göçü kontrolünde önemli rollere sahip olan bir proteindir. Nötrofillerde ve monositlerde yoğun olarak ifade olan PSTPIP1, PCH (*Pombe Cdc 15 homology*) protein ailesi üyesidir ve FCH (*Fes-CIP4 homology*), CC ve SH3 (*Src homology 3*) domainlerine sahiptir. PSTPIP1’in normalden fazla ifade olduğu durumlarda, hücrelerde filopod oluşumu indüklenmektedir. Yapılan çalışmalarla, PSTPIP1 ve aktinin hücre içerisinde bazı bölgelerde birlikte olduğu gösterilmiş, ancak bu ilişkinin direk veya aktin ile ilişkili proteinler üzerinden olabileceği konusunda kesin bulgular elde edilememiştir. Ancak PSTPIP1’in SH3 domaininden, aktin bağımlı mekanizmanın iki proteini olan WASp (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*) ve c-abl’ye bağlandığının biliniyor oluşu, PSTPIP1-aktin ilişkisinin bu proteinler üzerinden olabileceğini işaret etmektedir. Pyrin-PSTPIP1 interaksiyonu ise, bu iki proteinin hücre iskeleti ve inflamasyon süreçlerinde birlikte rol alabileceklerini göstermektedir. Ek olarak, PSTPIP1 geninde meydana gelen mutasyonlar, PAPA (*Pyogenic sterile Arthritis, Pyoderma gangrenosum, and Acne*) sendromuna neden olmaktadır. Otozomal dominant kalıtıma sahip olan PAPA sendromu, bazı klinik özellikleri açısından AAA’ya benzeyen bir otoinflamatuvar hastalıktır (22).

İnteraksiyona girdiği proteinler sayesinde birçok moleküler yolağa dahil olan Pyrinin, doğal bağışıklık cevabının düzenlenmesinde çeşitli rollere sahip olabileceği düşünülmektedir (10). Pyrinin hücre iskeleti elemanları ile yakın ilişkide olduğunu gösteren grubumuzun da dahil olduğu birçok çalışma da, bu proteinin inflamatuvar hücre göçü sürecinde işlevi olabileceğini düşündürmüştür (12, 31, 32, 33).

Mansfield ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, Pyrin ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde, Pyrinin N-terminal domaininin sitoplazmada

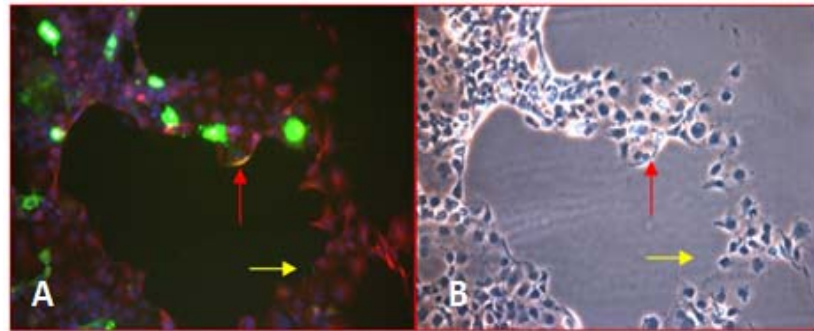
mikrotübüllerle interaksiyona girdiği gösterilmiştir. Bunun yanında, Pyrinin perinükleer filamentlerde ve periferel katlantılarda aktin ile birlikte yerleşimi olduğu da gösterilmiştir. Bu çalışma, Pyrinin inflamatuvar cevapları hücre iskeleti seviyesinde düzenleyebileceği önerisini getiren ilk çalışma olmuştur (31).

Waite ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada; göç eden insan monositlerinin göç yönündeki polarize ucunda Pyrinin aktin ile birlikte yerleşimi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Pyrinin Arp3 (*Actin-related protein 3*) ve VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*) gibi aktin polimerizasyonu ve aktin iskeletinin düzenlenmesinden sorumlu olan iki proteinle de birlikte yerleşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2.4.). Ek olarak, Pyrinin Arp3, VASP ve aktin ile düşük afinitede interaksiyona girdiği de gösterilmiştir. Bu çalışma, Pyrinin aktin iskeletine birtakım adaptör proteinler aracılığıyla dahil olabileceğini ve Pyrinin aktin ile ilişkili mekanizmalarda işlevi olabileceğini göstermesi açısından önem taşımaktadır (12).



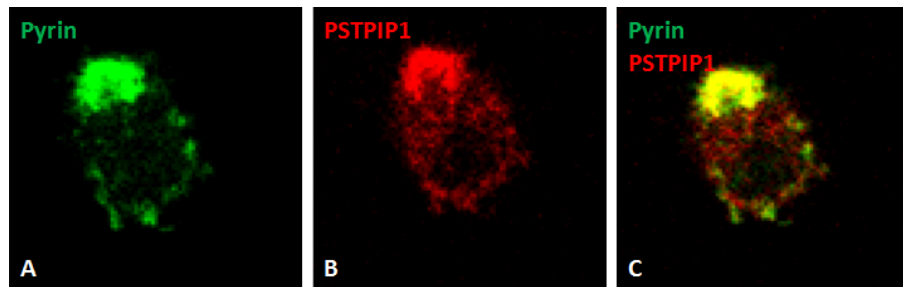
**Şekil 2.4.** Aktin-Pyrin (A-C), Arp3-Pyrin (D-F) ve VASP-Pyrin (G-I) proteinlerinin insan monositlerinde birlikte yerleşimleri (12).

Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada, Pyrin ile transfekte edilen HeLa ve COS-7 hücrelerinde, Pyrinin hücre göçü üzerine etkileri araştırılmıştır. Yara iyileşmesi ve filtre deneyleri olmak üzere hücre göçünü modelleyen iki farklı deney sistemi kullanılan çalışmada, yabancı-tip Pyrinin hücre göçünü arttırdığına yönelik bulgular elde edilmiştir. Yara iyileşmesi deneylerinde, Pyrin-GFP ile transfekte edilen HeLa hücrelerinin yara bölgesine göç etme oranının diğer hücrelere göre arttığı görülmüştür (32) (Şekil 2.5.).



**Şekil 2.5.** Yara iyileşmesi deney sisteminde HeLa hücrelerinde Pyrin-GFP yerleşiminin floresan (A) ve ışık (B) mikroskobu görüntüleri (32).

Bu çalışmanın devamında yapılan başka bir çalışmada da, Pyrin ve PSTPIP1 proteinlerinin hücre göçü sürecindeki birliktelikleri araştırılmıştır. Burada, hücre göçü modeli oluşturulmuş nötrofil-benzeri HL-60 hücre hatlarında, Pyrin ve PSTPIP1'in hücrelerin göç yönündeki polarize bölgelerinde birlikte yerleşim gösterdiği saptanmıştır (33) (Şekil 2.6.).



**Şekil 2.6.** Pyrin (A) ve PSTPIP1'in (B) nötrofile farklılaştırılan ve göçe tetiklenen HL-60 hücrelerinin polarize öncü ucundaki birlikte yerleşimleri (C) (33).



Laboratuvarımızda yapılan bir başka çalışmada, kolşisinin transkriptom üzerine etkileri monositik bir hücre hattı olan THP-1 hücrelerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada; kolşisin mikrotübülleri bozmayan dozlarda kullanılmış ve ilacın transkriptom üzerine etkisi mikroarray yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu çalışmada, özellikle sinyal iletimi, apoptoz, hücre iskeleti organizasyonu ve hücre göçü ile ilişkili yollarda rol oynayan ve ürünlerinin aktin ile ilişkili olduğu bazı genlerde anlamlı değişiklikler saptanmıştır (yayınlanmamış data). Benzer olarak, Ben-Chetrit ve diğerleri tarafından endotel benzeri HUVEC hücreleri üzerinde yapılan çalışmada da, kolşisinin hücre adezyonu ve kemokin reseptörleri gibi bazı gen gruplarında RNA seviyesinde değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (34).

## 2.5. Aktin ve Aktin ile İlişkili Proteinler

Ökaryotik hücrelerde yüksek derecede korunmuş, hücre iskeletinin önemli bir yapıtaşı olan aktin, çok-işlevli bir hücre içi proteindir. Çeşitli izoformlara ( $\alpha$ -aktin,  $\beta$ -aktin,  $\gamma$ -aktin) sahip olan aktin; sitokinez, endositoz, vezikül ve organel taşınması, hücre hareketi ve hücre göçü gibi temel hücresel süreçlerin gerçekleşmesinde kritik öneme sahiptir (15, 19).

Aktin hücrede, G-aktin olarak adlandırılan globüler monomerler ve G-aktin alt ünitelerinin doğrusal bir zinciri olan F-aktin olarak adlandırılan filamentöz polimerler olarak bulunabilmektedir. Aktin, işlevsel demetler halinde düzenlenmiş F-aktinler ve bunlara bağlanan proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan mikrofilamentlerin en temel yapısal elemanıdır. Mikrofilamentler ya da aktin filamentleri, hücrelere mekanik destek ve hareket etme kabiliyeti sağlayan önemli bir hücre iskeleti elemanıdır. Aktin filamentleri farklı işlevlerde uçlara sahip, polarite gösteren yapılardır. Filamentin bir ucu aktin alt ünitelerinin eklenmesi için tercih edilir ve (+) uç olarak adlandırılır, buna karşın diğer uç yapılanmanın bozulması için tercih edilen uçtur ve (-) uç olarak tanımlanmaktadır (15, 19).

Aktin, hücre içerisinde dinamik bir yapıya sahiptir. Aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu, birçok hücresel sürecin temelini oluşturmaktadır. Birkaç G-aktin alt ünitesinin bir araya gelerek kararsız bir yapı oluşturması (nükleasyon fazı), bu

yapıya monomerlerin eklenmesiyle kararlı bir filament yapısının oluşması (uzama fazı) ve uçlara eklenen G-aktinler ile denge durumunda, polarite kazanmış bir aktin filamentinin oluşması (durağan faz), aktin polimerizasyonu sürecinin 3 temel basamağıdır (15, 19).

Aktin sahip olduğu yapısal özellikler sayesinde birçok protein ile etkileşime girebilmektedir. Aktin dinamikleri ve organizasyonu, aktin ile birlikte birçok aktine-bağlanan aksesuar protein tarafından düzenlenmektedir. Örneğin; profilin, ADP-G-aktin'e bağlanarak, ADP'nin ATP ile değişimini katalizleyen bir proteindir. Kofilin, F-aktin'e bağlanır ve filamentlerin (-) ucundaki ADP-G-aktin'in ayrılma oranını arttırarak depolimerizasyonu sağlar. Timozin  $\beta_4$ , ATP-G-aktin'e bağlanarak filamentin iki ucuna aktin alt ünitelerinin eklenmesini inhibe eder. Cap Z, gelsolin ve tropomodülün gibi başlık ekleme proteinleri, aktin filamentlerinin uçlarına özgül bir şekilde bağlanarak buradaki yapılanmayı veya ayrışmayı bloke eden proteinlerdir. Formin proteinleri ve Arp2/3 kompleksi, sinyal iletim yollarının kontrolü altında aktin nükleasyonu oluşturan proteinlerdir. Fimbrin,  $\alpha$ -aktinin, spektrin, filamin ve distrofin gibi aktin çapraz-bağlayıcı proteinler ise, aktin filamentlerini demet veya ağ halinde düzenleyen proteinlerdir (15).

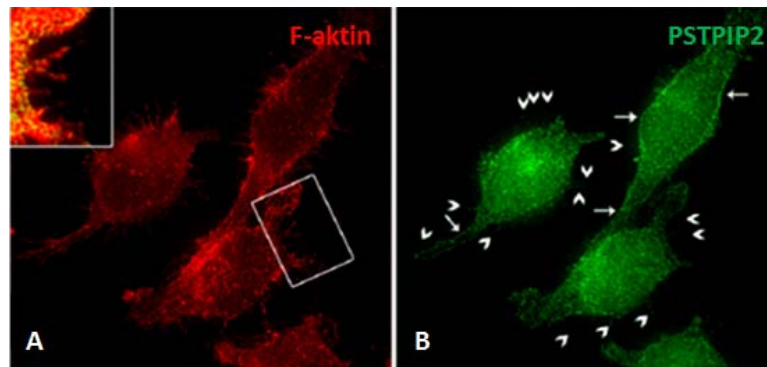
Yukarıda bahsedilen aktine-bağlanan aksesuar proteinler, aktin dinamiklerinde temel işlevlere sahip olan proteinlerdir. Bunların dışında; aktin ile doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili, hücre iskeleti organizasyonu ve/veya hücre göçü süreçlerinde işlevleri olduğu için bu tez kapsamında moleküler düzeyde incelenmiş olan 9 proteinin yapısal ve işlevsel özellikleri ile birlikte bazı literatür bilgileri aşağıda verilmiştir.

### **2.5.1. PSTPIP2 (*Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2*)**

PCH protein ailesi üyesi olan PSTPIP2, hücre iskeleti organizasyonunda önemli işlevlere sahip, F-aktin ile ilişkili ve tirozinden fosforlanan bir proteindir. Bu ailenin üyeleri; sitokinez, endositoz, hücre adezyonu, hücre göçü gibi aktin ile ilişkili süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır ve FCH, CC, PEST (*Proline-glutamic acid-serine-threonine rich*), SH3 domainlerine sahiplerdir. PSTPIP2'de bulunmayan SH3 domaini, Arp2/3 aktin polimerizasyonu düzeneğinin aktivatörü olan WASp

proteinleri ile olan etkileşimi sağlamaktadır. Bu domain, PSTPIP2 ile % 41 oranında homoloji gösteren PSTPIP1 proteininde bulunmaktadır. Makrofaj, monosit ve granülositlerin küçük bir kısmında ifade olan PSTPIP2, PTP-PEST (*PEST-type protein tyrosine phosphatase*) ve PTP-HSCF (*Protein tyrosine phosphatase hematopoietic stem cell fraction*) proteinleri ile interaksiyona girmektedir (35-37).

Chitu ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, PSTPIP2'nin makrofajlarda morfoloji ve hareketi kontrol eden bir aktin-paketleme proteini olduğu ve aktin iskeleti organizasyonunda rol aldığı gösterilmiştir. PSTPIP2 ifadesi arttırıldığında ise; filopod oluşumu, hücre polarizasyonu, kemotaksis ve hücre göçünün arttığı saptanmıştır. Ayrıca, PSTPIP2 ve F-aktin'in makrofajların membranında ve filopodlarında birlikte yerleşimleri olduğu da gösterilmiştir (37) (Şekil 2.7.).



**Şekil 2.7.** F-aktin (A) ve PSTPIP2'nin (B) makrofaj hücre hatlarındaki yerleşimleri. Hücrelerin filopodlarında sarı piksellerle iki proteinin birlikte yerleşimi gösterilmektedir (A) (37).

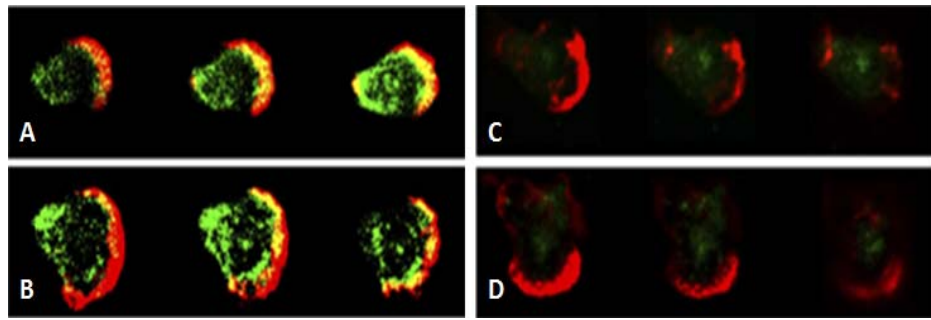
PSTPIP2 geninde meydana gelen mutasyonların, farelerde makrofaj-aracılı otoinflamatuar deri ve kemik hastalıkları oluşturduğu da rapor edilmiştir (38, 39).

### 2.5.2. LSP1 (*Leukocyte-specific protein 1*)

Hücre içi  $Ca^{+2}$  ve F-aktin bağlanma proteini olan LSP1, özellikle lökositlerde hücre hareketi, transendotelyel göç, hücre adezyonu ve hücre iskeleti yapısının düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir. İnflamasyon sürecinde, lökositlerin inflamasyon bölgesine toplanmasında ve kemotaksisinde önemli bir düzenleyicidir.

LSP1, inflamatuvar strese cevap olarak, nötrofillerin hareketi ve kemotaksisinde önemli olan p38 MAPK yolağında rol oynayan MAPKAPK2 (*Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*) ve nötrofil adezyonu ve kemotaksisi gibi birçok işlevde rol oynayan PKC (*Protein kinase C*) proteinleri ile fosforlanmaktadır (40, 41).

LSP1'in tüm lökosit tiplerinde ifade olduğu ancak, insan miyeloid lösemik hücre hatlarında çok az ifade olduğu rapor edilmiştir (42). Yapılan çalışmalarda, fosforlanmamış LSP1'in nötrofillerde sitoplazmada yerleşim gösterdiği; göçe itilmiş ve polarize olmuş nötrofillerde ise fosforlanmış olarak F-aktinle birlikte filopod, lamellipod ve membran katlantılarında yerleşim gösterdiği saptanmıştır (43) (Şekil 2.8.).



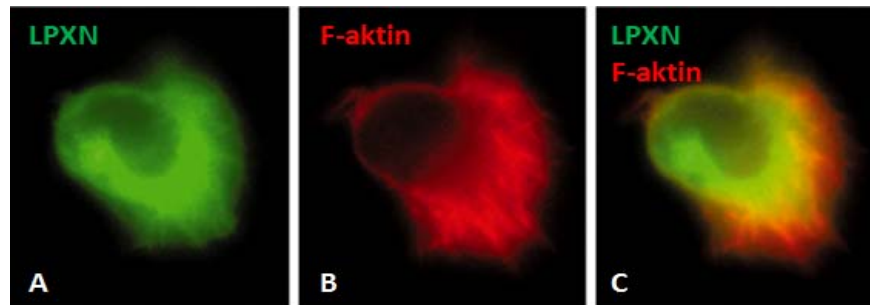
**Şekil 2.8.** Fosforlanmış (A-B) ve fosforlanmamış (C-D) LSP1'in (yeşil) göçe tetiklenmiş nötrofillerde F-aktin (kırmızı) ile birlikte yerleşimleri (43).

Wang ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmalarda; LSP1'in olmadığı *in vivo* ve *in vitro* durumlarda, nötrofil göçünün arttığına dair bulgular elde edilmiştir. LSP1 (-/-) farelerde, akut inflamasyon sürecinde nötrofillerin bir araya toplanmasında artış görülmüştür. Bu bilgiler, LSP1'in nötrofil adezyonu, polarizasyonu ve göç süreçlerinde negatif bir düzenleyici olarak rol oynadığını göstermektedir (44). Liu ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada ise, endotelyumda sentezlenen LSP1'in nötrofil transendotelyel göçe izin verecek şekilde işlev gördüğü rapor edilmiştir. Yabani-tip nötrofillerin, LSP1 (-/-) endotelyumdan geçemediği, LSP1 (-/-) nötrofillerin ise yabani-tip endotelyumdan geçebildiği saptanmıştır (45) Ayrıca, LSP1'in nötrofil

aktin disfonksiyonu ile ilişkili immün yetmezliği sendromu ile ilişkilendirilmiş bir protein olduğu da rapor edilmiştir (46).

### 2.5.3. LPXN (*Leupaxin*)

Paksillin protein ailesi üyesi olan LPXN, paksillin proteininin lökositlere özgül bir izoformudur. Bu ailenin üyeleri, hematopoietik kökenli hücrelerde çok fonksiyonlu adaptör fosfo-proteinlerdir. LPXN, hücre adezyonu ve hücre göçü olaylarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Özellikle, adezyon bölgelerinde integrin-aracılı sinyal iletiminde önemli bir adaptör proteindir. LPXN'nin 4 adet LD (*Leucine-aspartate*) tekrar domaini ve 4 adet LIM (*Lin-11 Isl-1 Mec-3*) domainine sahip olması, bu proteinin integrin-aracılı sinyal yollarında işlev görebileceğini göstermektedir. Tüm lökosit tiplerinde ifade olan LPXN; fokal adezyon elemanları olan Pyk2 (*Proline-rich tyrosine kinase 2*), FAK (*Focal adhesion kinase*) ve PTP-PEST proteinleri ile interaksiyona girmektedir (47-50). Çeşitli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, LPXN'nin genellikle hücrelerin periferinde sitoplazmada F-aktin ile birlikte yerleşimi olduğu gösterilmiştir (48) (Şekil 2.9.).



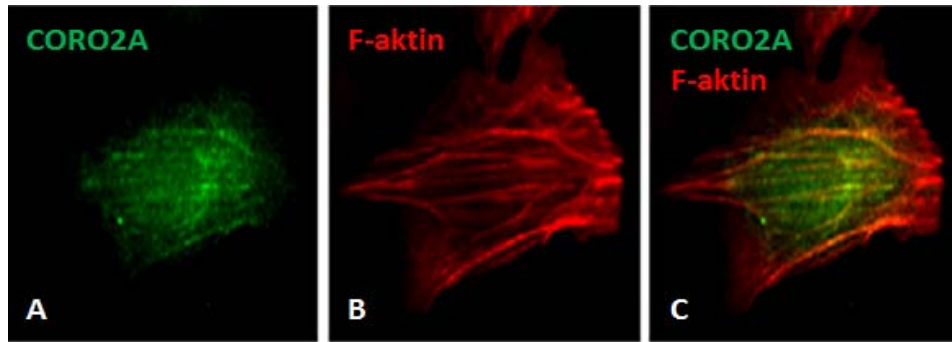
**Şekil 2.9.** LPXN (A) ve F-aktinin (B) lenfoblastoid hücre hatlarındaki yerleşimleri. Hücrelerin filopodlarında ve bitişiğindeki sitoplazmik bölgede iki proteinin birlikte yerleşimi gösterilmektedir (C) (48).

Tanaka ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, LPXN'nin integrin-aracılı hücre adezyonu olaylarında paksillinin fosforlanmasını baskılayan bir protein olduğu ortaya koyulmuştur (49). Başka bir çalışmada ise, LPXN'nin PC-3 prostat kanseri hücrelerinde hücre göçünü arttırdığı bildirilmiştir. PC-3 hücrelerinde, azalan LPXN seviyelerinin azalan hücre göçüne neden olduğu görülmüştür (50).

#### 2.5.4. CORO2A (*Coronin 2A*)

CORO2A, WD (*Tryptophan-aspartate*) tekrarlı protein ailesi üyesi olan tip 2 koronin proteindir. Koroninler, hücre göçü sürecinde aktin dinamiklerinin düzenlenmesinde önemli işlevlere sahip, yüksek derecede korunmuş F-aktin bağlanma proteinleridir. Hematopoyetik kökenli hücrelerde ifade olan CORO2A, 5 adet WD-40 tekrar domainine sahiptir ve F-aktine bağlanan proteinlere yapısal olarak benzerlik göstermektedir. Diğer koroninlerinin aksine, literatürde CORO2A'nın işlevi ile ilgili yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır. Ancak, proteinin yapısal özelliklerinden yola çıkılarak, CORO2A'nın F-aktine bağlanan bir protein olduğu ve aktin iskeleti üzerinden hücre göçünün düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (51-52).

Marshall ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, CORO2A'nın MTLn3 adenokarsinoma hücrelerinin stres fibrilleri ve fokal adezyonlarında F-aktin ile birlikte yerleşimi olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10.). Ayrıca, CORO2A'nın susturulduğu hücrelerde göç ve fokal adezyonun azaldığı da tespit edilmiştir (51).



**Şekil 2.10.** CORO2A (A) ve F-aktinin (B) adenokarsinoma hücre hatlarındaki yerleşimleri. Hücrelerin stres fibrillerinde ve fokal adezyonlarında iki proteinin birlikte yerleşimi gösterilmektedir (C) (51).

CORO2A, HeLa hücrelerinin çekirdek ekstratları üzerinde yapılan bir çalışmada NCoR (*Nuclear receptor co-repressor*) kompleksinin bir bileşeni olarak tanımlanmıştır. Bunun üzerine, primer makrofajlarda yapılan immün-çöktürme çalışmalarında, CORO2A'nın çekirdekte yerleşim gösterdiği ve NCoR kompleksiyle

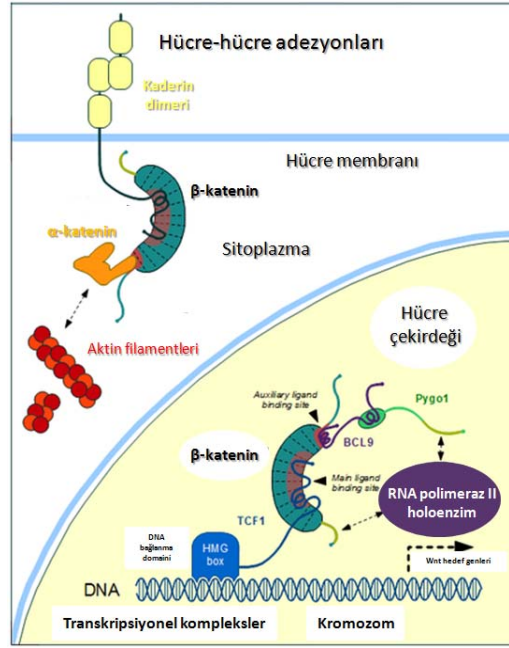
interaksiyona girdiği bulunmuştur. Yapılan ileri analizlerle birlikte; CORO2A'nın nükleer aktin ile interaksiyona girerek, inflamatuvar cevap ile ilişkili TLR (*Toll-like receptor*) genlerinin transkripsiyonunun düzenlenmesinde NCoR kompleksine yardımcı rol oynadığı gösterilmiştir (52).

### 2.5.5. CTNNB1 (*β-catenin 1*)

CTNNB1, dual işleve sahip olan bir proteindir; hem hücre adezyonu hem de transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Proteinin kor kısmında, ARM (*Armadillo*) tekrar domainleri bulunmaktadır. N-terminal domaini, proteinin degradasyonu ile ilişkili iken, C-terminal domain proteinin DNA'ya bağlanmasını sağlamaktadır (53-56).

CTNNB1, hücre adezyonu süreçlerinde kritik öneme sahip aderent bağlantılarından E-kaderin protein kompleksinin bir parçasıdır. CTNNB1, sitoplazmik kuyruğu ile E-kaderine, diğer ucuyla da aktin filamentleri ile direk bağlantıda olan  $\alpha$ -katenine bağlanmaktadır. CTNNB1'in diğer bir işlevi de, *canonical* Wnt sinyal yolağında, hücre içi sinyal ileticisi olarak Wnt ile ilişkili hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlamaktır. *Canonical* Wnt yolağı, embriyonik gelişim sürecinde embriyonik eksenlerin dorsal/ventral ve anterior/posterior durumlarını belirleyen genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan bir yolaktır. Wnt ligandının olmadığı durumlarda, CTNNB1 fosforlanmış halde sitoplazmada bulunur. Wnt ligandı varlığında ise, Wnt hücre membranındaki Fz (*Frizzled*) reseptörlerince algılanır. Sinyal, aşağı-akış yönünde ilerlemeye başlar ve protein-protein etkileşimleri sayesinde CTNNB1 çekirdeğe girer ve bu şekilde Wnt ile düzenlenen genler transkribe olur (53-57) (Şekil 2.11.).

CTNNB1 genindeki mutasyonların ve genin aşırı ifade edilmesi durumlarının, melanoma ve kolorektal kanser gibi birçok kanser tipi ile ilişkilendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (58).



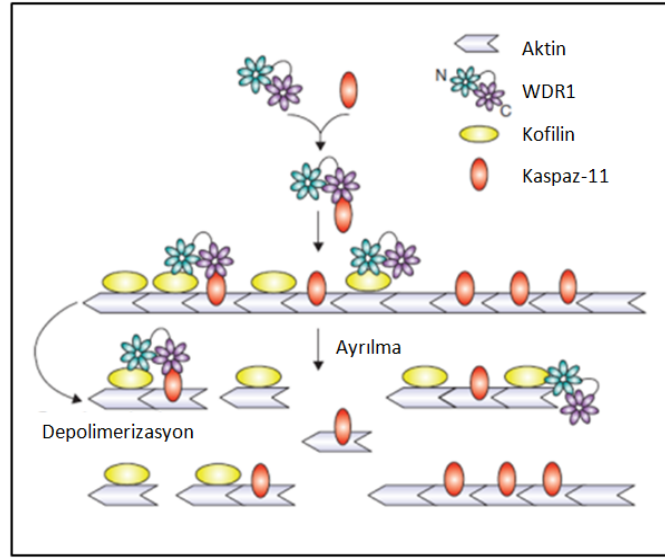
**Şekil 2.11.** CTNNB1'in sitoplazma ve çekirdekteki farklı işlevleri (57).

### 2.5.6. WDR1 (*WD-repeat containing protein 1*)

WD tekrarlı protein ailesi üyesi olan WDR1, ökaryotlarda yüksek derecede korunmuş 14 adet WD-40 tekrar domainine sahip bir proteindir. Nötrofil, makrofaj ve monositlerde ifade olan WDR1, F-aktin ile birlikte sitoplazmada bulunmaktadır. WDR1, kofilin ve kaspaz-11 aracılığıyla F-aktin'e bağlanmaktadır. Kaspaz-11-WDR1-F-aktin-kofilin kompleksi, aktin filamentlerinin birbirinden ayrılmasını sağlamakta ve aktin filamentlerinin (-) uçlarının depolimerizasyonunu arttırmaktadır (Şekil 2.12.). Bu kompleks, özellikle nötrofillerin hücre iskeleti davranışında merkezi rol oynamaktadır (59).

WDR1'in biyolojik ve hüresel işlevi birçok model organizma üzerinde çalışılmıştır. Buna göre, *in vivo* koşullarda da, WDR1'in kofilin-aracılı aktin filamentlerinin ayrılmasını arttırdığı saptanmıştır. WDR1'in HeLa hücrelerinde *knockdown* edildiği bir çalışmada, F-aktinin anormal birikimi ve bozulmuş sitokinez gözlemlenmiştir (60). WDR1'in fare makrofajlarında *knockdown* edildiği başka bir çalışmada ise, hücre göçü sürecinde hataların meydana geldiği görülmüştür (59). WDR1 genindeki mutasyonların embriyonik letalite, makrotrombositopeni ve birtakım otoinflamatuar hastalıklara neden olduğu da gösterilmiştir (61).





**Şekil 2.12.** Kaspaz-11-WDR1-F-aktin-kofilin aracılı aktin depolimerizasyonu (59).

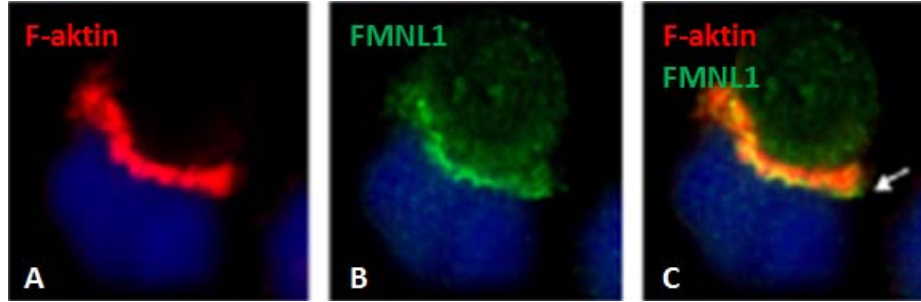
### 2.5.7. FMNL1 (*Formin-like protein 1*)

Formin proteinlerinin FRL (*Formin-related gene in leukocytes*) alt ailesi üyesi olan FMNL1, hematopoietik kökenli hücrelerin aktin iskeleti organizasyonunda rol oynayan anahtar proteinlerdendir. F-aktinle birlikte sitoplazmada yerleşim gösteren FMNL1'in; nükleasyon, uzama, polimerizasyon, depolimerizasyon ve paketlenme gibi aktin ile ilişkili temel süreçlerde işlev gördüğü düşünülmektedir ancak, işlevi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (62-64).

Forminler, multi-domain proteinlerdir; hücre göçü, hücre polarizasyonu, vezikül trafiği, morfogenez, embriyonik farklılaşma ve sitokinez gibi birçok aktin-bağlı süreçte gerekli olan geniş bir protein ailesidir. Genel olarak, aktin filamentlerinin polimerizasyonunda görevlidirler. Formin proteinlerinde FH1, FH2 ve FH3 (*Formin homology 1, 2, 3*) olmak üzere 3 adet karakteristik domain bulunmaktadır. Formin proteinlerinin bazıları DAD (*Diaphanous auto-regulatory domain*)-bağlı oto-inhibisyon, bazıları ise *splicing* mekanizmaları ile düzenlenmektedir (62-64).

Gomez ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, FMNL1'in sitotoksik T hücrelerinde mikrotübül organizasyon merkezini yeniden yönlendirmede işlev gördüğü ve FMNL1'in bu hücrelerde F-aktin ile birlikte yerleşim gösterdiği

saptanmıştır (65) (Şekil 2.13.). Mersich ve diğerlerinin yapmış olduğu bir çalışmada ise; FMNL1 ifadesinin monositik farklılaşma sürecinde arttığı, makrofajların aktince-zengin podozom yapılarında yerleşim gösterdiği ve burada aktin iskeleti düzenlenmesinden sorumlu olabileceği rapor edilmiştir (66).



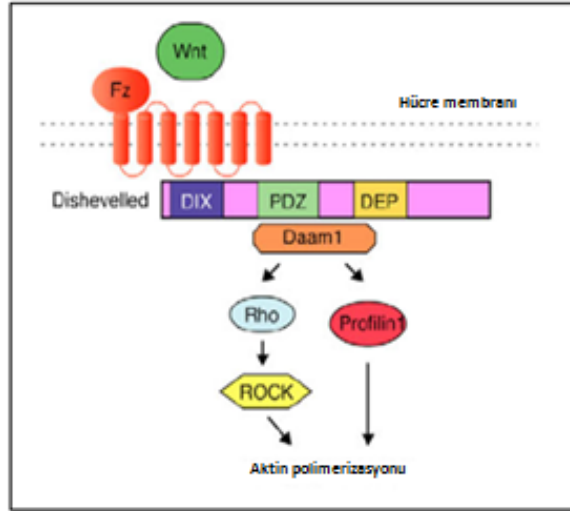
**Şekil 2.13.** F-aktin (A) ve FMNL1'in (B) sitotoksik T hücrelerindeki birlikte yerleşimleri (C) (65).

#### 2.5.8. DAAM1 (*Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1*)

DAAM1, formin proteinlerinin alt ailesi olan DRF (*Diaphanous-related formins*) forminleri üyesidir. Bu proteinler; hücre hareketi, hücre polarizasyonu, adezyon ve sitokinez gibi süreçlerde aktin iskeletinin düzenlenmesinde işlev görmektedir. Bu alt ailenin üyelerinde; tipik formin domainlerine ek olarak, GBD (*GTPase binding domain*), DAD ve DID (*Diaphanous inhibitory domain*) domainleri de bulunmaktadır. Hücre membranı ve sitoplazmik veziküllerde yerleşim gösteren DAAM1, aktin ile ilişkili süreçlerde rol oynamaktadır (67-70). Buna ek olarak, *non-canonical Wnt (Planar Cell Polarity)* sinyal yolağının aşağı-akışında rol oynayan önemli bir adaptör proteindir. *Non-canonical Wnt* yolağı, aktin iskeleti organizasyonunu etkileyerek, doku morfogenezi ve organogenez süreçlerinde hücre polarizasyonu ve hareketini yönetmektedir. Bu sinyal yolağı, Wnt ligandının Fz reseptörü ile ilişki kurması ile başlar. Sinyal, önce Dvl (*Dishevelled*) proteinine, daha sonra DAAM1 aracılığıyla Rho-GTPaz'lara ulaşır ve sonuç olarak aktin iskeleti düzenlenmesiyle ilişkili süreç gelişir (70, 71) (Şekil 2.14.).

Yapılan çalışmalar sonucu, DAAM1'in CIP4 (*Cdc42-interacting protein 4*), RhoA, Cdc42 ve Src proteinleri ile interaksiyona girdiği ve bu etkileşimlerle aktin

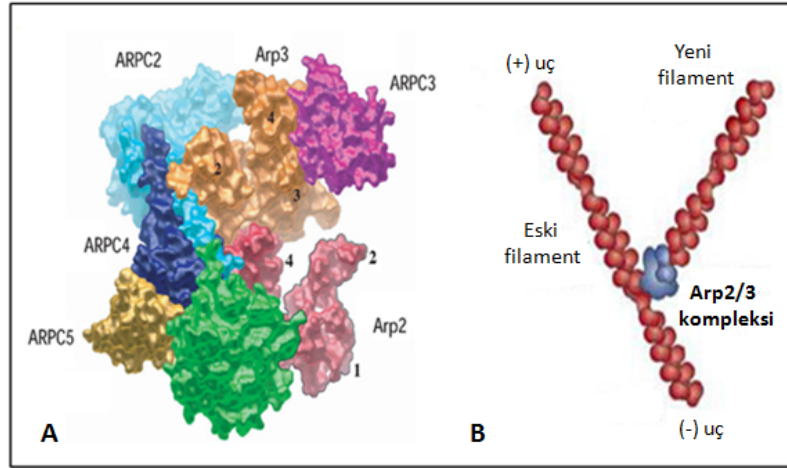
dinamiklerinin düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir (72). Ju ve diğerlerinin endotel hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmada ise, aktif DAAM1'in *in vitro* ve *in vivo*'da özgül olarak endotel hücre çoğalmasını ve göçünü inhibe ettiği, bunun yanında aktin polimerizasyonu ve mikrotübül stabilizasyonunu indüklediği gösterilmiştir (73).



**Şekil 2.14.** DAAM1'in *non-canonical* Wnt sinyal yolağındaki rolü (71).

### 2.5.9. ACTR2 (*Arp2, Actin-related protein 2*)

ACTR2, Arp2/3 kompleksine ATP bağlanmasını sağlayarak yeni aktin filamentlerinin oluşumunun katalizlenmesini ve komplekse profilinin bağlanmasını sağlayan önemli bir alt birimdir. Arp2/3, 7 alt birimden meydana gelen bir komplekstir ve aktine-bağlanan iki önemli alt birimi Arp2 ve Arp3'tür. Bu alt birimler, nükleasyon ajanları gibi davranıp aktin polimerizasyonu sağlamak amacıyla evrimsel süreçte G-aktinlere yapısal olarak benzerlik göstermiştir. Arp2/3 kompleksi, aktin filamentlerine 70°'lik açıyla bağlanarak var olan aktin filamentlerinden yeni dallanmalar oluşmasını sağlar. Bir nükleasyon faktörü olan Arp2/3, yeni filamentler ve yeni (+) uçlar oluşturur (Şekil 2.15.). Buna ek olarak, aktin filamentlerinin (-) uçlarını kapatarak buradaki depolimerizasyonu da engeller. Arp2/3 kompleksi, WASp ailesi üyeleri ile aktivasyon kazanır. Aktin ağı oluşumunda çok önemli olan bu iki protein sayesinde, hücrenin hareket etmesini sağlayan membran çıkıntılarının oluşumu sağlanır (74-80).



**Şekil 2.15.** Arp2/3 kompleksinin üç boyutlu yapısı (A) ve aktin filamentlerine bağlanma bölgesi (B) (78, 79).

Bu tez kapsamında; Pyrin ve yukarıda bahsedilen aktin ile ilişkili 9 protein, hücre göçü modeli oluşturulmuş nötrofil-benzeri bir hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde RNA ve protein düzeylerinde incelenerek, inflamatuvar hücre göçü sürecinde Pyrinin bu proteinlerle olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. RNA izolasyonu

*RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen):

- RLT *Plus* tamponu
- RW1 tamponu
- RPE tamponu
- RNaz içermeyen su

$\beta$ -Me ( $\beta$ -merkaptöetanol) (Merck)	: 14,3 M
Etanol (Riedel)	: % 70 / su
DEPC (Dietil pirokarbonat) (Sigma)	: % 0,1 / su

##### 3.1.2. cDNA sentezi

*Quantitect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen):

- gDNA *wipeout* tamponu, 7X
- *Reverse transcriptase* tamponu, 5X
- *Reverse transcriptase* primer karışımı
- *Reverse transcriptase*
- RNaz içermeyen su

DEPC (Dietil pirokarbonat) (Sigma)	: % 0,1 / su
------------------------------------	--------------

##### 3.1.3. Kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ-PZR)

*SYBR® Green Jump Start Taq Ready™* karışımı, 2X (Sigma):

- Tris-HCl (pH 8,3) : 20 mM
- KCl : 100 mM
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP : 0,4 mM
- *Taq* DNA polimeraz : 0,05 U/ $\mu$ l
- *Jump Start Taq* antikoru
- *SYBR Green I* boyası

MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	: 25 mM
---------------------------	---------

<i>Forward</i> primer (Metabion)	: 10 pmol
<i>Reverse</i> primer (Metabion)	: 10 pmol
De-iyonize su	

### 3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

<i>Taq</i> DNA polimeraz tamponu, 10X (Thermo Scientific)	
<i>Taq</i> DNA polimeraz (Thermo Scientific)	
dNTP (Thermo Scientific)	: 2,5 mM
MgCl <sub>2</sub> (Thermo Scientific)	: 25 mM
<i>Forward</i> primer (Metabion)	: 10 pmol
<i>Reverse</i> primer (Metabion)	: 10 pmol
De-iyonize su	

### 3.1.5. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz (Biomax)	
TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu, 50X (pH 8,0):	
- Tris-baz (Merck)	: 2 M
- Glasiyel asetik asit (Merck)	: 57,1 ml
- Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O (Merck)	: 0,5 M
Yükleme tamponu:	
- Gliserol (Merck)	: 5,5 ml
- 1X TAE tamponu	: 4,5 ml
- <i>Orange G</i> boyası (Merck)	: 0,01 g
EtBr (Etidyum bromür) (Sigma)	: 10 mg/ml / su
Moleküler ağırlık belirleyicisi (50 bç) (Thermo Scientific)	

### 3.1.6. İmmünfloresan (IF) boyama

PFA (Paraformaldehit) (Sigma)	
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> ) tamponu, 1X (pH 7,4):	
- NaCl (Carlo Erba)	: 14 mM
- KCl (Carlo Erba)	: 3 mM

- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	: 0,9 mM
- NaHPO <sub>4</sub> (Merck)	: 6,4 mM
<i>Triton X-100</i> (Sigma)	: % 0,2 / PBS
<i>Tween 20</i> (Sigma)	: % 0,1 / PBS
Keçi serumu (Sigma)	: % 3 / PBS
BSA ( <i>Bovine serum albumin</i> ) (Sigma)	: % 10 / PBS

Fc reseptörü bloklama solüsyonu

Primer antikorlar (1°):

- Tavşan Anti-PSTPIP2 poliklonal antikor (Sigma)
- Tavşan Anti-LSP1 poliklonal antikor (Sigma)
- Tavşan Anti-CORO2A poliklonal antikor (Sigma)
- Tavşan Anti-CTNNB1 poliklonal antikor (Sigma)
- Tavşan Anti-FMNL1 poliklonal antikor (Sigma)
- Tavşan Anti-DAAM1 poliklonal antikor (Sigma)
- Tavşan Anti-ACTR2 poliklonal antikor (Sigma)
- Keçi Anti-LPXN poliklonal antikor (Santa-Cruz)
- Keçi Anti-WDR1 poliklonal antikor (Santa-Cruz)
- Fare Anti-MEFV poliklonal antikor (Abnova)

Sekonder antikorlar (2°):

- Anti-Tavşan *Alexa-Fluor* (AF)-488 (Molecular Probes)
- Anti-Keçi *Alexa-Fluor* (AF)-488 (Molecular Probes)
- Anti-Fare *Alexa-Fluor* (AF)-568 (Molecular Probes)

*Phalloidin Alexa-Fluor* (AF)-488 (Invitrogen)

DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma)

*Prolong Antifade* kaplama solüsyonu (Invitrogen)

### 3.2. Yöntemler

Tez çalışması kapsamında kullanılan hücre göçü modeli, HL-60 (insan promiyelositik lösemik hücre hattı) hücreleri kullanılarak oluşturulmuştur. Bu hücreler; çoğalmaları, farklılaşmaları ve hücre göçüyle ilişkili genleri doğal olarak ifade etmeleri yönünden hücre göçü çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. % 96

oranında nötrofillere benzerlik gösteren HL-60 hücreleri, granülositik farklılaştırma ile tam bir nötrofil hücre sine dönüştürülebilmektedir (81, 82).

Dene ylerde; normal (farklılaşmamış), farklılaşmış (nötrofile farklılaşmış) ve farklılaşmış-uyarılmış (nötrofile farklılaşmış-göçe uyarılmış) hücreler olmak üzere üç farklı HL-60 hücre durumu kullanılmıştır. Hücrelerin tam bir nötrofile farklılaştırılması için, 6 gün süre ile % 1,28 oranında DMSO (Dimetil sülfoksit) uygulaması yapılmıştır. % 100 nötrofile farklılaştırılmış olan hücrelerin göç etmelerini tetiklemek için, 2 saat süre ile 100 µM fMLP (*N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine*) uyarımı yapılmıştır. Tüm hücreler, üçlü biyolojik tekrarlar halinde çoğaltılmıştır.

Bu tez kapsamında, HL-60 hücreleri ile oluşturulan hücre göçü modeli, anabilim dalımız tarafından sağlanmıştır.

### 3.2.1. RNA izolasyonu

İlgili genlerin ifade analizleri için; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden, *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen) ile aşağıda verilen protokol izlenerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi:

1. Hücre kültürü laboratuvarında gerekli işlemleri yapılmış olan HL-60 hücreleri, besiyerleri ile birlikte çoğaltıldıkları 6 kuyucuklu petri kaplarından alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı.
2. Tüpler oda sıcaklığında 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant kısımlar atıldı ve tüplerin dibine çöken hücre peletleri görüldü.
4. Her bir örnek için 350 µl RLT *Plus* tamponu içerisine 3,5 µl β-Me eklendi. Hazırlanan bu solüsyon örnekler üzerine eklendi ve hücre peletleri solüsyon içerisinde çözüldü.
5. Örnekler gDNA *Eliminator Mini Spin* kolonlarına aktarıldı ve 15000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
6. Kolonlar atıldı, toplama tüpleri saklandı.



7. Toplama tüpleri içerisindeki örneklere 350 µl % 70'lik etanol eklendi. Pipetaj yapılarak solüsyon homojen hale getirildi.
8. Örnekler *RNeasy Mini Spin* kolonlarına aktarıldı ve 15000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
9. Kolonlar saklandı, toplama tüpleri içerisindeki sıvılar atıldı.
10. Kolonlar içerisindeki örneklere 700 µl RW1 tamponu eklendi ve 15000 rpm'de 25 sn santrifüj edildi.
11. Kolonlar saklandı, toplama tüpleri içerisindeki sıvılar atıldı.
12. Kolonlar içerisindeki örneklere 500 µl RPE tamponu eklendi ve 15000 rpm'de 25 sn santrifüj edildi.
13. Kolonlar saklandı, toplama tüpleri içerisindeki sıvılar atıldı.
14. Kolonlar içerisindeki örneklere 500 µl RPE tamponu eklendi ve 15000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
15. Kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüpler üzerine konuldu, toplama tüpleri atıldı.
16. Kolonlar içerisindeki örneklere 25 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 15000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
17. Kolonlar atıldı ve RNA'lar 1,5 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde izole edilmiş oldu.

RNA izolasyonu aşamasında kullanılan tüm plastik ve cam malzemelerdeki RNazlar, % 0,1 DEPC ile muamele edilerek inaktif hale getirilmiştir.

### **3.2.2. RNA derişimlerinin ölçümü ve saflık kontrolü**

HL-60 hücrelerinden izole edilen RNA'ların derişimlerinin ölçülmesi ve RNA kalitelerinin kontrol edilmesi için *NanoDrop*® ND-1000 (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı ve yazılım programı aşağıda verilen protokol izlenerek kullanıldı:

1. Cihaz kullanılmadan önce, cihaz kuyucuğu ve kapağı de-iyonize su ile temizlendi.
2. Cihaz kuyucuğuna 2 µl de-iyonize su konuldu ve programdaki *BLANK* tuşuna basılarak cihaz kalibre edildi.
3. Ölçümü yapılacak molekül RNA olacak şekilde programda işaretlendi.

4. Ölçümü yapılacak örneklerden 2 µl cihaz kuyucuğuna yüklendi ve cihazın kapağı kapatıldı.
5. Programdaki *MEASURE* tuşuna basılarak RNA örneklerinin derişimleri ve saflık değerleri elde edildi.

### 3.2.3. cDNA sentezi

Derişimleri ölçülen ve kaliteleri kontrol edilen RNA'lar, *Quantitect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) ile aşağıda verilen protokol izlenerek cDNA'ya çevrildi:

1. Her örneğin RNA derişimi 600 ng/µl olacak şekilde hazırlandı. RNA miktarlarına bağılı olarak örneklere uygun miktarlarda RNaz içermeyen su eklenerek son hacim 12 µl'ye tamamlandı.
2. Hazırlanan RNA-RNaz içermeyen su karışımlarına 2 µl gDNA *wipeout* tamponu eklenerek son hacim 14 µl oldu.
3. Örnekler, *Gene Amplification PCR System 9700* (Applied Biosystem) cihazında 42°C'de 5 dk inkübe edildi.
4. İnkübasyon aşamasından sonra örnekler buz üzerine alındı.
5. *Reverse transcriptase* (RT) karışımı hazırlandı:

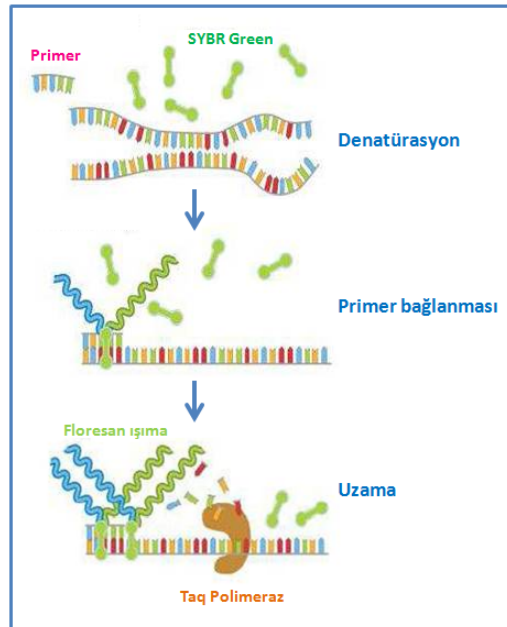
<i>Reverse transcriptase</i> tamponu, 5X	: 4 µl
<i>Reverse transcriptase</i> primer karışımı	: 1 µl
<i>Reverse transcriptase</i>	: 1 µl
Son hacim	: 6 µl

6. Her örneğe hazırlanan RT karışımından 6 µl eklendi ve tüpteki son hacim 20 µl oldu.
7. Örnekler, *Gene Amplification PCR System 9700* (Applied Biosystem) cihazında 42°C'de 30 dk ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi.
8. Her bir RNA örneğinden 20 µl cDNA elde edildi. cDNA'lar 1:2 oranında sulandırıldı ve son hacim 40 µl oldu.

cDNA sentezi aşamasında, kullanılan tüm plastik ve cam malzemelerdeki RNazlar % 0,1 DEPC ile muamele edilerek inaktif hale getirilmiştir.

### 3.2.4. Kantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ-PZR)

kGZ-PZR, nükleik asit amplifikasyonunun gerçek-zamanlı olarak gözlemlenmesine olanak tanıyarak, hedef genlerdeki göreceli kat artışlarının belirlenmesini sağlayan hassas bir yöntemdir. Amplifikasyon miktarı, çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan ışımaya veren özel boyaların kullanılmasıyla ölçülmektedir (Şekil 3.1.). kGZ-PZR'nin temel prensibi, reaksiyon sırasında oluşan ürüne bağlanan floresan boya ile doğru orantılı olarak artan floresan ışımının ölçülmesidir. Reaksiyon boyunca, artan ürün miktarına paralel olarak floresan ışımada artmakta ve amplifikasyon eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından takip edilebilmektedir (83).



**Şekil 3.1.** SYBR Green boyası kullanılarak gerçekleştirilen kGZ-PZR yönteminin aşamaları.

kGZ-PZR yönteminde, reaksiyona giren kalıp cDNA miktarı ne kadar fazla ise, ilk floresan sinyalinin alındığı döngü sayısı o kadar düşük olmaktadır. Üründeki ilk anlamlı artışı belirten ve eşik döngü (*Ct*, *threshold cycle*) olarak tanımlanan değer, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan sinyalinin eşik değeri aştığı döngüdür (83).

Reaksiyondaki floresan artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermeyebilir. *SYBR Green* boyası, hedef dizi yerine primer dimerleri ya da özgül olmayan PZR ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilme özelliği taşımaktadır. Bu nedenle, reaksiyon sırasında oluşan amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğü, erime eğrisi ( $T_m$ , *melting curve*) grafiği ile belirlenmelidir. Eğer amplifikasyon özgülse, tüm örnekler primere özgü tek bir  $T_m$  derecesinde tepe noktası vermiş olmalıdır (83).

Son olarak reaksiyonun verimliliği, standart eğri grafiği üzerinden belirlenmektedir. Standart eğri, örnekler arasında Ct değeri en düşük olan örneğin standart olarak seçilmesi ve bu örnekten seri dilüsyonların hazırlanması sonucu elde edilmektedir. Standart eğrinin  $R^2$  (korelasyon kat sayısı) değeri, deneysel verinin regresyon eğrisine uygunluğunu ve tekrarlar arası farkı ifade etmektedir. Optimal değeri 0.99 ile 1.0 arasında olmalıdır. Bir döngü tamamlandığında PZR ürün miktarının  $2^n$  kadar artması amplifikasyon etkinliği olarak tanımlanmaktadır ve bu değer % 90 ile % 110 değerleri arasında ( $\approx 1$ ) olması beklenmektedir. Standart eğri eğimi (*slope*) ise, reaksiyon etkinliği ile doğru orantılıdır ve -3.6 ile -3.1 arasında bir değerde olması gerekmektedir. Standart eğri grafiği üzerinden hesaplanan  $R^2$ , eğim ve reaksiyon etkinliğinin belirtilen değerlerde çıkması, reaksiyonun verimli bir şekilde gerçekleştiğini gösteren parametrelerdir (83).

Tez çalışması kapsamında; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde aktin ile ilişkili ilgili genlerin ifade değişimlerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen kGZ-PZR, aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

- 1. Normalizatör gen koşulları:** Farklı fizyolojik durumlarda ifadesi en az değişen ve bağışıklık sistemi hücrelerinde değişmeyen seviyede bir ifadeye sahip olan ACTB ( $\beta$ -aktin) *housekeeping* geni kGZ-PZR deneylerinde normalizatör olarak kullanıldı (84). Bu aşamada, standart örneğin 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranlarında seri dilüsyonları hazırlandı. Hazırlanan standart dilüsyonları ve üçlü biyolojik tekrarlı örnekler, üçlü deneysel tekrarlar olacak şekilde ACTB genine özgü primerler kullanılarak reaksiyon hazırlandı.

**2. Hedef gen koşulları:** Hedef genlere ait primerler için uygun deneysel koşullar (sıcaklık, süre, döngü vb.) üçlü biyolojik tekrarlar kullanılarak optimize edildi. Ayrıca, her bir hedef gen için bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek standartlı ve üçlü deneysel tekrarlı reaksiyonlar için standart örnekler belirlendi. Hedef genlerin belirlenen standart örnekleri için 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan standart dilüsyonları ve üçlü biyolojik tekrarlı örnekler, üçlü deneysel tekrarlar olacak şekilde ilgili gene özgü primerler kullanılarak reaksiyon hazırlandı. Bu aşama, her bir hedef gen için ayrı ayrı yapıldı.

kGZ-PZR analizleri için *SYBR® Green Jump Start Taq Ready™* karışımı, 2X (Sigma) kullanıldı. Reaksiyonlar, aşağıda verilen protokole göre hazırlandı:

<i>SYBR Green</i> karışımı, 2X	: 5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	: 1,2 µl
<i>Forward</i> primer (10 pmol)	: 0,4 µl
<i>Reverse</i> primer (10 pmol)	: 0,4 µl
cDNA	: 2 µl
De-iyonize su	: 1 µl
<hr/>	
Son Hacim	: 10 µl

Reaksiyonlar, *Corbett Life Sciences Rotor-Gene 6000* (Qiagen) kGZ-PZR cihazında Tablo 3.1.'de verilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1.** kGZ-PZR deneylerinde uygulanan reaksiyon koşulları.

Gen adı	Reaksiyon koşulları		
	Denatürasyon	Amplifikasyon	Erime
ACTB	94°C / 2 dk 94°C / 5 sn	59°C / 20 sn (40 döngü)	50°C - 99°C (her derecede 1 dk)
PSTPIP2 LSP1 LPXN CORO2A CTNNB1 WDR1 FMNL1 DAAM1 ACTR2	94°C / 2 dk 94°C / 5 sn	57°C / 20 sn 72°C / 15 sn (50 döngü)	50°C - 99°C (her derecede 1 dk)

kGZ-PZR deneylerinde kullanılan, normalizatör ve hedef genlere özgül *Forward* (F) ve *Reverse* (R) primer çiftlerinin dizileri ve oluşturdukları amplicon boyları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Primer dizileri ve amplikon boyları.

<b>Gen Adı</b>	<b>Primer Dizileri</b>	<b>Amplikon Boyu (bp)</b>
<b>ACTB</b>	F: 5'CGCAAAGACCTGTACGCCAAC3'	165
	R: 5'GAGCCGCCGATCCACACG3'	
<b>PSTPIP2</b>	F: 5'CACATTCAGCTTGCACAGAG3'	194
	R: 5'TCTGCCTCATCTTTGTCCC3'	
<b>LSP1</b>	F: 5'ACCTGGAGGAGTTGAGTCTG3'	203
	R: 5'CCTGTCGATGAGTTTGGTGG3'	
<b>LPXN</b>	F: 5'CACTTCTTCTGCTCTCACTG3'	189
	R: 5'ACAAACAAAGCACTCTGGG3'	
<b>CORO2A</b>	F: 5'TGGATGTCAAGTGGAACCCT3'	221
	R: 5'GATCATCACCTTGTAGTCATAGCC3'	
<b>CTNNB1</b>	F: 5'CCATTACAACCTCTCCACAACC3'	194
	R: 5'ACCACTAGCCAGTATGATGAG3'	
<b>WDR1</b>	F: 5'GCCCTTGCTGACATCTAC3'	245
	R: 5'ACTGCTCCAAACTTCTCC3'	
<b>FMNL1</b>	F: 5'ATGAACTTCCGTGTCTTCCT3'	167
	R: 5'TTCTTGGTCTCTGTGTCCTC3'	
<b>DAAM1</b>	F: 5'AACTGCCCCGAGAACAACACTG3'	229
	R: 5'GCTCTCCGACCATCAATCAC3'	
<b>ACTR2</b>	F: 5'CAGAACCTCCTATGAACCCA3'	132
	R: 5'CAGTCAATAAACCTTGAGCGT3'	
<b>MEFV</b>	F: 5'GCAGGACATTGGAGACATC3'	186
	R: 5AGCTCTGGAACATTGAACATT3'	

### 3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR yönteminde, amplifikasyon ürünlerinin boyutları ve amplifikasyonun özgülüğü agaroz jel elektroforezi ile belirlenmektedir (Bkz. 3.2.6.). Bu şekilde, ürünler UV ışık altında bantlar halinde görüntülenir. PZR yöntemi ile, kGZ-PZR yöntemindeki gibi kantitatif analizler yapılamamaktadır. Bu yöntemle, hedef gen ürünleri ile standart gen ürünlerinin oluşturdukları bantların yoğunlukları görsel olarak karşılaştırılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında, MEFV geni ifadesinin kGZ-PZR yöntemiyle kantite edilememesinden dolayı ifade analizi için PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntem; normal, farklılaşmış, farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücreleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan THP-1 hücrelerinde uygulandı. PZR deneyleri için, reaksiyonlar aşağıda verilen protokole göre hazırlandı:

<i>Taq</i> DNA polimeraz tamponu, 10X	: 5 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	: 0,5 µl
dNTP (2,5 mM)	: 2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	: 4 µl
<i>Forward</i> primer (10 pmol)	: 0,5 µl
<i>Reverse</i> primer (10 pmol)	: 0,5 µl
cDNA	: 3 µl
De-iyonize su	: 34,5 µl
<hr/>	
Son Hacim	: 50 µl

Reaksiyonlar, *Gene Amplification PCR System 9700* (Applied Biosystem) PZR cihazında Tablo 3.3.'de verilen reaksiyon koşullarında gerçekleştirildi. MEFV ve ACTB genlerine özgü kullanılan primer çiftlerinin dizileri ve ampikon boyları Tablo 3.2.'de verilmiştir.



**Tablo 3.3.** PZR deneylerinde uygulanan reaksiyon koşulları.

Gen adı	Reaksiyon koşulları		
	Denatürasyon	Amplifikasyon	Erime
ACTB	94°C / 5 dk 94°C / 30 sn	59°C / 30 sn 72°C / 30 sn (30 döngü)	72°C / 2 dk
MEFV	94°C / 5 dk 94°C / 30 sn	54°C / 30 sn 72°C / 30 sn (35 döngü)	72°C / 2 dk

### 3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen cDNA'ların kalitelerinin kontrol edilmesi, kGZ-PZR ürünlerinin özgülüklerinin belirlenmesi ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle, ürünlerin ampikon büyüklükleri moleküler ağırlık belirleyicisine göre belirlendi. Agaroz jel elektroforezi için aşağıda verilen protokol izlendi:

1. % 2,5'lük agaroz jel hazırlamak için; 2,5 g agaroz ve 100 ml 1X TAE tamponu ölçülerek karıştırıldı. Karışım homojen hale gelene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı.
2. Homojen hale gelen karışım 50-60°C'de soğutuldu.
3. Karışım içerisine, nükleik asitlere interkale olarak UV altında görünür olmalarını sağlayan EtBr ajanından 10 µl eklendi.
4. Jel tablasına kuyucukların oluşmasını sağlayan taraklar yerleştirildi ve hazırlanan jel tablaya döküldü.
5. Jel oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilerek polimerleşmesi beklendi.
6. Polimerleşen jel elektroforez tankı içerisine konuldu.
7. Elektroforez tankına uygun miktarlarda 1X TAE tamponundan eklendi.
8. Yürütülecek örnekler hazırlandı; 10 µl'lik örnekler üzerine 10 µl yükleme tamponu koyuldu. Son hacim 20 µl oldu.

9. İlk jel kuyucuğuna 4 µl 50 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi yüklendi. Diğer kuyucuklara sırasıyla örneklerden 20'şer µl yüklendi.
10. Örnekler, 120 V'da 30 dk yürütüldü.
11. Jel, *Biodoc Analyze* (Biometra) UV görüntüleme cihazı altında görüntülendi.

### 3.2.7. İmmünfloresan (IF) boyama

İmmünfloresan boyama, hücre veya dokulardaki proteinlerin floroforlarla işaretlenerek görünür hale getirildiği yaygın olarak kullanılan bir immünboyama tekniğidir. Floroforlar, doku ve hücrelerdeki moleküllerin işaretlenerek görünür hale getirilmesini sağlayan renk veren kimyasallardır. Bunlar, primer veya sekonder antikora bağlı olabilmektedir. Primer antikorun işaretlenmeyerek sadece sekonder antikorun işaretlendiği indirek yöntem, yüksek özgüllük sağlayan bir yöntemdir (15, 25).

IF boyama yönteminde, antijen-antikor bağlanmasının özgüllüğü önemli bir kriterdir. Burada, görüntülenmek istenen hedef protein antijen, hedef proteini tanıyıp bağlanan molekül ise antikordur. Antijen-antikor bağlanması, antijenin epitop bölgesi ile antikorun antijen-bağlanma bölgesi arasında gerçekleşen geri-dönüştürülebilir bir tepkimedir. Antikorlar, antijene bağlandıkları bölgelere göre poliklonal (birden çok epitopa bağlanabilen) ya da monoklonal (tek bir epitopa bağlanabilen) olabilmektedir (15, 25).

IF boyamalarda, iki farklı antijenin aynı preparat üzerinde farklı antikolar ve farklı renkteki floresan işaretlerle görüntülenmesi eş boyama olarak tanımlanmaktadır. Aynı örnek üzerinde eş zamanlı olarak iki farklı proteini tanıyan antikolar ile boyama yapıldığında, primer antikoların farklı canlılarda üretilmiş olmasına dikkat edilmelidir. Eş boyama sonucunda, her protein farklı floroforlarla işaretlendiğinden, floresan miktarı da farklı filtreler altında görüntülenebilmektedir (15, 25).

Bu çalışmada; aktin ile ilişkili ilgili proteinlerin normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin ile birlikte yerleşim gösterip göstermedikleri eş boyama tekniği kullanılarak analiz edildi. Eş boyama için aşağıda verilen protokol izlendi:

1. **Tespit aşaması:** *Nunc Lab Tek® II Chamber Slide™* (Milian Dutscher) preparatlarında süspanse halde bulunan hücreler besiyerlerinden uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerlerine 300 µl % 4'lük PFA (Paraformaldehit) solüsyonu uygulandı ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilerek hücreler zemine tespit edildi. Hücreler 1X PBS ile 1 defa yıkandı.
2. **Permeabilizasyon aşaması:** Hücrelere % 0,2'lik *Triton X-100* / 1X PBS solüsyonundan 300 µl eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Bu şekilde hücrelerin zar geçirgenlikleri arttırıldı. Hücreler 1X PBS ile 1 defa yıkandı.
3. **Bloklama aşaması:** Nötrofillerin hücre zarları üzerinde çok sayıda Fc reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler boyama sırasında antikorların hücre içerisine girmelerini engellemekle birlikte zarda yalancı bir boyamaya da neden olmaktadır. Bu nedenle bu reseptörlerin, Fc reseptör engelleyicileri ile kapatılması gerekmektedir. Bu aşamada; % 10'luk BSA, % 3'lük keçi serumu ve % 0,1'lik *Tween 20* / 1X PBS ile hazırlanan bloklama solüsyonuna 1:1 oranında Fc reseptörü bloklama solüsyonu eklendi. Hücrelere bu karışımdan 160 µl eklenerek oda sıcaklığında 1 sa inkübe edildi. Bu şekilde, hem bloklama aşaması yapıldı hem de hücre zarlarında bulunan Fc reseptörleri kapatıldı.
4. **Birinci primer antikor (1°) aşaması:** Pürin proteinine ait primer antikor (Anti-MEFV, Fare) Tablo 3.4.'de belirtilen dilüsyon oranında, Fc reseptörü bloklama solüsyonu ve % 0,1'lik *Tween 20* / 1X PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı. Hücrelere bu karışımdan 160 µl eklenerek oda sıcaklığında 1 sa inkübe edildi. Hücreler 1X PBS ile 1 defa yıkandı.
5. **Birinci sekonder antikor (2°) aşaması:** Pürin proteinine ait sekonder antikor (Anti-Fare, AF-568) Tablo 3.5.'de verilen dilüsyon oranında, Fc reseptörü bloklama solüsyonu ve % 0,1'lik *Tween 20* / 1X PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı. Hücrelere bu karışımdan 160 µl eklenerek oda sıcaklığında 40 dk inkübe edildi. Hücreler 1X PBS ile 2 defa yıkandı.
6. **İkinci primer antikor (1°) aşaması:** Aktin ile ilişkili ilgili proteinlere ait primer antikorlar, Tablo 3.4.'de belirtilen dilüsyon oranlarında, Fc reseptörü bloklama solüsyonu ve % 0,1'lik *Tween 20* / 1X PBS solüsyonu içerisinde

hazırlandı. Hücrelere bu karışımdan 160 µl eklenerek oda sıcaklığında 1 sa inkübe edildi. Hücreler 1X PBS ile 1 defa yıkandı.

7. **İkinci sekonder antikor (2°) aşaması:** Aktin ile ilişkili ilgili proteinlere ait sekonder antikorlar, Tablo 3.5.'de belirtilen dilüsyon oranlarında, Fc reseptörü bloklama solüsyonu ve % 0,1'lik *Tween 20* / 1X PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı. Hücrelere bu karışımdan 160 µl eklenerek oda sıcaklığında 40 dk inkübe edildi. Hücreler 1X PBS ile 2 defa yıkandı.
8. **DAPI boyaması:** Hücre çekirdeklerinin görünür hale gelmesini sağlayan DAPI boyası 1:4000 oranında de-iyonize su kullanılarak hazırlandı. Hücreler bu solüsyon içerisinde oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi. Hücreler de-iyonize su ile 3 defa yıkandı.
9. **Kapatma:** Lamlara uygun miktarlarda *Prolong Antifade* (Invitrogen) kaplama solüsyonu eklenerek lamel ile üzerleri kapatıldı.
10. **Görüntüleme:** Hazırlanan preparatlar, LCM-510 (Carl-Zeiss) konfokal mikroskobu ve IM50 (Leica) floresan mikroskobu kullanılarak incelendi.

**Tablo 3.4.** IF boyamalarda kullanılan primer antikorlara ait dilüsyon oranları.

<b>Primer Antikorlar (1°)</b>	<b>Dilüsyon Oranları</b>
Anti-PSTPIP2	1:50
Anti-LSP1	1:50
Anti-LPXN	1:50
Anti-CORO2A	1:200
Anti-CTNNB1	1:200
Anti-WDR1	1:50
Anti-FMNL1	1:50
Anti-DAAM1	1:1000
Anti-MEFV	1:50

**Tablo 3.5.** IF boyamalarda kullanılan sekonder antikorlara ait dilüsyon oranları.

Sekonder Antikorlar (2°)	Dilüsyon Oranları
Anti-Tavşan AF-488	1:1000
Anti-Keçi AF-488	1:1000
Anti-Fare AF-568	1:500

### 3.2.8. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler

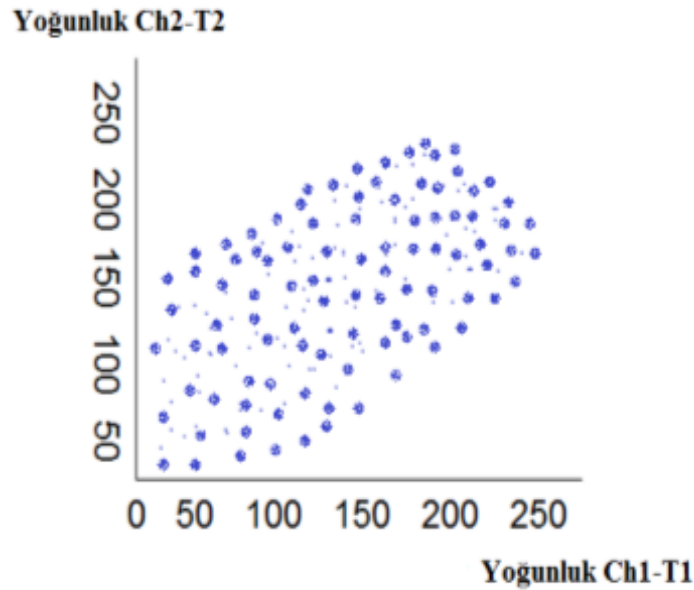
Aktin ile ilişkili ilgili genlerin ifade değişimlerinin analizinde kGZ-PZR ile elde edilen veriler, *Rotor-Gene 6000 Series 1.7 Build 87* (Qiagen) yazılım programı kullanılarak değerlendirildi. Genlerdeki ifade değişimlerinin belirlenmesinden önce, ilgili gene ait reaksiyon koşullarının kantitasyona uygun olup olmadığı belirlendi (Bkz. 3.2.4.). Daha sonra, hedef genlerin miktarlarındaki değişimler, örneklere ait tekrarların ortalama Ct değerlerinin alınmasıyla ACTB *housekeeping* genine göre normalize edildi. Elde edilen sonuçlar, kontrol grup ile karşılaştırılarak göreceli kantitasyon ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) yöntemine göre hesaplandı. Bu çalışmada, ilgili genlerin ifadeleri “farklılaşma” ve “göçe-uyarılma” olmak üzere iki farklı süreçte incelendi. Buna göre; farklılaşma sürecindeki ifade değişimleri belirlenirken normal hücreler kalibratör olarak seçilip farklılaşmış hücrelerin kat artış/azalışları belirlendi. Göçe-uyarılma sürecinde ise, farklılaşmış hücreler kalibratör olarak seçilip farklılaşmış-uyarılmış hücrelerin kat artış/azalışları belirlendi. Genlere ait ifade değişimlerinin saptanmasından sonra, kat artış/azalışlarının istatistiksel anlamlılıkları *Student's T-test* ile *GraphPad Prism 5.01* yazılımı kullanılarak analiz edildi. Buna göre;  $p \leq 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.

PZR sonrasında, MEFV genine ve standart gene özgül amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bantların yoğunlukları görsel olarak karşılaştırıldı.

IF boyamalar için elde edilen negatif kontrol örnekleri, primer antikorların uygun dilüsyon oranlarının belirlenmesi için yapılan optimizasyon boyamaları ve aktin boyamaları, IM50 (Leica) floresan mikroskobunda incelendi. Elde edilen görüntüler, *Application Suit 3.1* (Leica) programı kullanılarak analiz edildi. Eş

boyamalar ise, LCM-510 (Carl-Zeiss) konfokal mikroskobunda incelenerek değerlendirildi. Elde edilen görüntüler, *LSM Image Browser* (Carl-Zeiss) yazılım programı kullanılarak çizilen profil ve korelasyon eğrilerine göre analiz edildi.

Profil eğrileri, boyaması yapılan iki proteinden gelen sinyallerin yoğunluklarını seçilen mesafe boyunca gösteren eğrilerdir. Eğer iki protein aynı bölgede yoğun sinyal içeriyorsa, eğrinin o bölgesinde sinyaller üst üste gelmektedir. Bu durum iki proteinin aynı bölgede eşit sinyaller verdiğini gösterir. Korelasyon eğrisi ise, iki proteinin birlikte yerleşip yerleşmediği hakkında nicel sonuç veren bir eğridir. Burada, her bir piksel içerisinde her iki proteinden gelen sinyaller ölçülmektedir. Eğer iki protein birlikte yerleşim gösteriyorsa, proteinlerden aynı yoğunluklarda sinyaller gelir ve eğri doğrusal bir hal alır (Şekil 3.2). Eğer proteinler birbirlerinden bağımsız yerleşim gösteriyorlarsa, eğri tek bir sinyal kanal bölgesinde yoğunlaşır ya da dağınık bir yerleşim gösterir.



**Şekil 3.2.** Birlikte yerleşim gösteren iki protein için çizilen korelasyon eğrisinin beklenen görüntüsü.

## 4. BULGULAR

### 4.1. RNA Derişimleri ve Saflıkları

Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin derişim ve saflık değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış hücrelerden elde edilen RNA derişim değerleri ve saflık oranları.

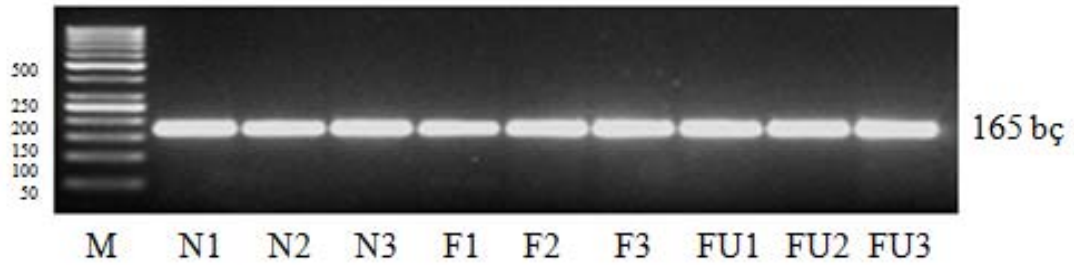
Hücre tipi	RNA derişimleri (ng/ $\mu$ l)	RNA saflık oranları (260/280 nm)
N1	551,9	2,05
N2	564,1	2,06
N3	566,2	2,04
F1	267,1	2,02
F2	389,8	2,01
F3	347,3	2,01
FU1	260,2	2,01
FU2	476,9	2,00
FU3	488,0	2,05

(N: Normal HL-60; F: Farklılaşmış HL-60; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60)

## 4.2. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kGZ-PZR)

### 4.2.1. cDNA kontrolü

RNA izolasyonu sonucu elde edilen cDNA örneklerinin (N1, N2, N3, F1, F2, F3, FU1, FU2, FU3) amplifikasyonlarını kontrol etmek amacıyla ACTB genine özgül primerler ile kGZ-PZR gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, cDNA örneklerinin Ct değerinin 10, Tm değerinin ise 87°C olduğu gözlenmiştir (Bkz. EK 1). Daha sonra uygulanan agaroz jel elektroforezi sonucu, örneklerin 165 bp uzunluğunda beklenen uzunlukta ürün oluşturdukları görülmüştür (Şekil 4.1.). Bu verilere göre, cDNA örneklerinin sonraki aşamalarda kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



**Şekil 4.1.** cDNA örneklerinde ACTB geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi).

### 4.2.2. ACTB geni ifade analizi

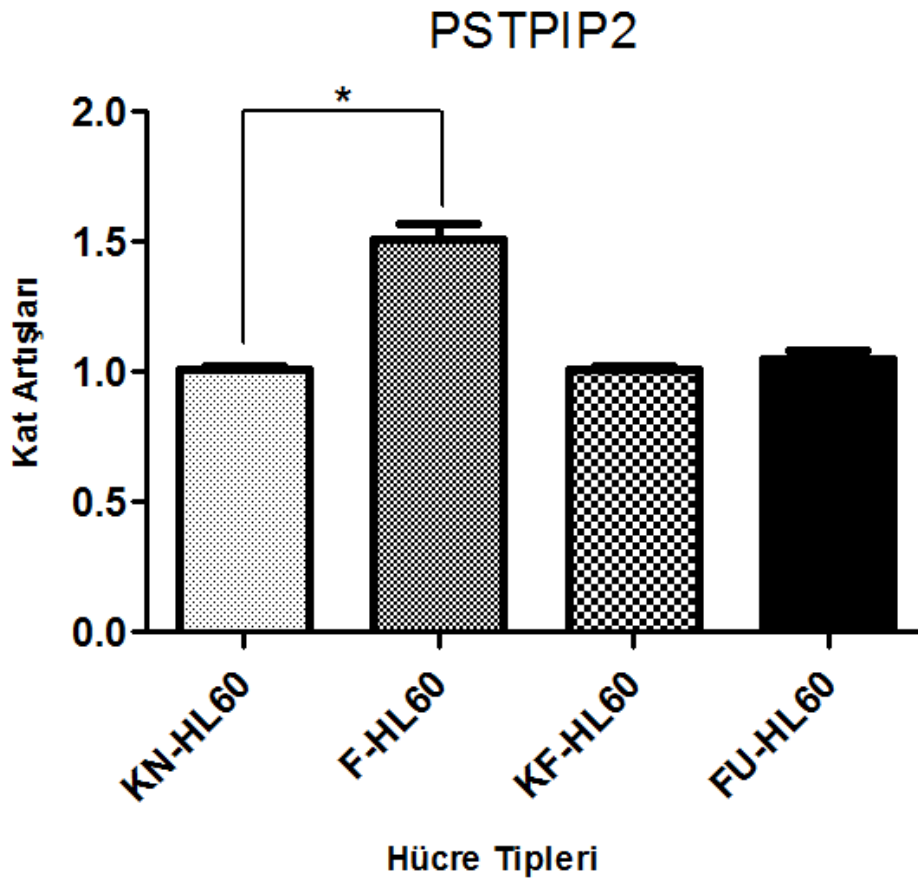
ACTB geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 10-15 arası, Tm değerinin ise 86,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 165 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan  $R^2$  değerinin 0,99805, eğim değerinin -3,291 ve reaksiyon veriminin ise 1,01 değerinde olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 2). Bu sonuçlara göre, ACTB geninin, aktin ile ilişkili genlerin ifade değişimlerinin belirlenmesinde normalizatör gen olarak kullanılması uygun görülmüştür.



### 4.2.3. PSTPIP2 geni ifade analizi

PSTPIP2 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 81,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 194 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,99558, eğim değerinin -3,356 ve reaksiyon veriminin ise 0,99 değerinde olduğu elde edilmiştir (Bkz. EK 3).

PSTPIP2 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 1,51 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0338), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,05 katlık bir artış gözlenmiştir (p=0,9336) (Şekil 4.2.).

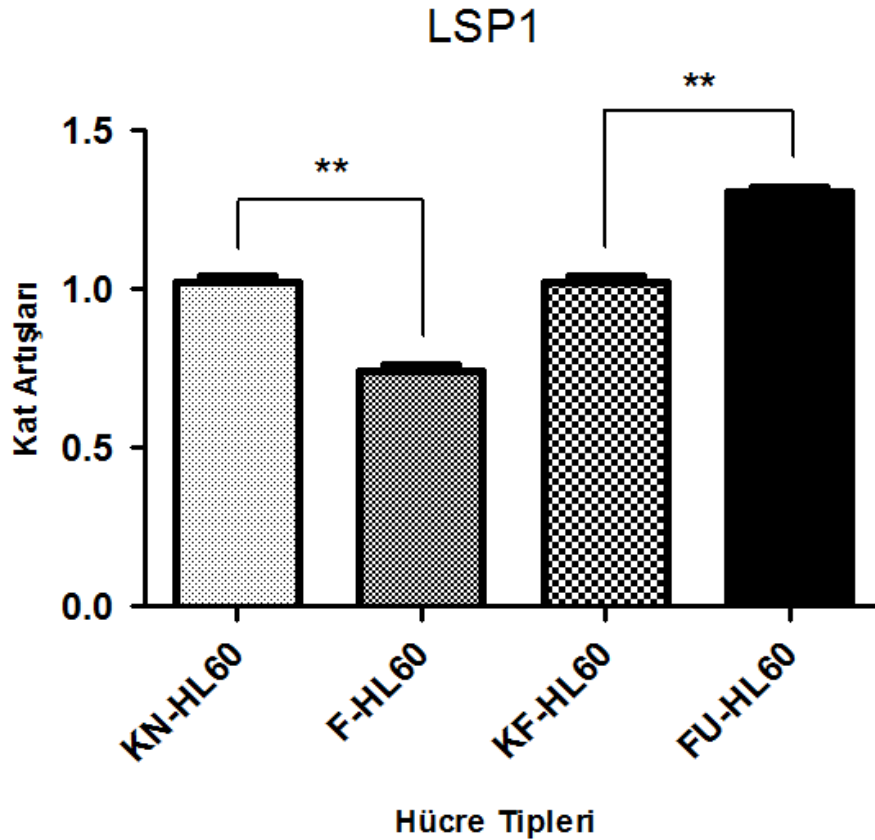


**Şekil 4.2.** PSTPIP2 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılmış süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.4. LSP1 geni ifade analizi

LSP1 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 89°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 203 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,99597, eğim değerinin -3,581 ve reaksiyon veriminin ise 0,90 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 4).

LSP1 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 0,74 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir azalış (p=0,0016), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,31 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0036) gözlenmiştir (Şekil 4.3.).

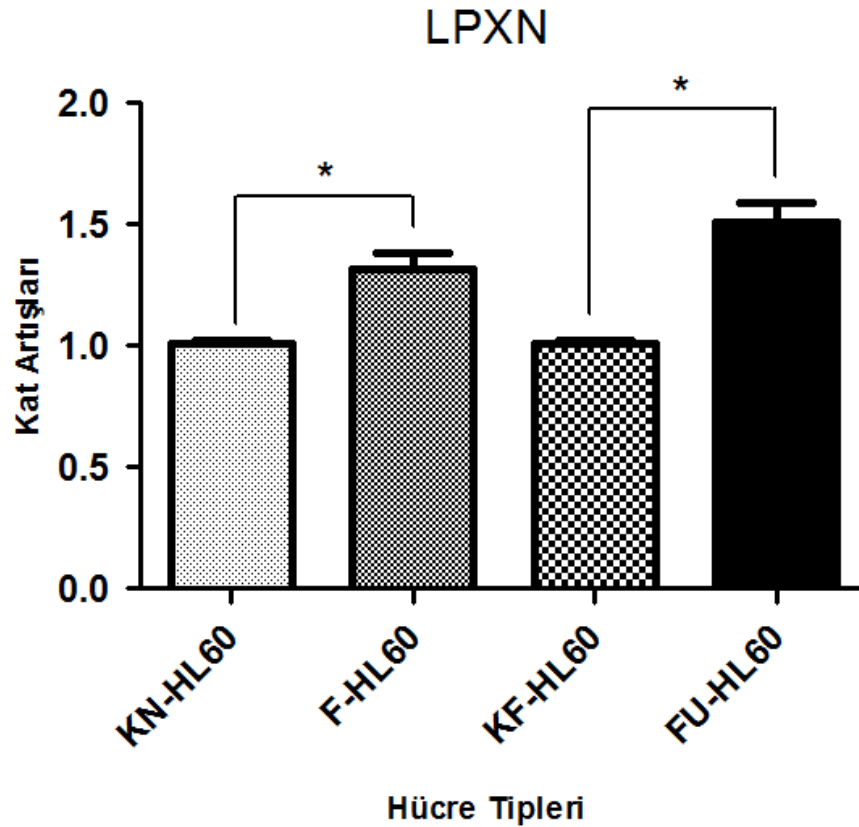


**Şekil 4.3.** LSP1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.5. LPXN geni ifade analizi

LPXN geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 84,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 189 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,98636, eğim değerinin -3,293 ve ölçülen reaksiyon veriminin 1,01 değerinde olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 5).

LPXN geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 1,32 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0399), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,51 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0269) gözlenmiştir (Şekil 4.4.).

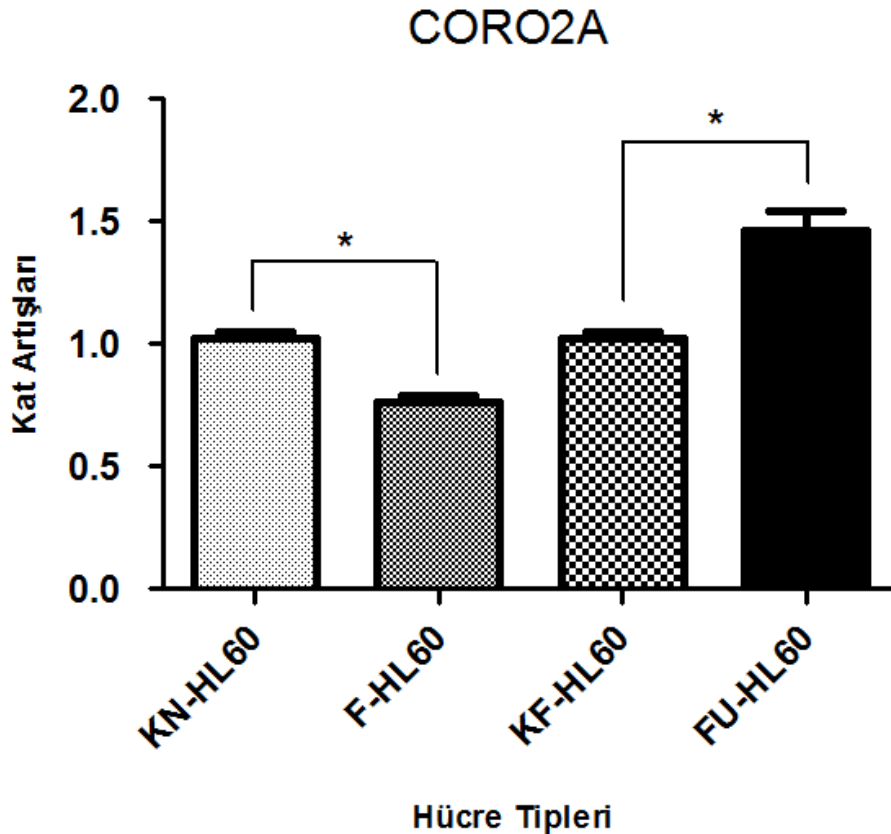


**Şekil 4.4.** LPXN geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.6. CORO2A geni ifade analizi

CORO2A geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 18, Tm değerinin ise 88,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 221 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,97579, eğim değerinin -2,825 ve reaksiyon veriminin ise 1,26 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 6).

CORO2A geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 0,76 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir azalış (p=0,0270), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,46 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0397) gözlenmiştir (Şekil 4.5.).

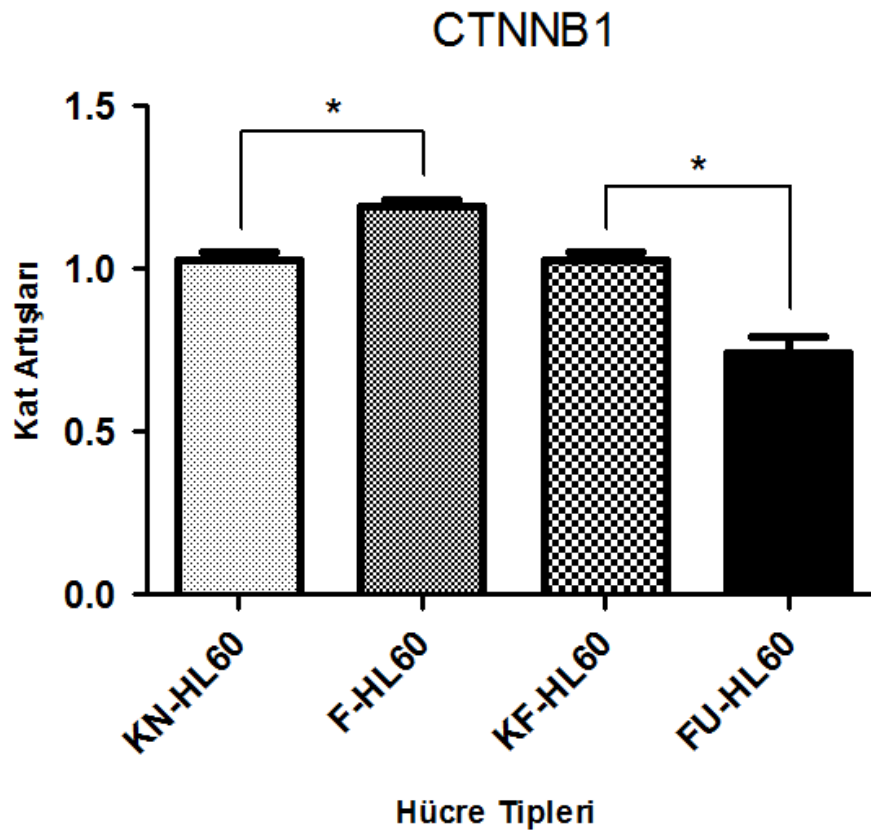


**Şekil 4.5.** CORO2A geninin farklılaşma ve göçe-uyarıma süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.7. CTNNB1 geni ifade analizi

CTNNB1 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 82,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 194 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,94931, eğim değerinin -3,407 ve reaksiyon veriminin 0,97 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 7).

CTNNB1 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 1,19 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0141), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 0,74 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir azalış (p=0,0339) gözlenmiştir (Şekil 4.6.).

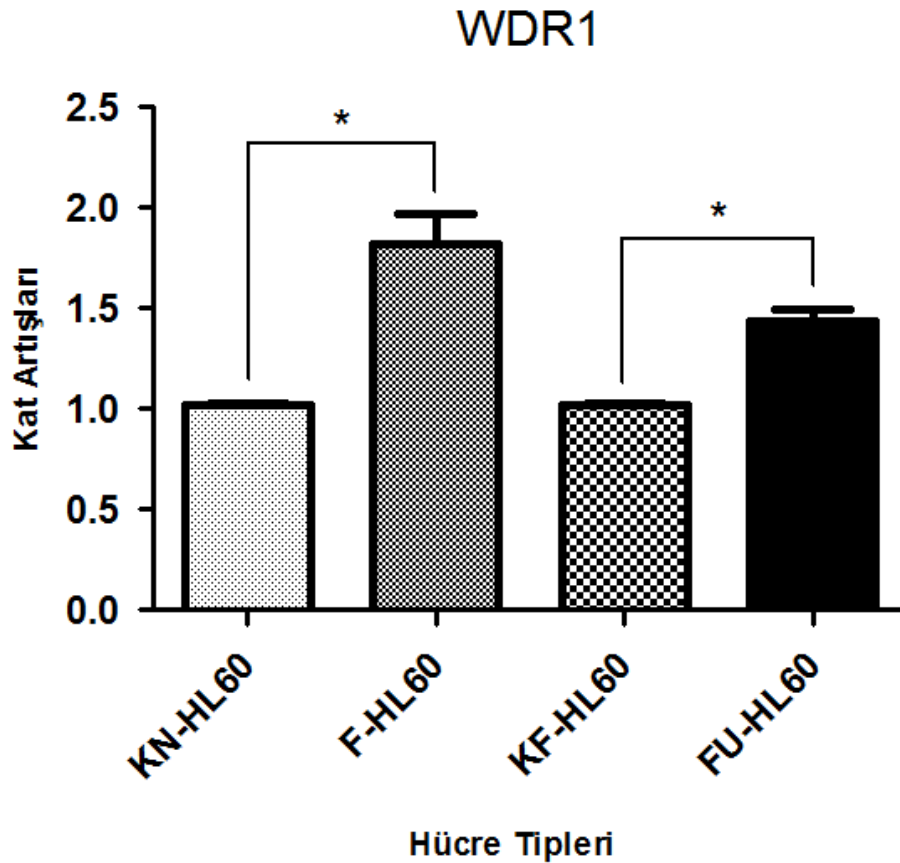


**Şekil 4.6.** CTNNB1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılmış süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.8. WDR1 geni ifade analizi

WDR1 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 85,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 245 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,99724, eğim değerinin -3,387 ve reaksiyon veriminin 0,97 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 8).

WDR1 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 1,82 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0397), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,43 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0207) gözlenmiştir (Şekil 4.7.).

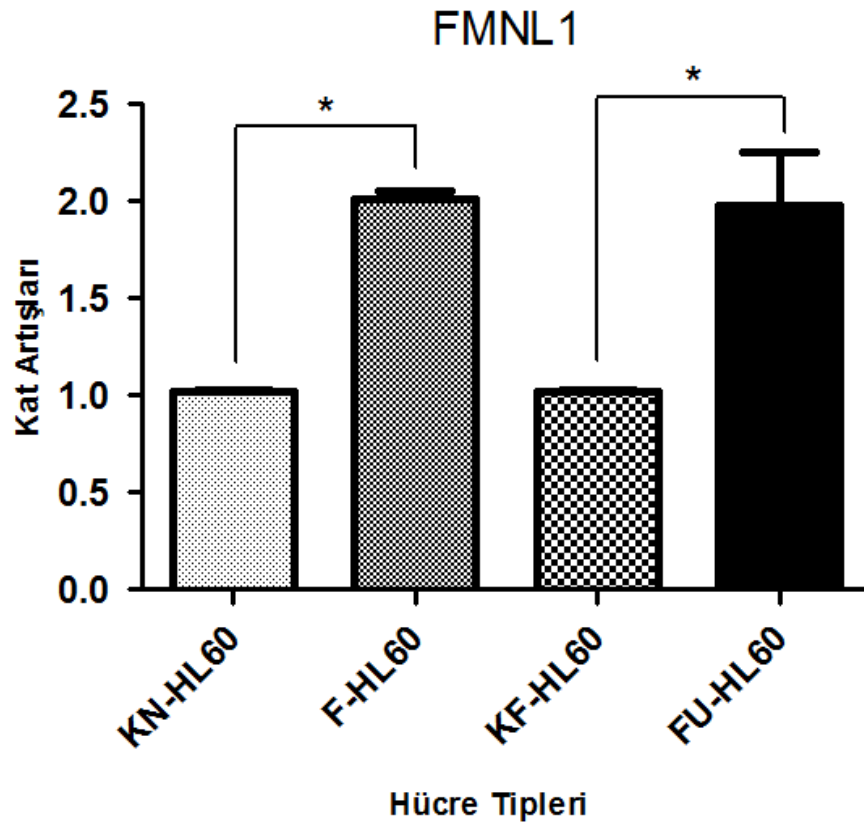


**Şekil 4.7.** WDR1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.9. FMNL1 geni ifade analizi

FMNL1 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 86°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 167 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,99765, eğim değerinin -3,532 ve reaksiyon veriminin 0,92 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 9).

FMNL1 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 2,01 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0356), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,98 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0351) gözlenmiştir (Şekil 4.8.).

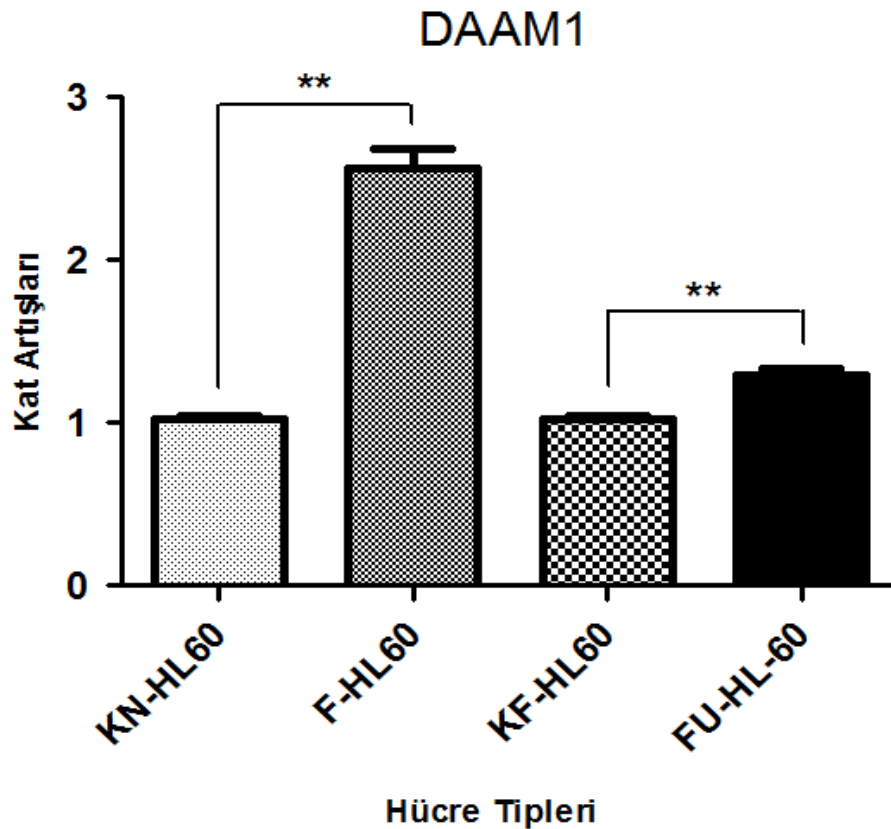


**Şekil 4.8.** FMNL1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

#### 4.2.10. DAAM1 geni ifade analizi

DAAM1 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 17, Tm değerinin ise 81,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 229 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,99745, eğim değerinin -3,266 ve reaksiyon veriminin 1,02 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 10).

DAAM1 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 2,56 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0019), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,30 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0083) gözlenmiştir (Şekil 4.9.).



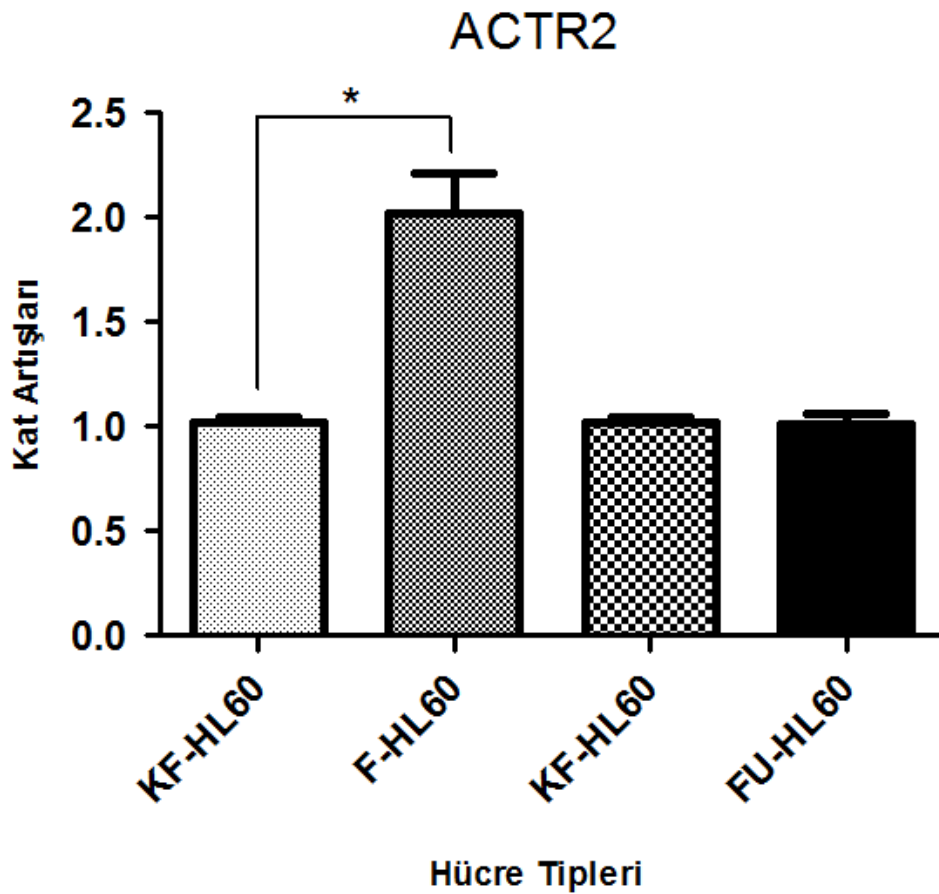
**Şekil 4.9.** DAAM1 geninin farklılaşma ve göçe-uyarıлма süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).



#### 4.2.11. ACTR2 geni ifade analizi

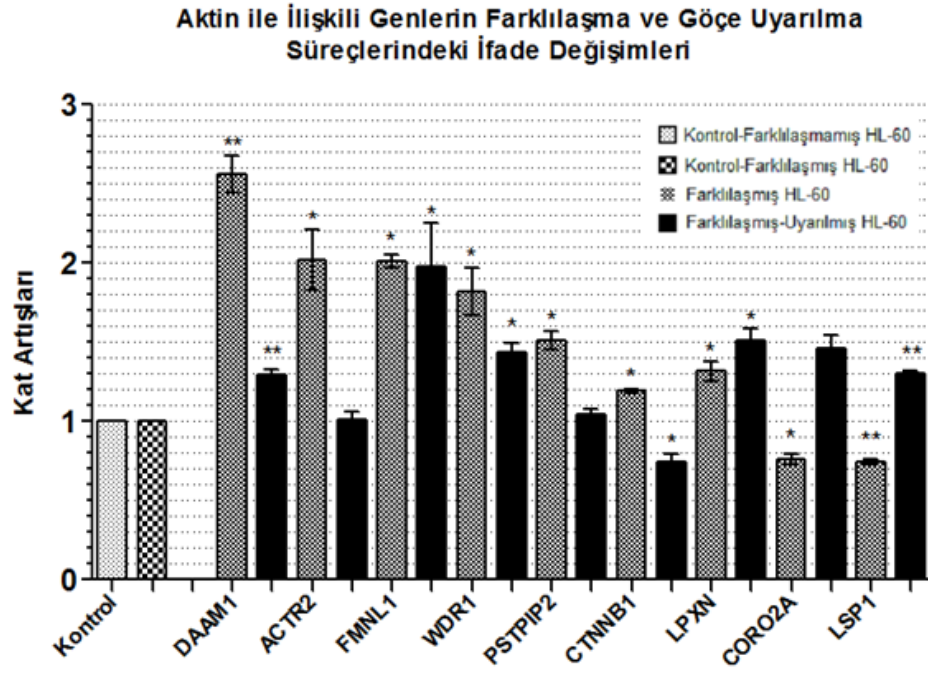
ACTR2 geni ifade analizinde; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin Ct değerinin 15, Tm değerinin ise 80,5°C olduğu görülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde 132 bp uzunluğunda beklenen amplifikasyon ürünü gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> değerinin 0,99919, eğim değerinin -3,287 ve reaksiyon veriminin 1,01 olduğu sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. EK 11).

ACTR2 geni ifadesinde, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları süreçte 2,02 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış (p=0,0475), hücrelerin göçe uyarıldıkları süreçte ise, 1,01 katlık bir artış (p=0,5210) gözlenmiştir (Şekil 4.10.).



**Şekil 4.10.** ACTR2 geninin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları. (KN: Kontrol-Normal; F: Farklılaşmış; KF: Kontrol-Farklılaşmış; FU: Farklılaşmış-Uyarılmış; \*: istatistiksel olarak anlamlı).

kGZ-PZR deneyleri sonucunda; aktin ile ilişkili ilgili genlerin, hücrelerin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalış ve istatistiksel olarak anlamlılık değerleri Şekil 4.11.'de gösterilmiştir.



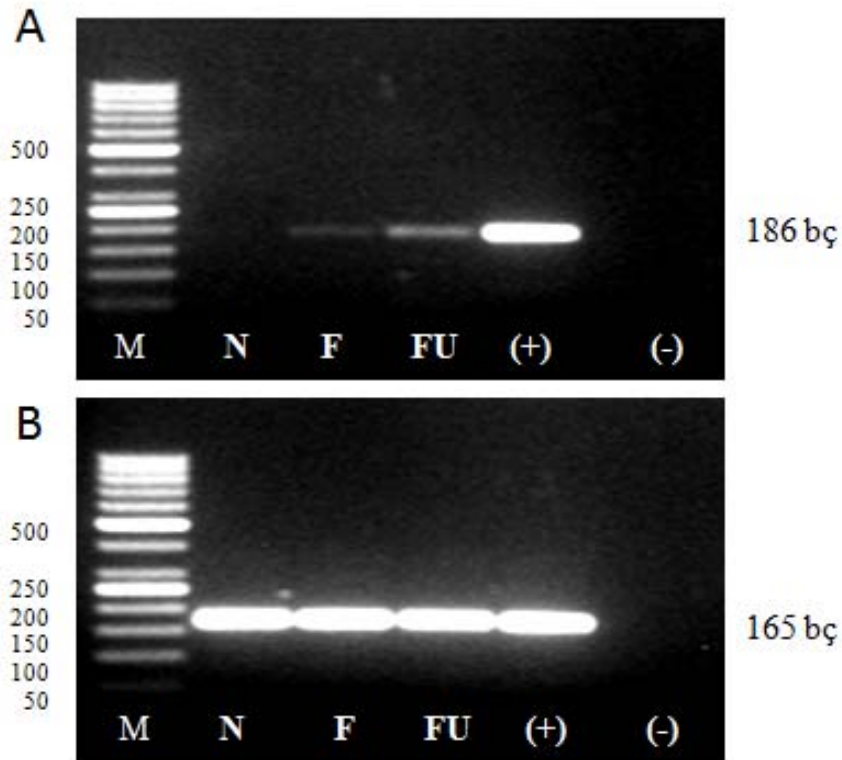
	<b>Farklılaşma Süreci</b>	<b>Göçe-Uyarılma Süreci</b>
<b>DAAM1</b>	<b>2,56 p=0,0019 (**)</b>	<b>1,30 p=0,0083 (**)</b>
<b>ACTR2</b>	<b>2,02 p=0,0475 (*)</b>	<b>1,01 p=1,01</b>
<b>FMNL1</b>	<b>2,01 p=0,0356 (*)</b>	<b>1,98 p=0,0351 (*)</b>
<b>WDR1</b>	<b>1,82 p=0,0397 (*)</b>	<b>1,43 p=0,0207 (*)</b>
<b>PSTPIP2</b>	<b>1,51 p=0,0338 (*)</b>	<b>1,05 p=0,9336</b>
<b>CTNNB1</b>	<b>1,19 p=0,0141 (*)</b>	<b>0,74 p=0,0339 (*)</b>
<b>LPXN</b>	<b>1,32 p=0,0399 (*)</b>	<b>1,51 p=0,0269 (*)</b>
<b>CORO2A</b>	<b>0,76 p=0,0270 (*)</b>	<b>1,46 p=0,0397 (*)</b>
<b>LSP1</b>	<b>0,74 p=0,0016 (**)</b>	<b>1,31 p=0,0036 (**)</b>

**Şekil 4.11.** Aktin ile ilişkili ilgili genlerin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artış/azalışları ve istatistiksel anlamlılık değerleri.

### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

#### 4.3.1. MEFV geni ifade analizi

MEFV geni ifadesi, ilk aşamada kGZ-PZR yöntemiyle analiz edilmeye çalışılmıştır. Ancak, yapılan deneylerin sonucunda, MEFV ifadesinin kGZ-PZR yöntemiyle kantite edilebilir olmadığı görülmüştür. Bunun üzerine, MEFV ifadesi PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. PZR sonrası elde edilen ürünler, % 2,5'lük agaroz jelde yürütülerek UV altında görüntülenmiştir ve ürünlerin bant yoğunlukları görsel olarak karşılaştırılmıştır. Buna göre; MEFV geninin farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ifade olduğu, farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise ifadenin arttığı görülmüştür (Şekil 4.12.).



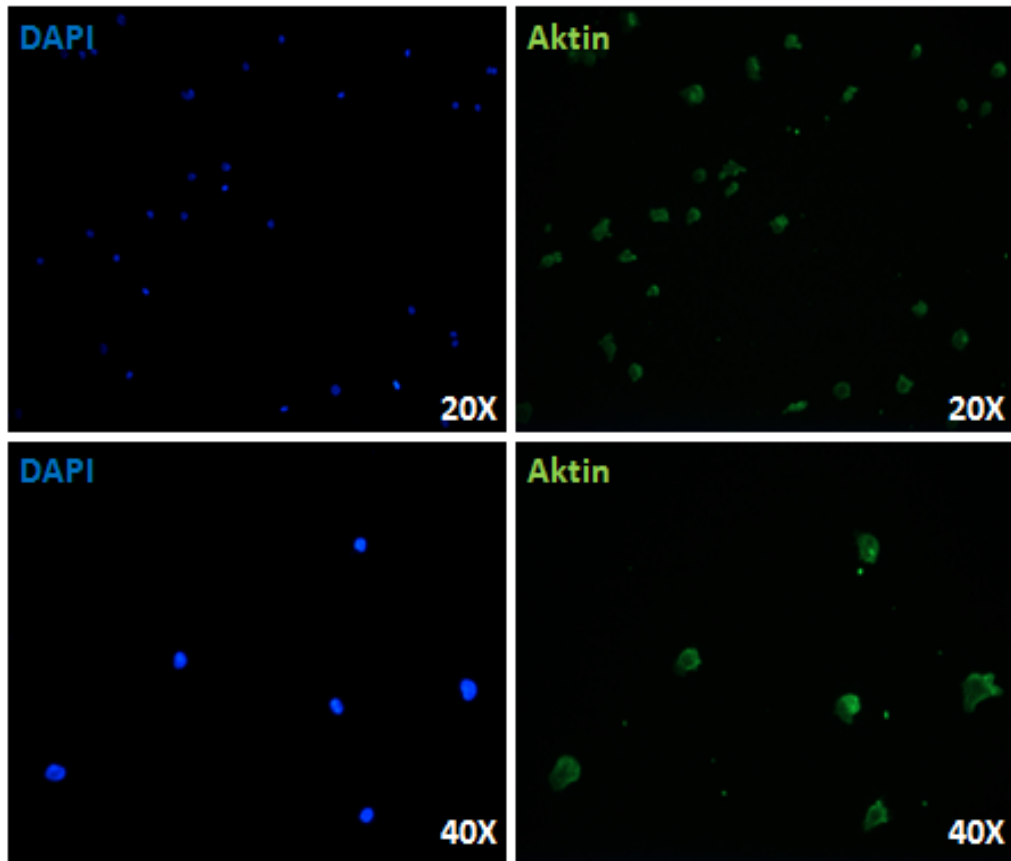
**Şekil 4.12.** Normal, farklılaşmış, farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücreleri ve THP-1 hücrelerinde MEFV (A) ve ACTB (B) genlerinin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, (+): Pozitif Kontrol, (-): Negatif Kontrol).

HL-60 hücrelerinde görülen MEFV ifadeleri, ACTB genine göre karşılaştırıldığında, MEFV'in bu hücrelerde oldukça az seviyede ifade olduğu görülmüştür. Ayrıca, pozitif kontrol grubu olan THP-1 hücrelerindeki MEFV ifadesinin de, HL-60 hücrelerindeki göre daha fazla olduğu ve ACTB ifadesine benzer bir patern gösterdiği tespit edilmiştir. Her iki gen için negatif kontrol örneklerinde amplifikasyon gözlenmemiştir (Şekil 4.12.).

#### 4.4. İmmüno Floresan (IF) Boyama

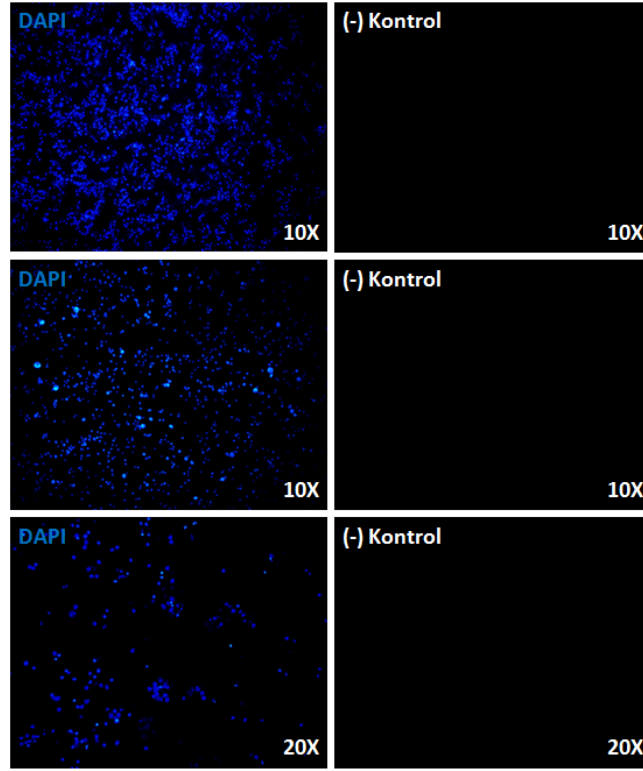
##### 4.4.1. Optimizasyon boyamaları

İlk aşamada, fMLP ile göçe uyarılmış farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerine aktin boyaması yapılarak hücrelerin göç yönündeki öncü uçlarında aktin polimerizasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 4.13.).



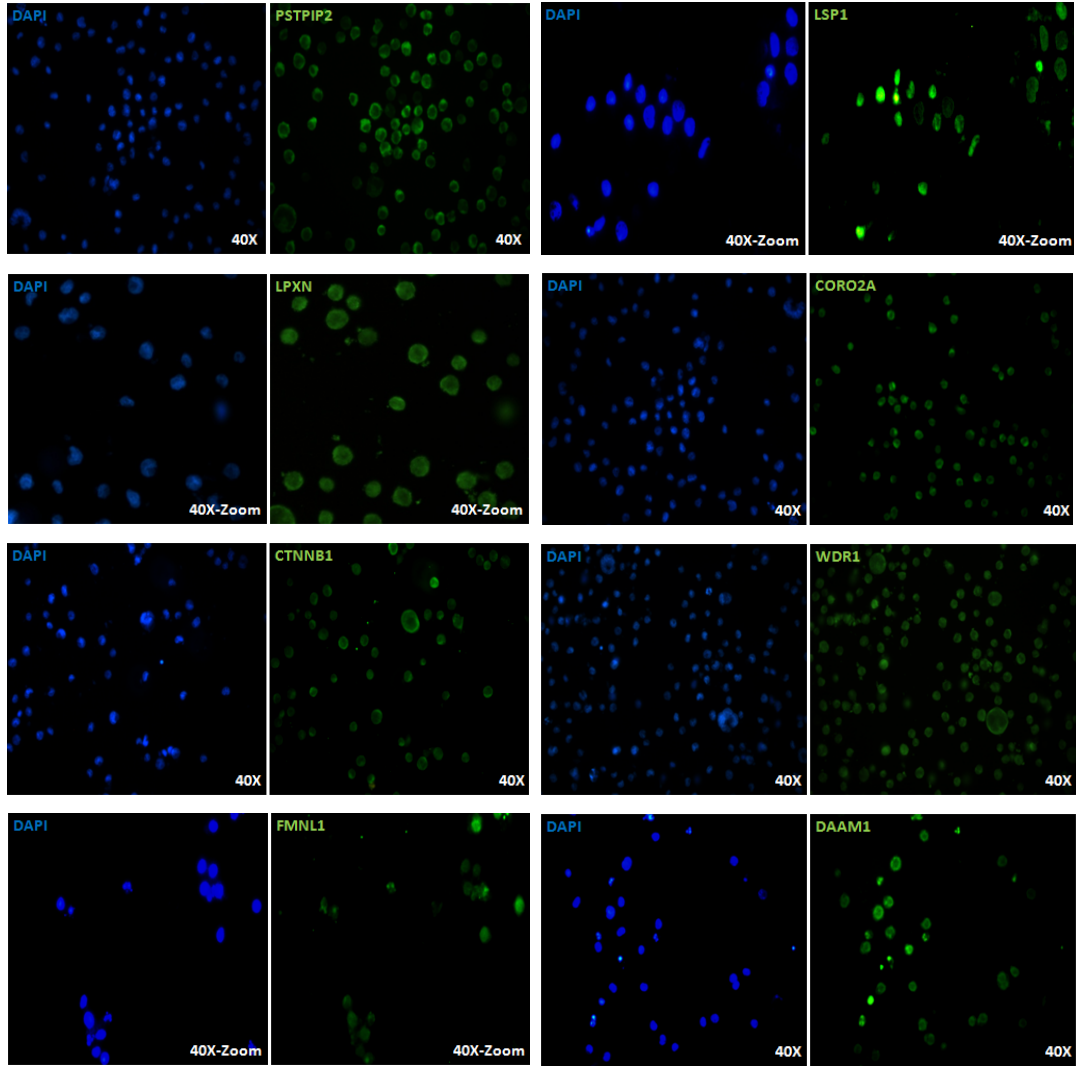
**Şekil 4.13.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde yapılan aktin ve DAPI boyamalarının immüno Floresan mikroskop görüntüleri.

İkinci aşamada, ilgili proteinleri tanıyan primer antikorların özgüllüğünü kontrol etmek amacıyla yapılan negatif kontrol uygulamalarında herhangi bir sinyal alınmadığı görülmüştür. (Şekil 4.14.).



**Şekil 4.14.** IF boyamaların negatif kontrollerinin görüntüsü. Sırasıyla Anti-Tavşan (AF-488), Anti-Keçi (AF-488) ve Anti-Fare (AF-568) sekonder antikor uygulamaları ile elde edilen negatif kontrollerle birlikte DAPI ile mavi renkte boyanan hücre çekirdeklerinin görüntüleri.

Üçüncü aşamada ise; PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1, DAAM1 ve ACTR2 proteinlerini tanıyan primer antikorların uygun dilüsyon oranlarını belirlemek ve antikorların çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde optimizasyon boyamaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.15.).

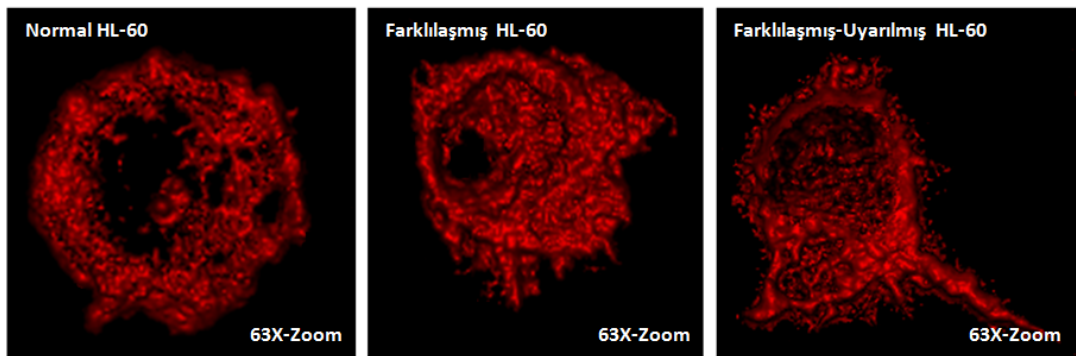


**Şekil 4.15.** PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1 ve DAAM1 proteinlerinin optimizasyon boyamalarının immünfloresan mikroskop görüntüleri.

Bu boyama sonuçlarına göre; PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1 ve DAAM1 antikorları optimize edilmiş ve dilüsyon oranları belirlenmiştir (Bkz. 3.2.7.) Ancak, ACTR2 antikoru optimize edilememiştir.

#### 4.4.2. Pyrin ve aktin ile ilişkili proteinlerin eş boyamaları

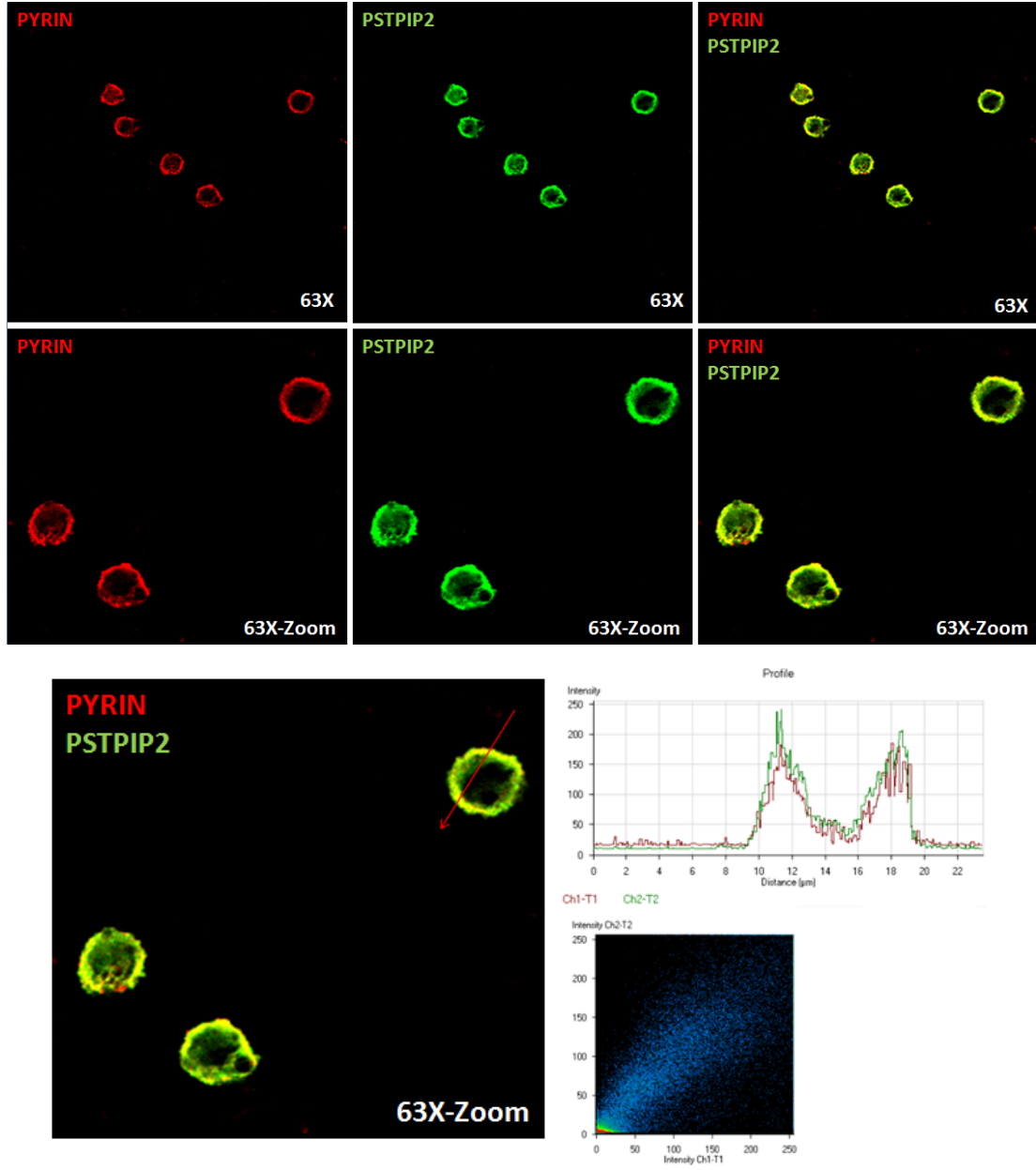
Eş boyamalardan önce; Pyrinin normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerindeki yerleşimi, konfokal mikroskobunun *LSM Image Browser 3D Projections* (Carl-Zeiss) yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre, Pyrinin normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada, farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize uçlara ve hücre uzantılarına doğru yerleşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.16.).



**Şekil 4.16.** Pyrinin normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerindeki yerleşiminin konfokal mikroskobu görüntüleri.

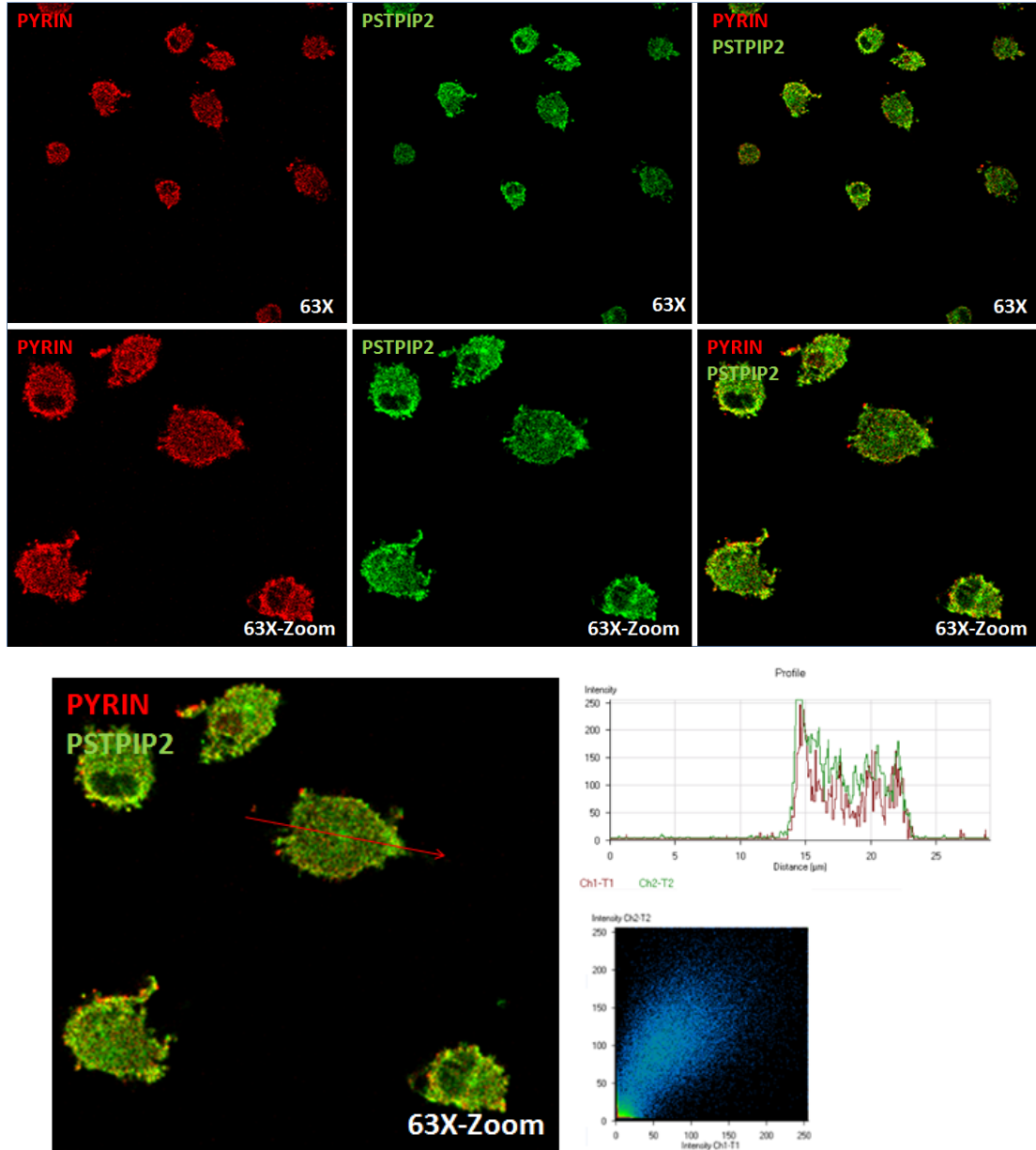
Bir sonraki aşamada; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1 ve DAAM1 proteinlerinin Pyrin ile birlikte eş boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Pyrin-PSTPIP2 eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılarına doğru (Şekil 4.19.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve PSTPIP2 proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.

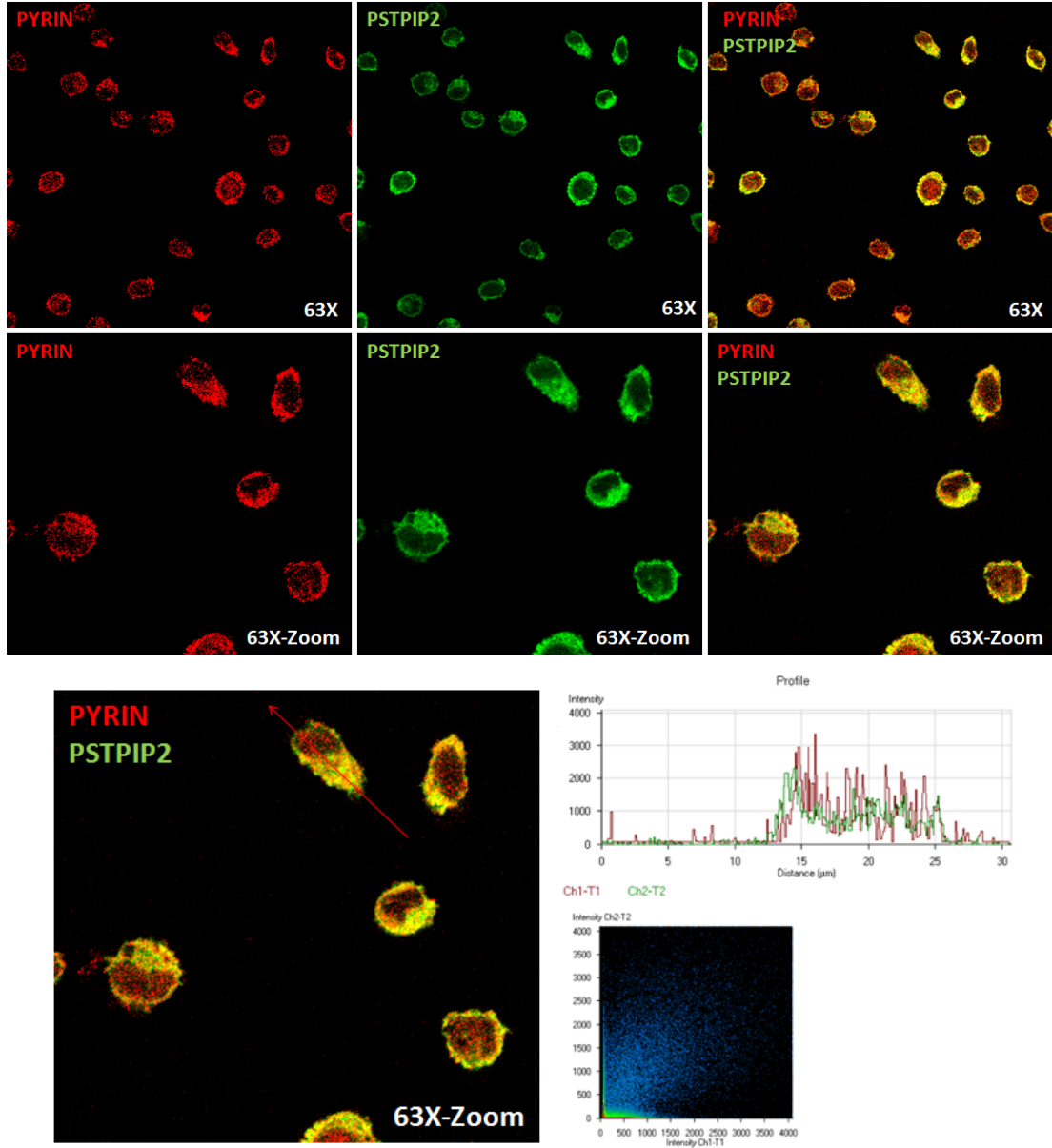


**Şekil 4.17.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



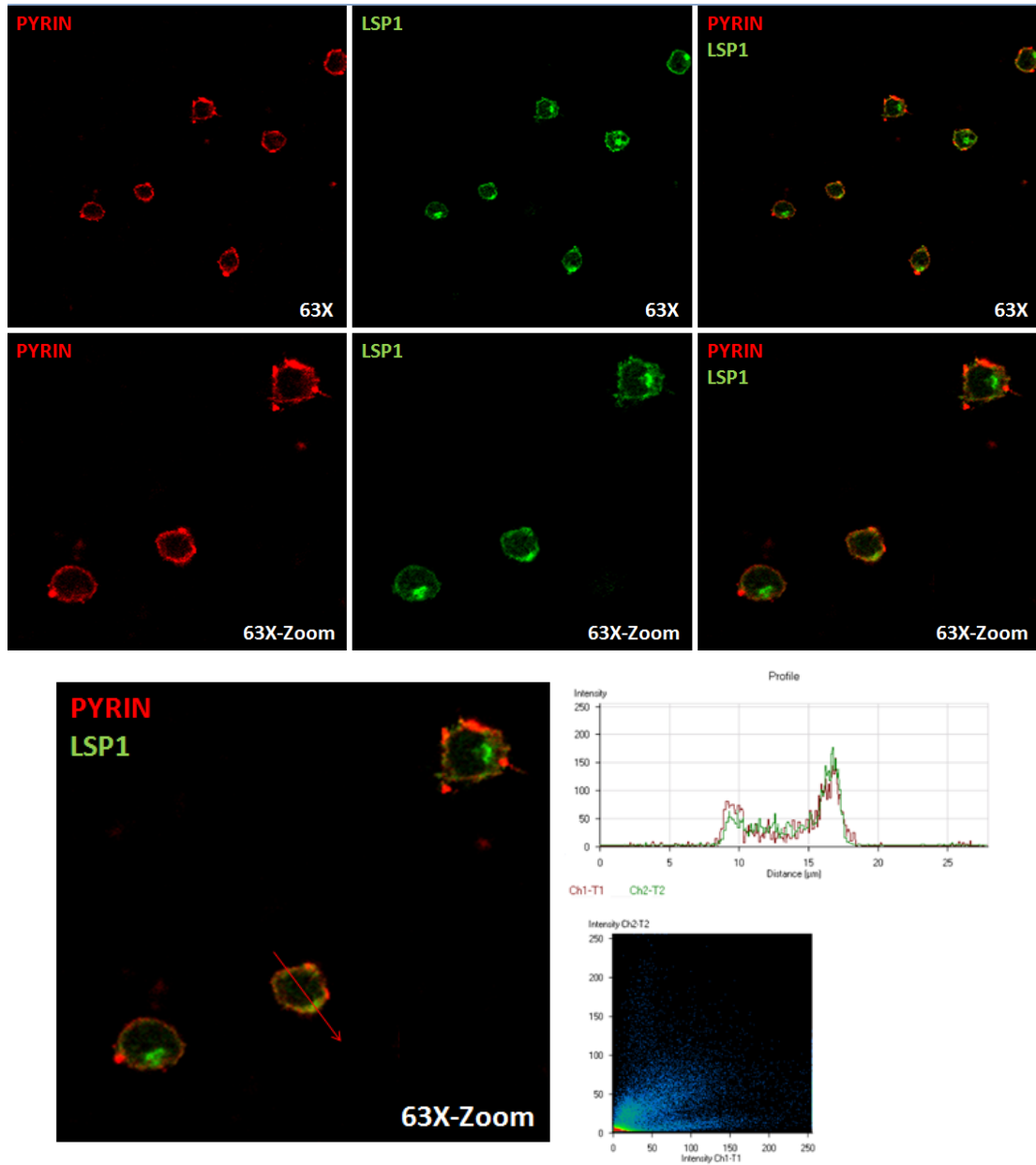


**Şekil 4.18.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

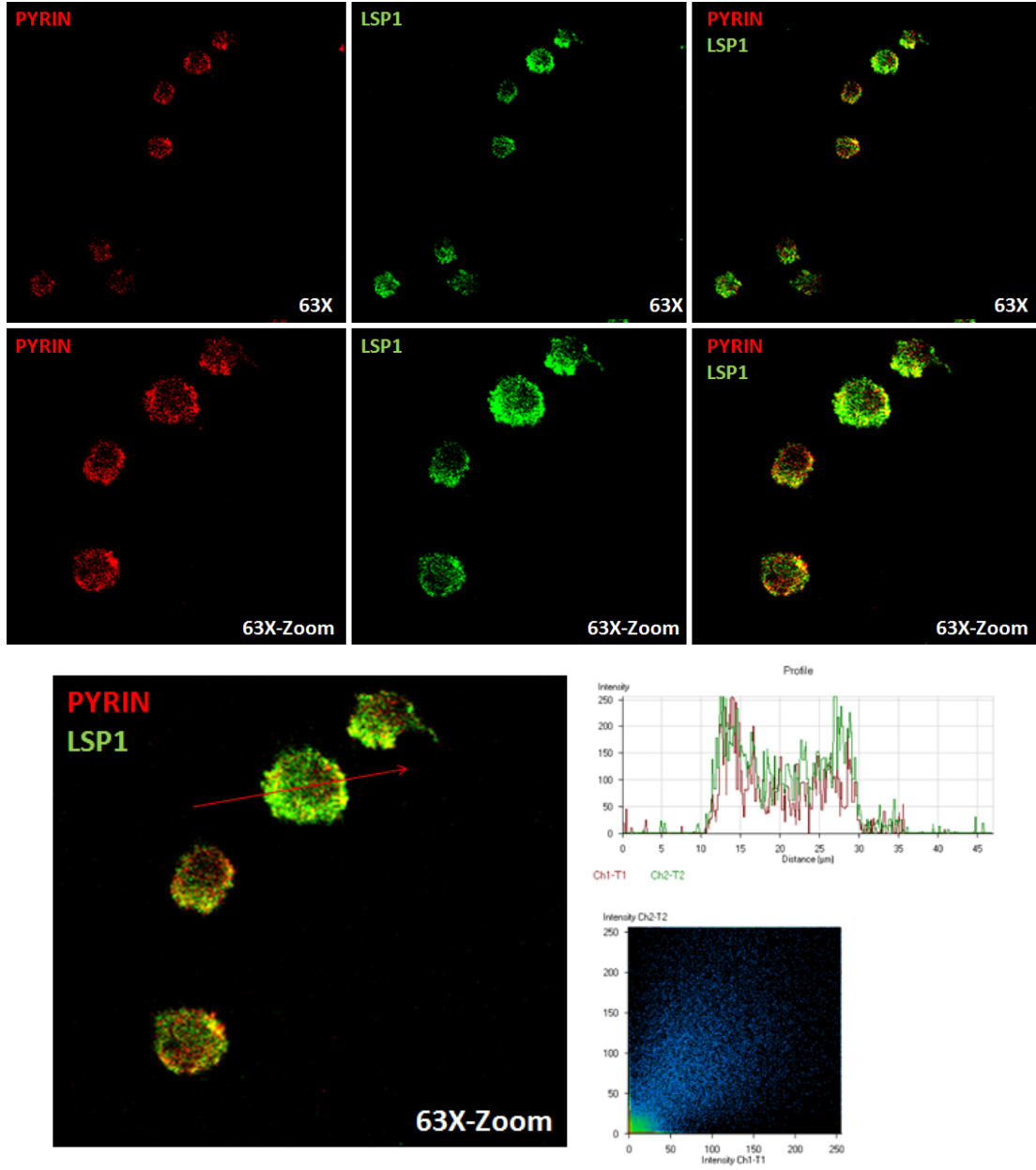


**Şekil 4.19.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

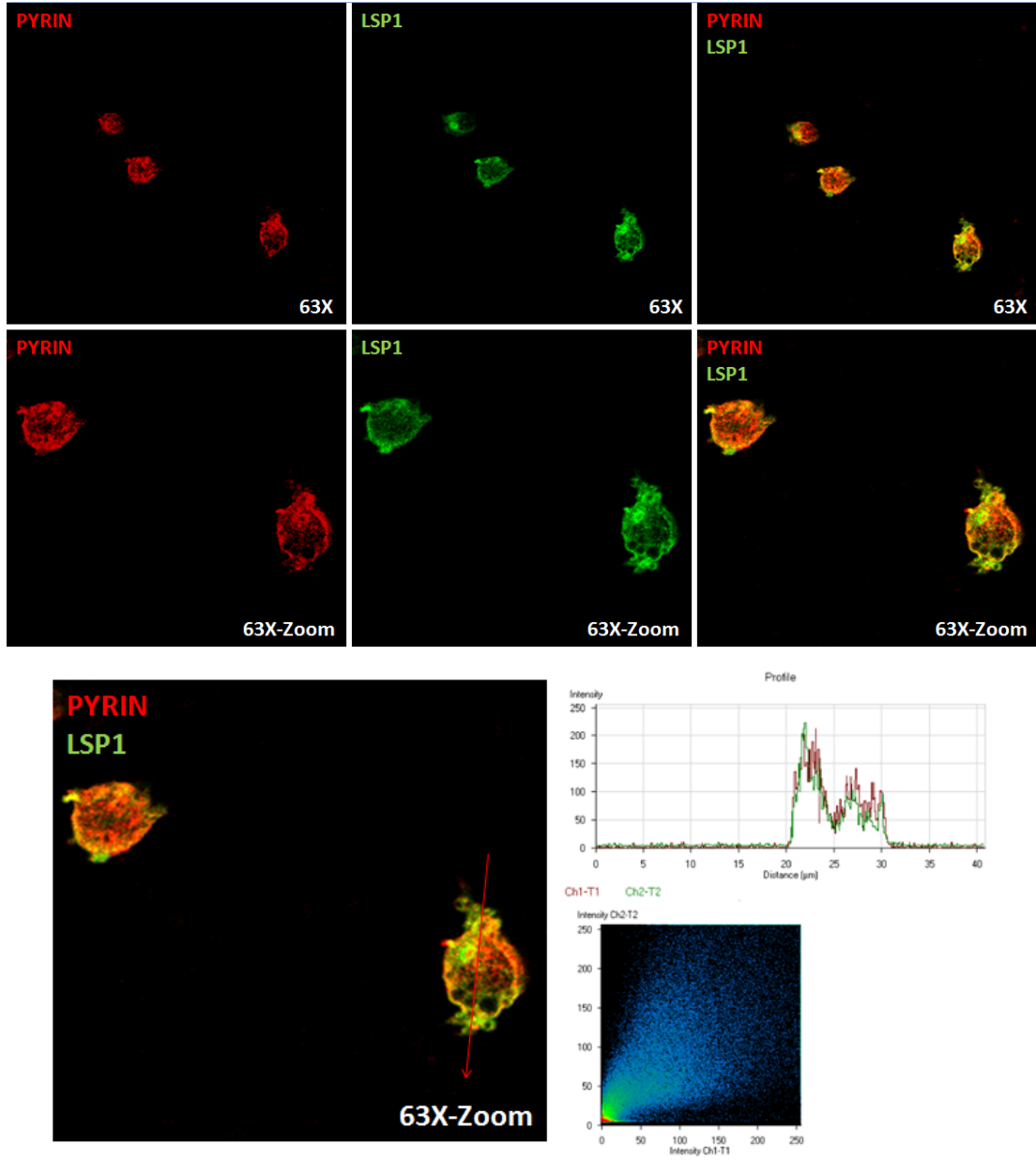
Pyrin-LSP1 eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılarında doğru (Şekil 4.22.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve LSP1 proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.



**Şekil 4.20.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-LSP1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

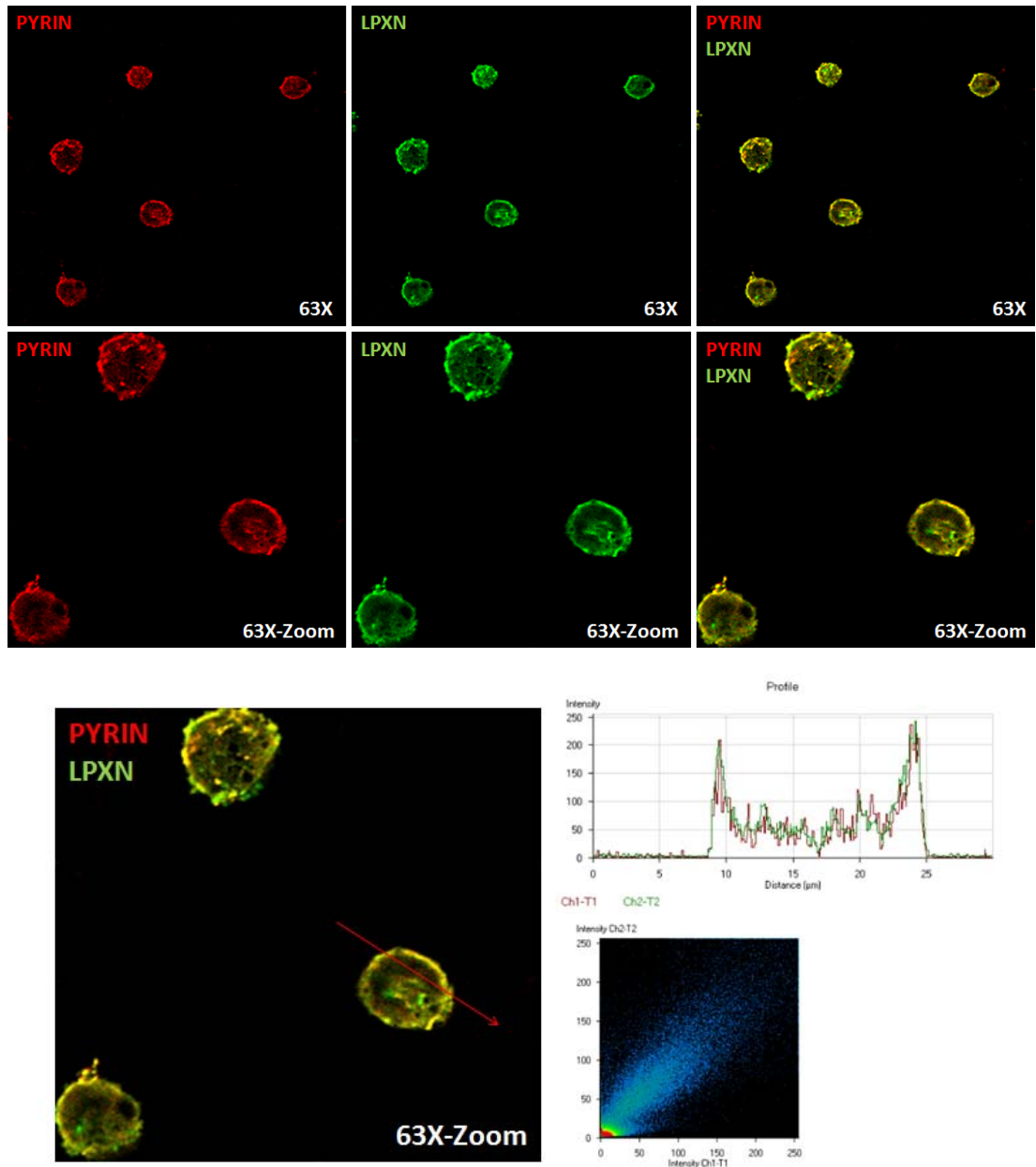


Şekil 4.21. Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LSP1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

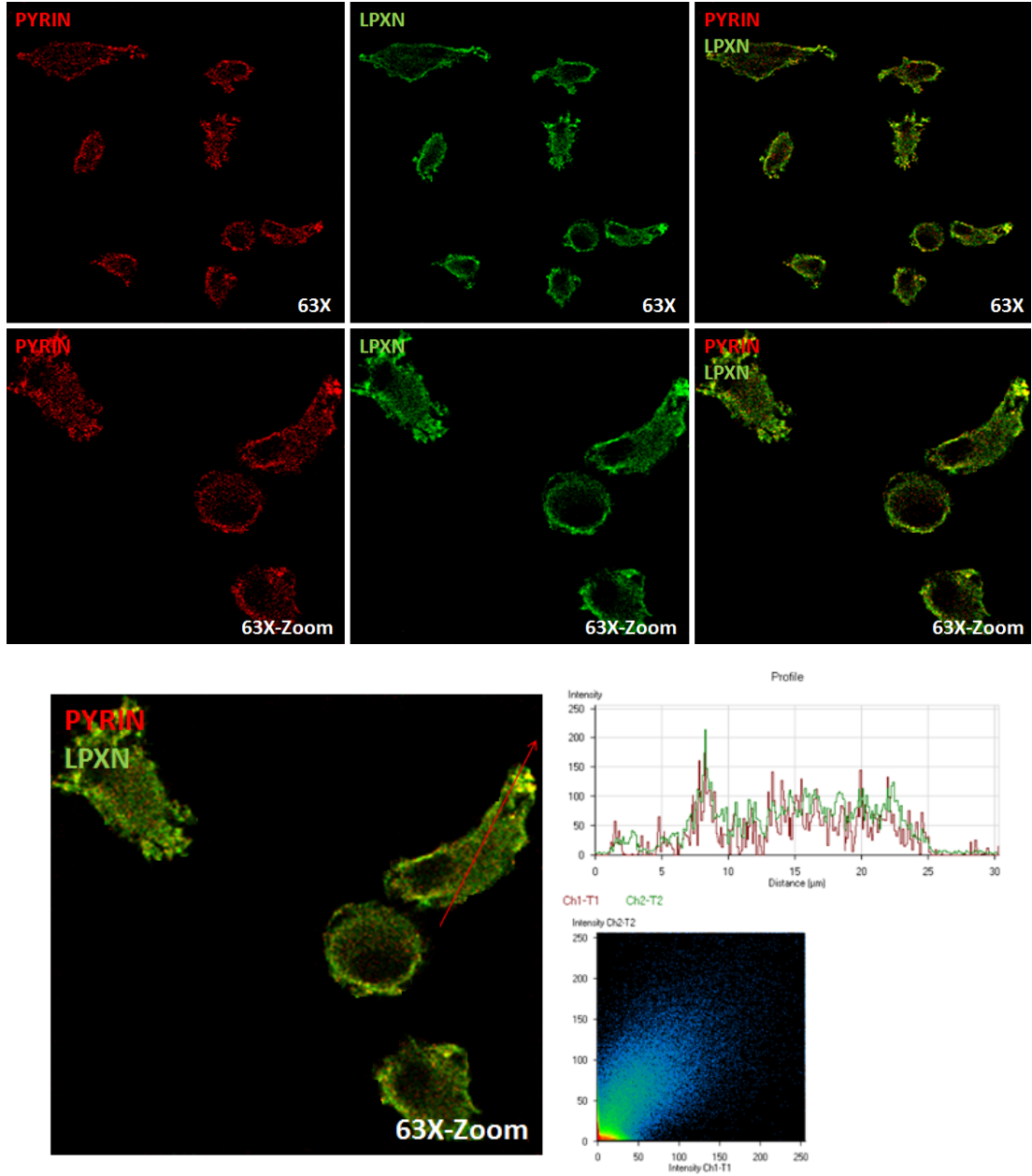


**Şekil 4.22.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LSP1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

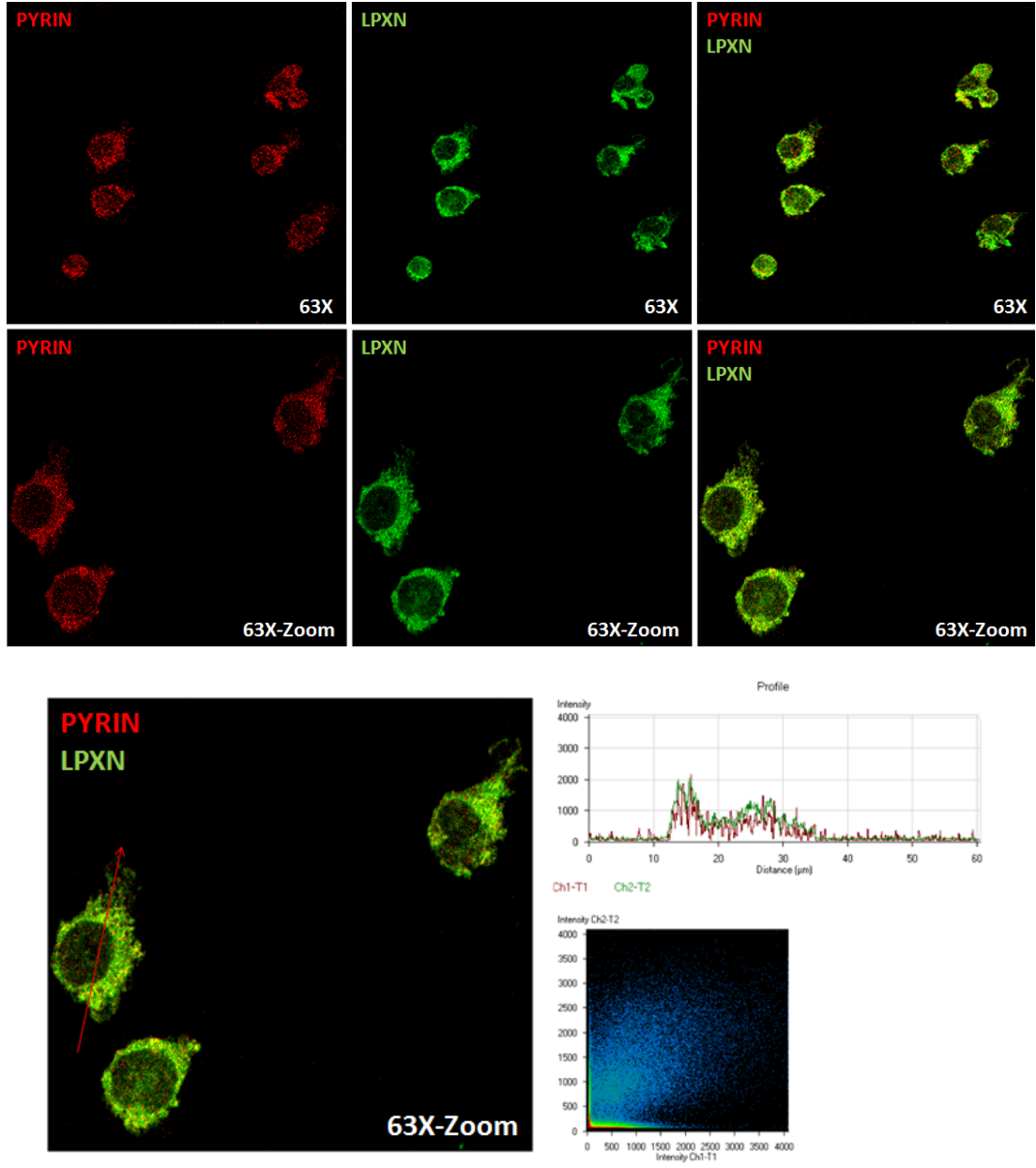
Pyrin-LPXN eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılılarına doğru (Şekil 4.25.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve LPXN proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.



**Şekil 4.23.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



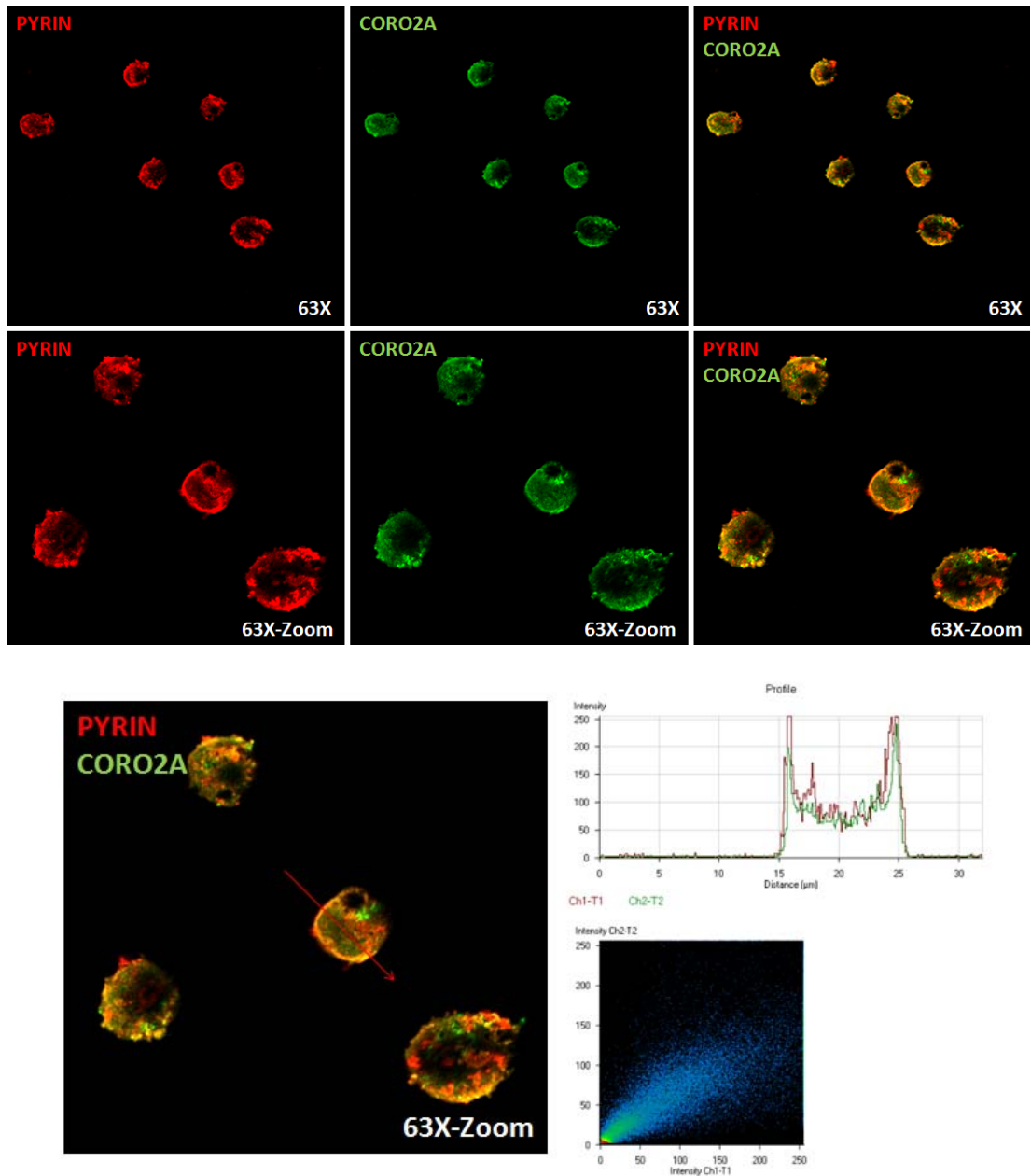
**Şekil 4.24.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



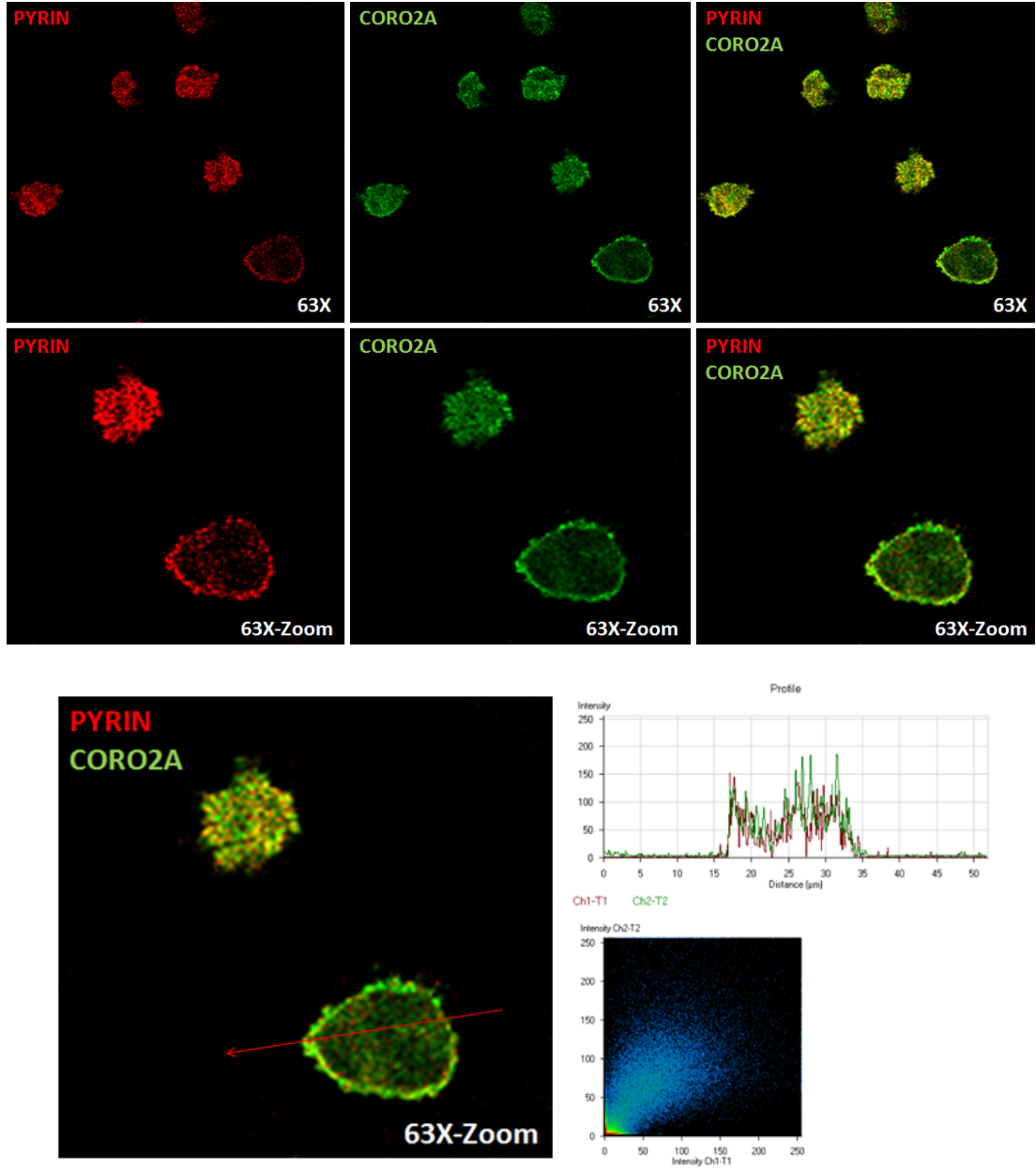
**Şekil 4.25.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



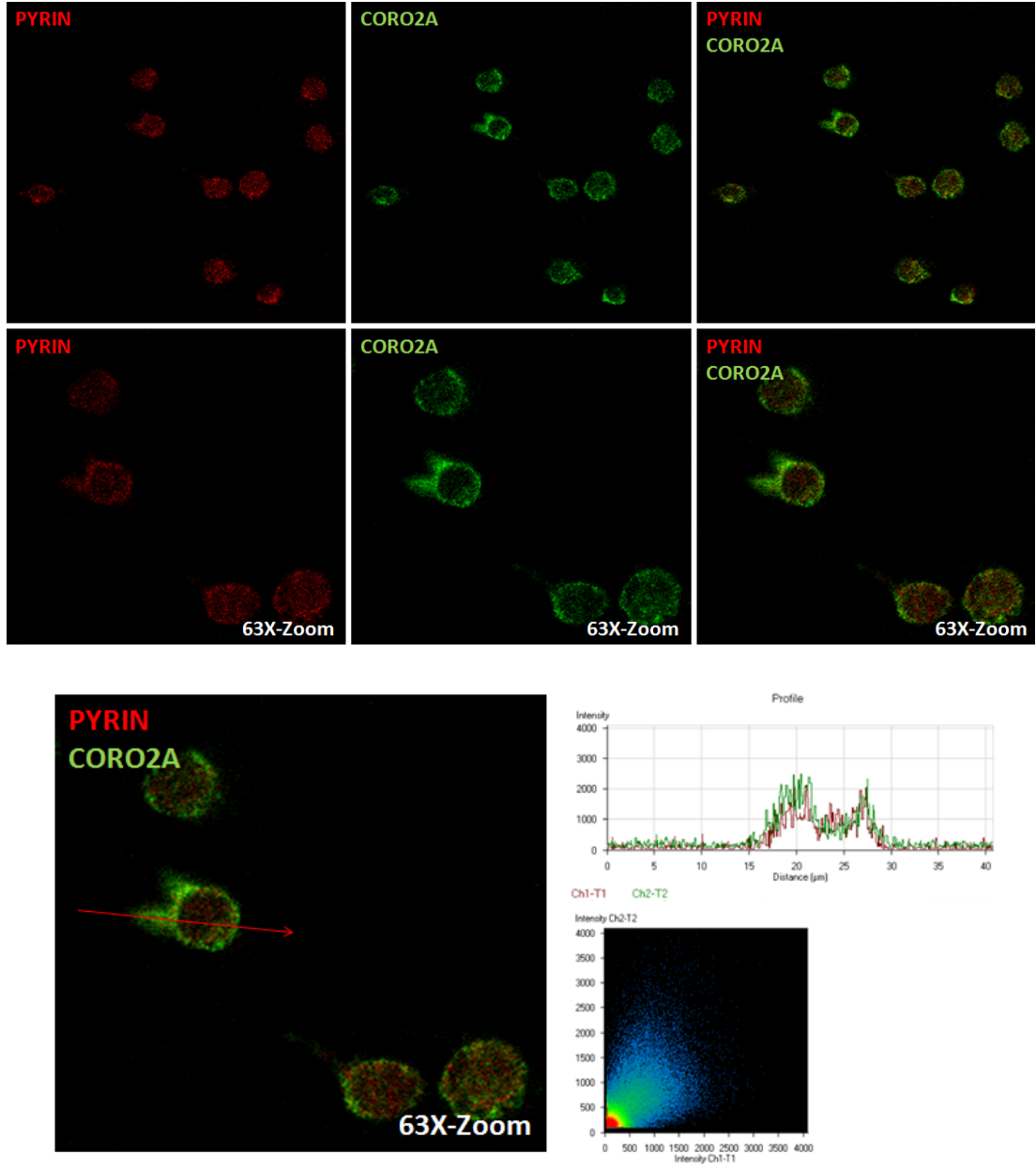
Pyrin-CORO2A eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.26. ve Şekil 4.27.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılılarına doğru (Şekil 4.28.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve CORO2A proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.



**Şekil 4.26.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-CORO2A proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

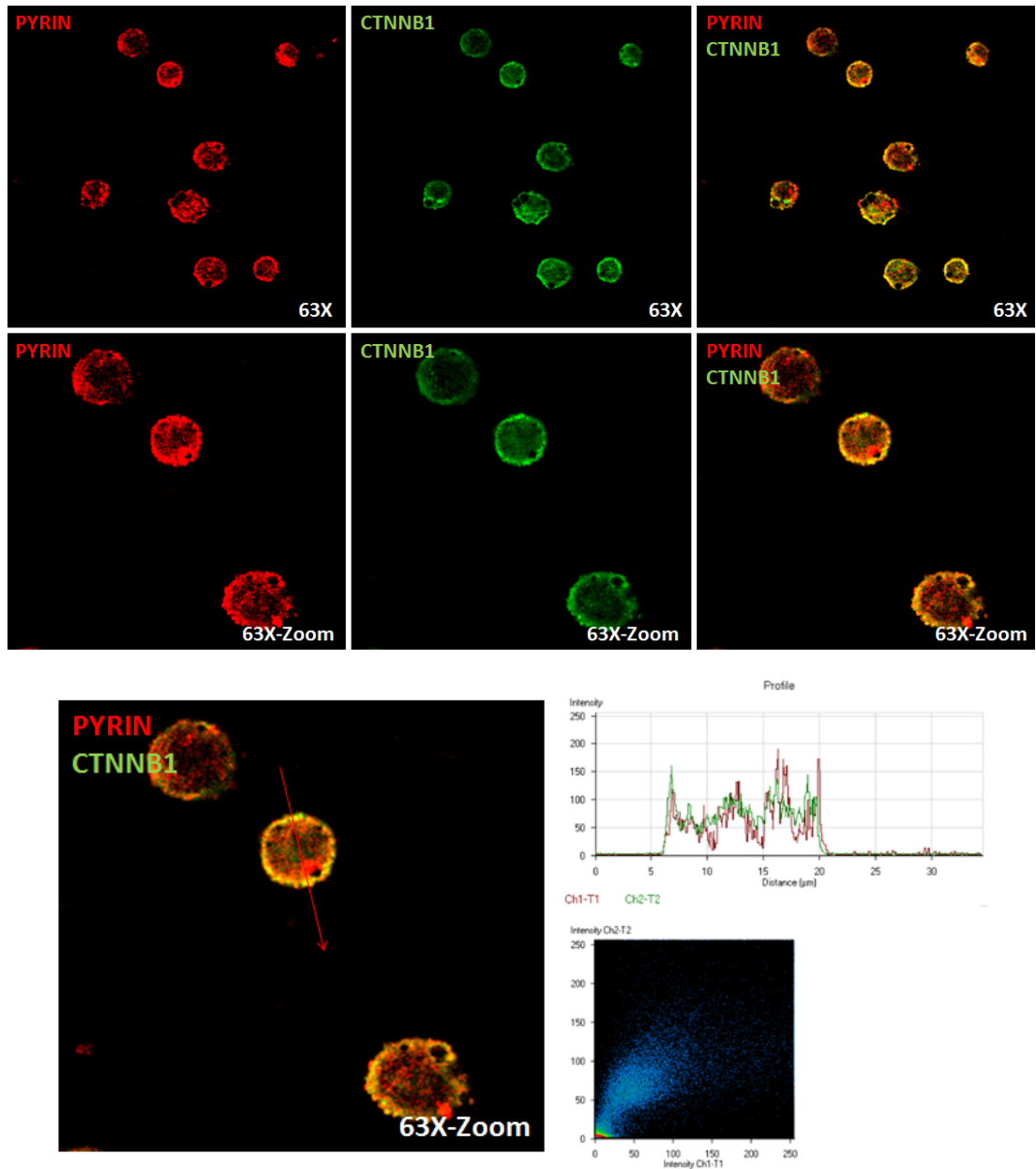


**Şekil 4.27.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CORO2A proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

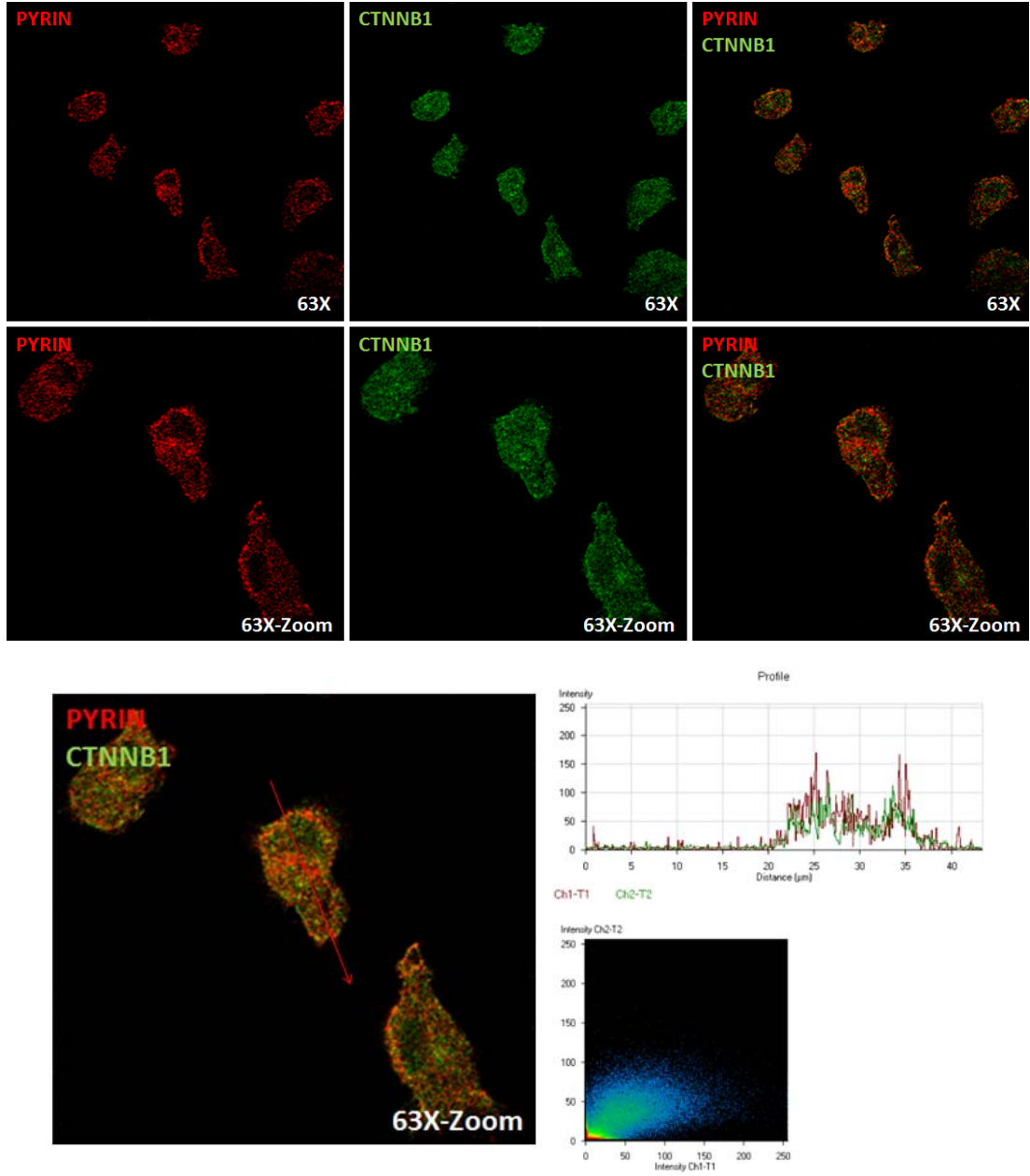


**Şekil 4.28.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CORO2A proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

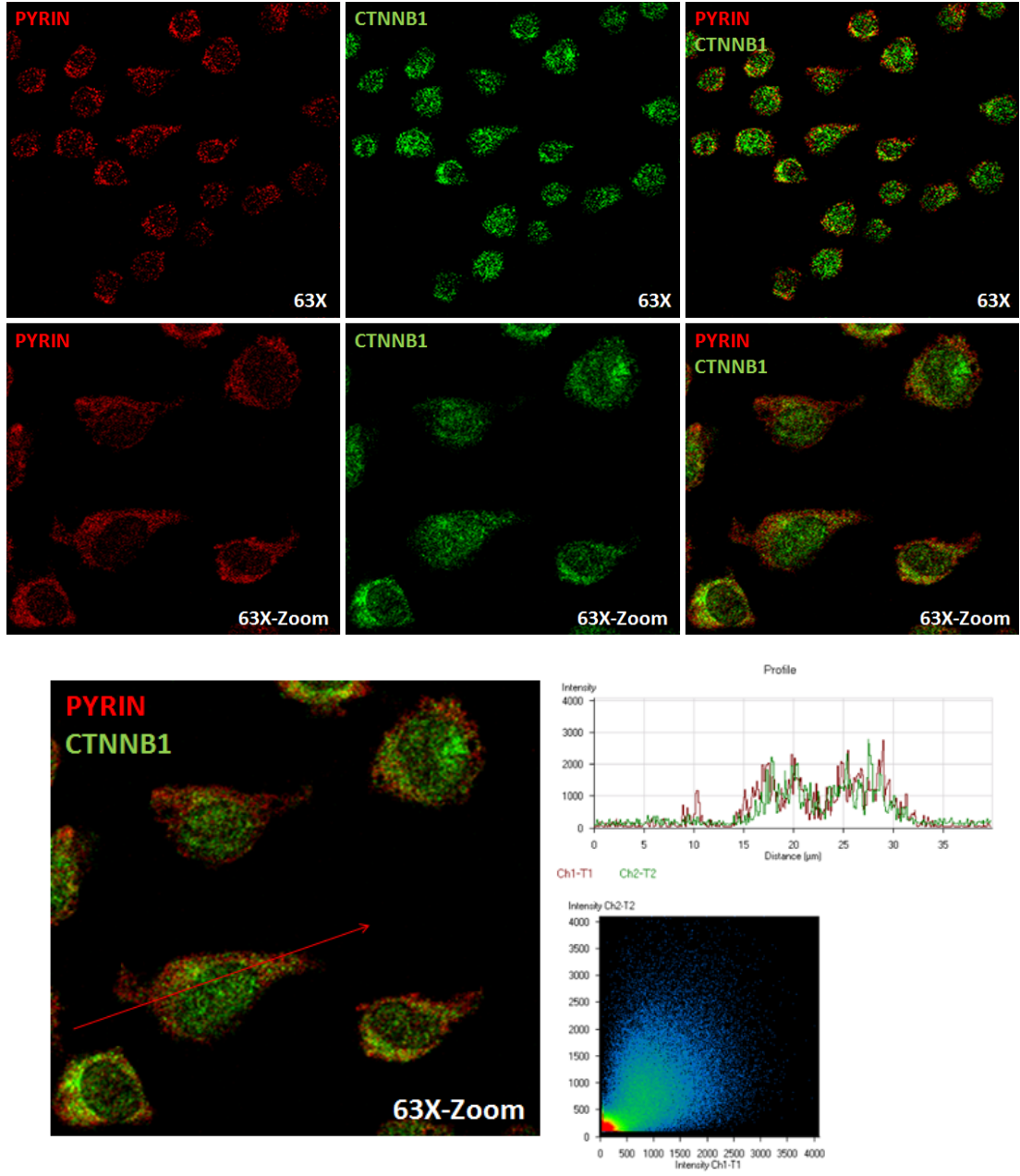
Pyrin-CTNNB1 eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.29. ve Şekil 4.30.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılılarına doğru (Şekil 4.31.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve CORO2A proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.



**Şekil 4.29.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-CTNNB1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

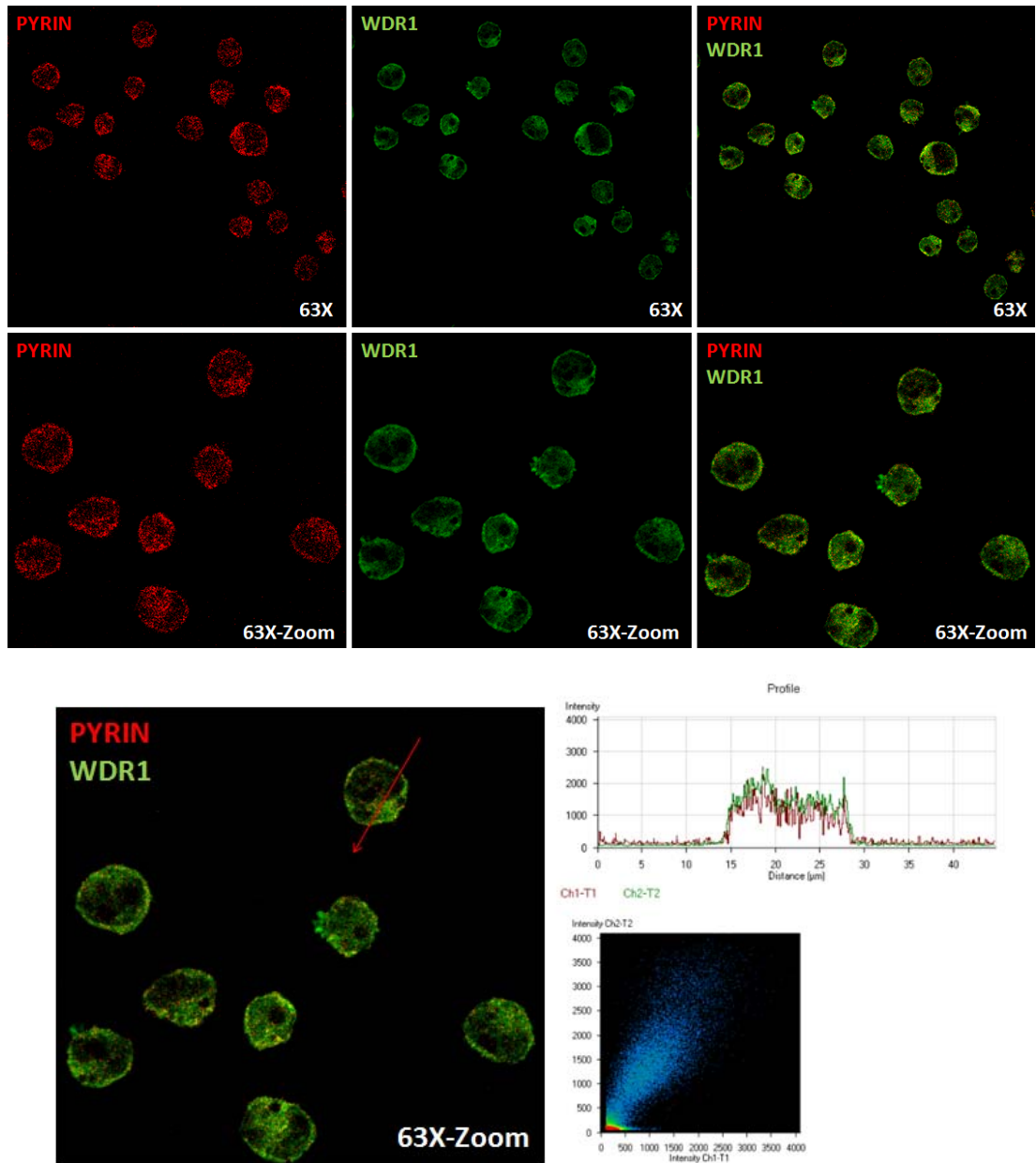


**Şekil 4.30.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CTNNB1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

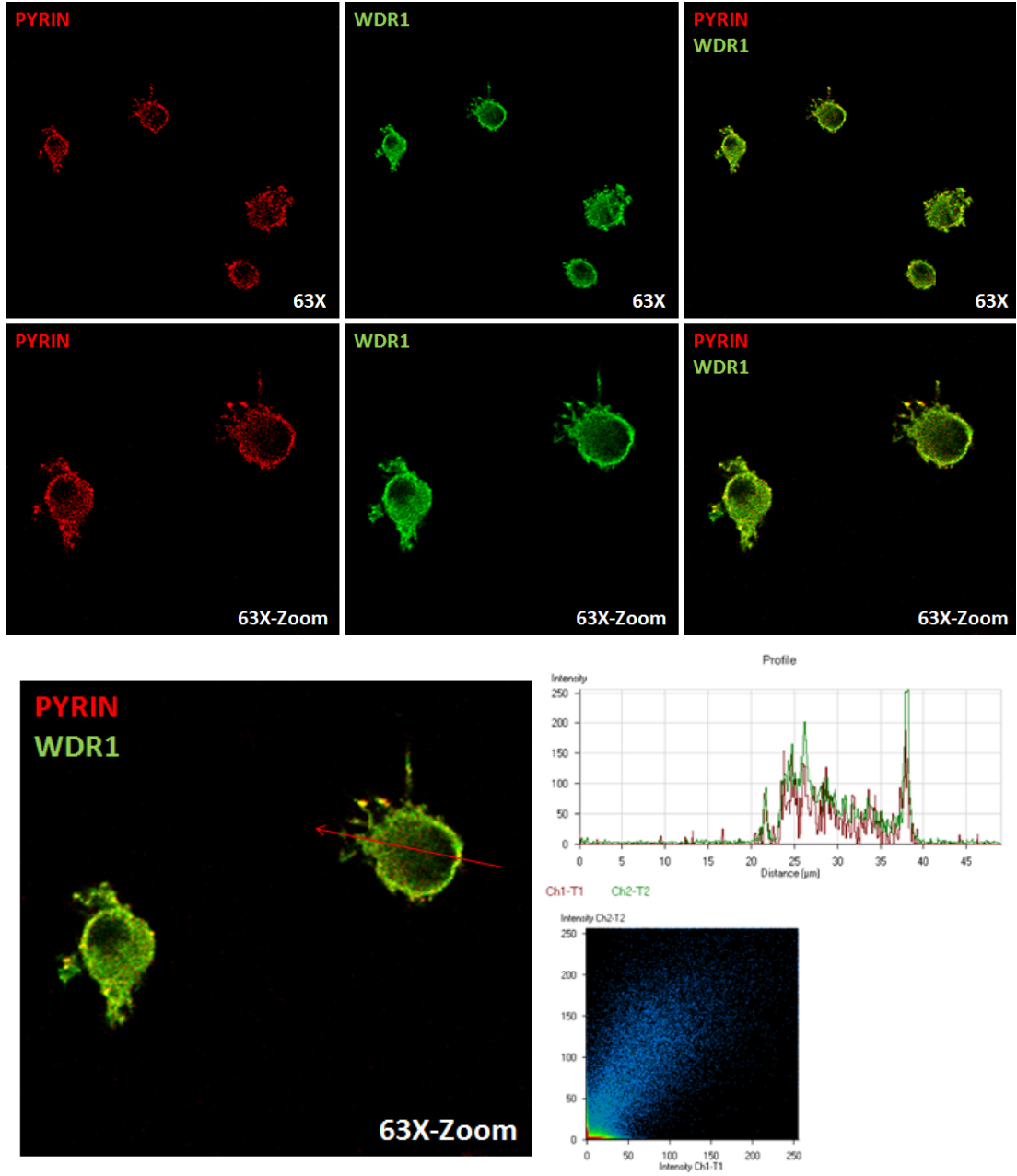


**Şekil 4.31.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-CTNNB1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

Pyrin-WDR1 eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılılarına doğru (Şekil 4.34.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve WDR1 proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.

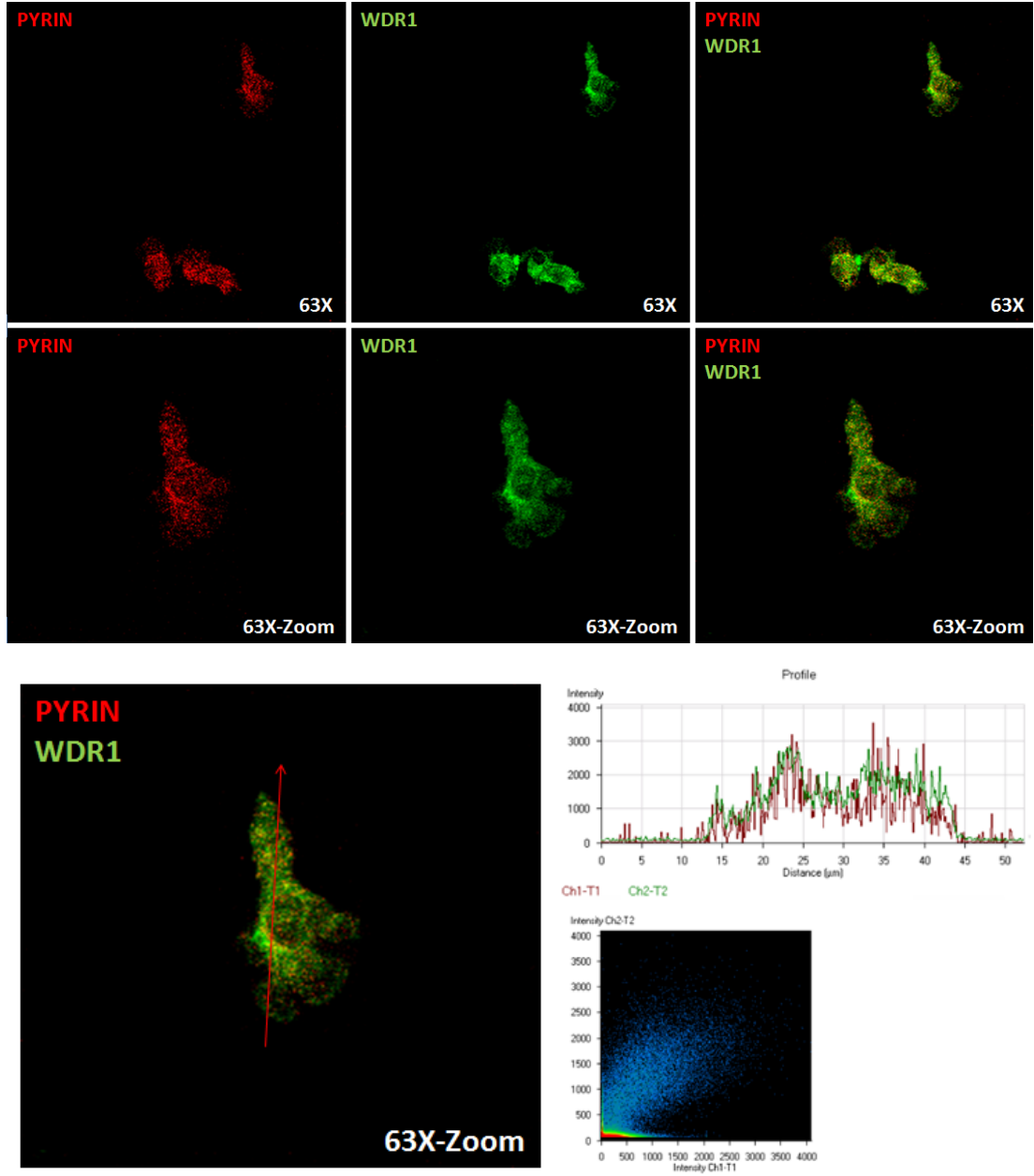


**Şekil 4.32.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-WDR1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



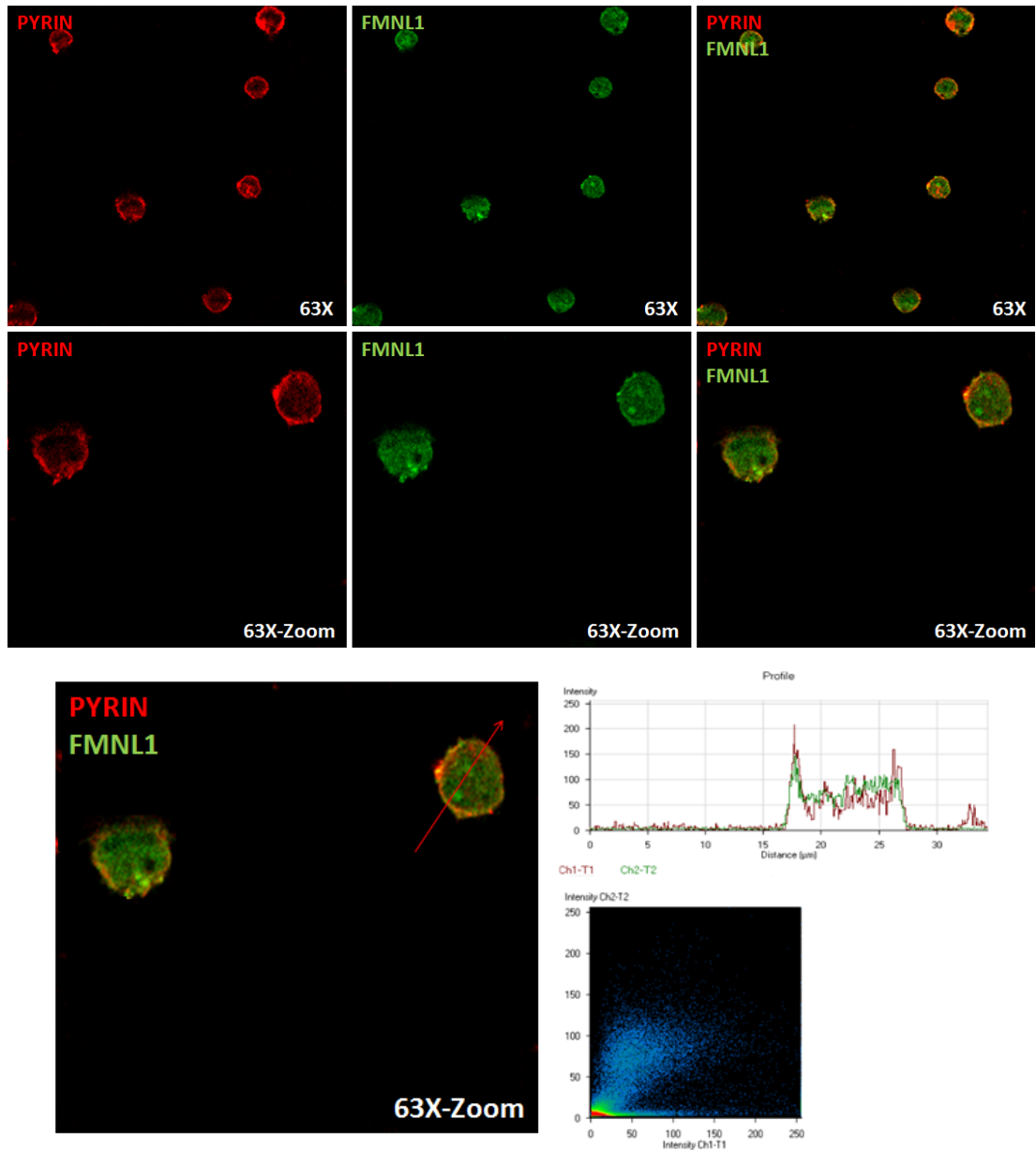
**Şekil 4.33.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-WDR1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



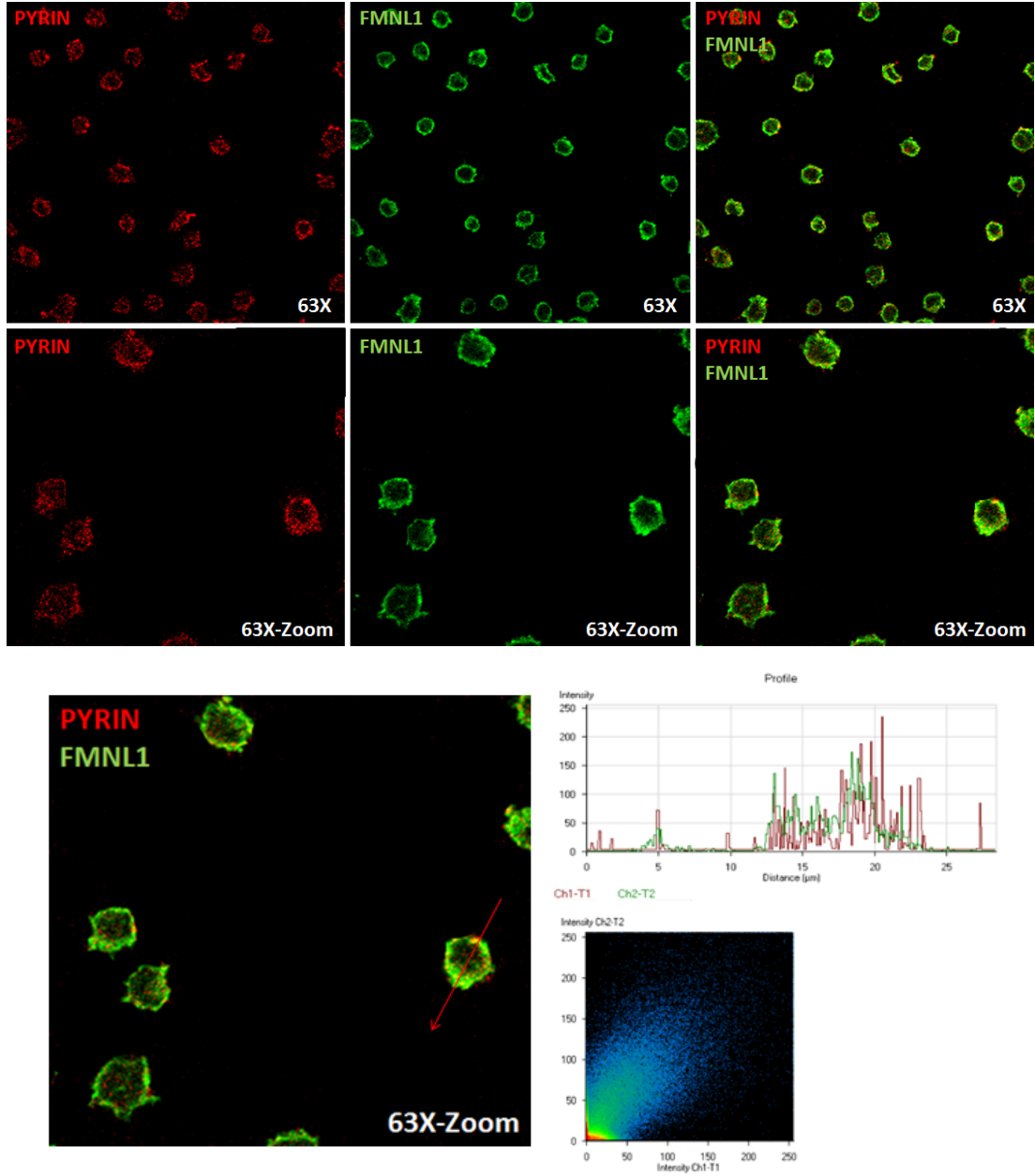


**Şekil 4.34.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-WDR1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

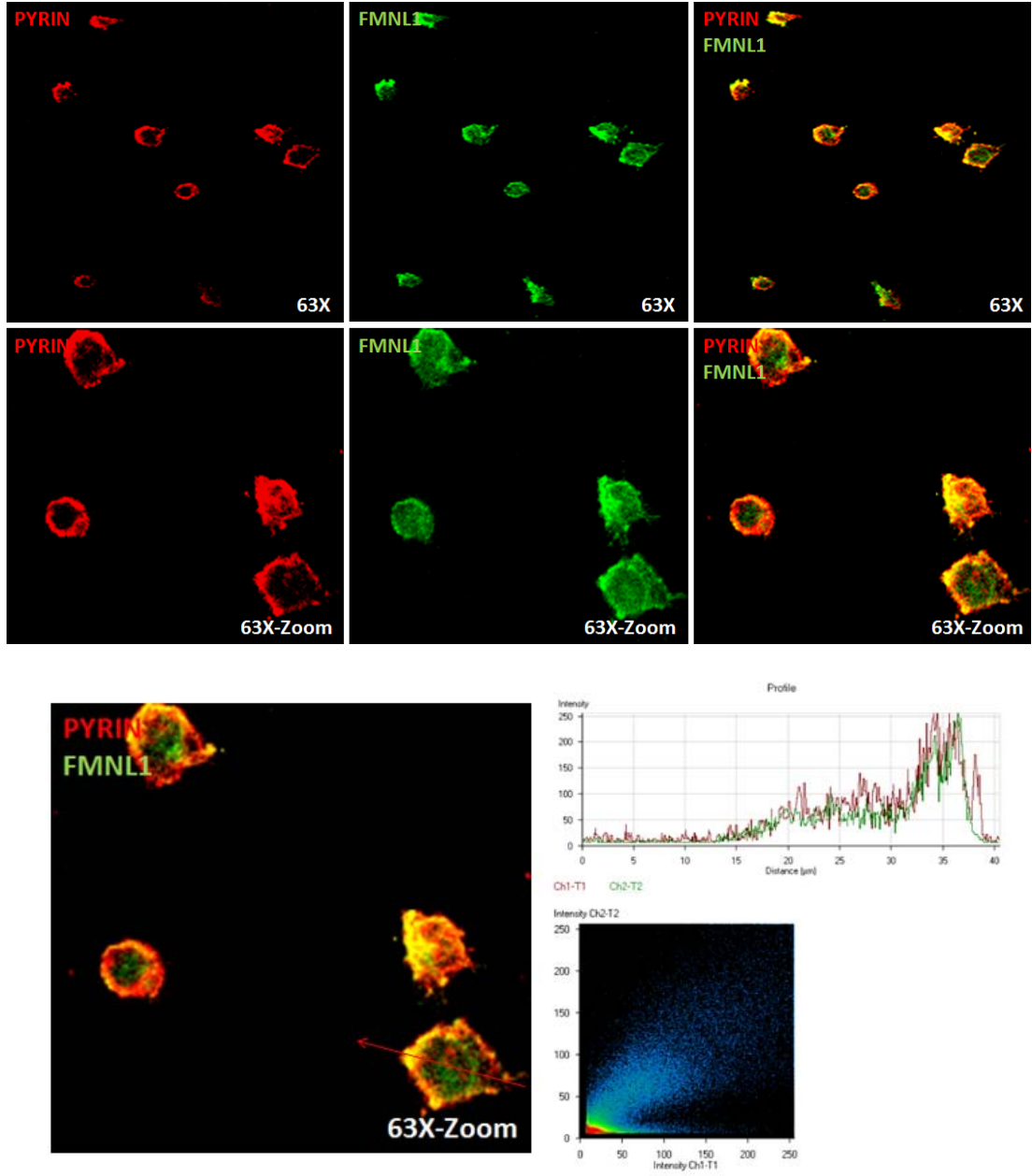
Pyrin-FMNL1 eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.35. ve Şekil 4.36.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılılarına doğru (Şekil 4.37.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve FMNL1 proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.



**Şekil 4.35.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-FMNL1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

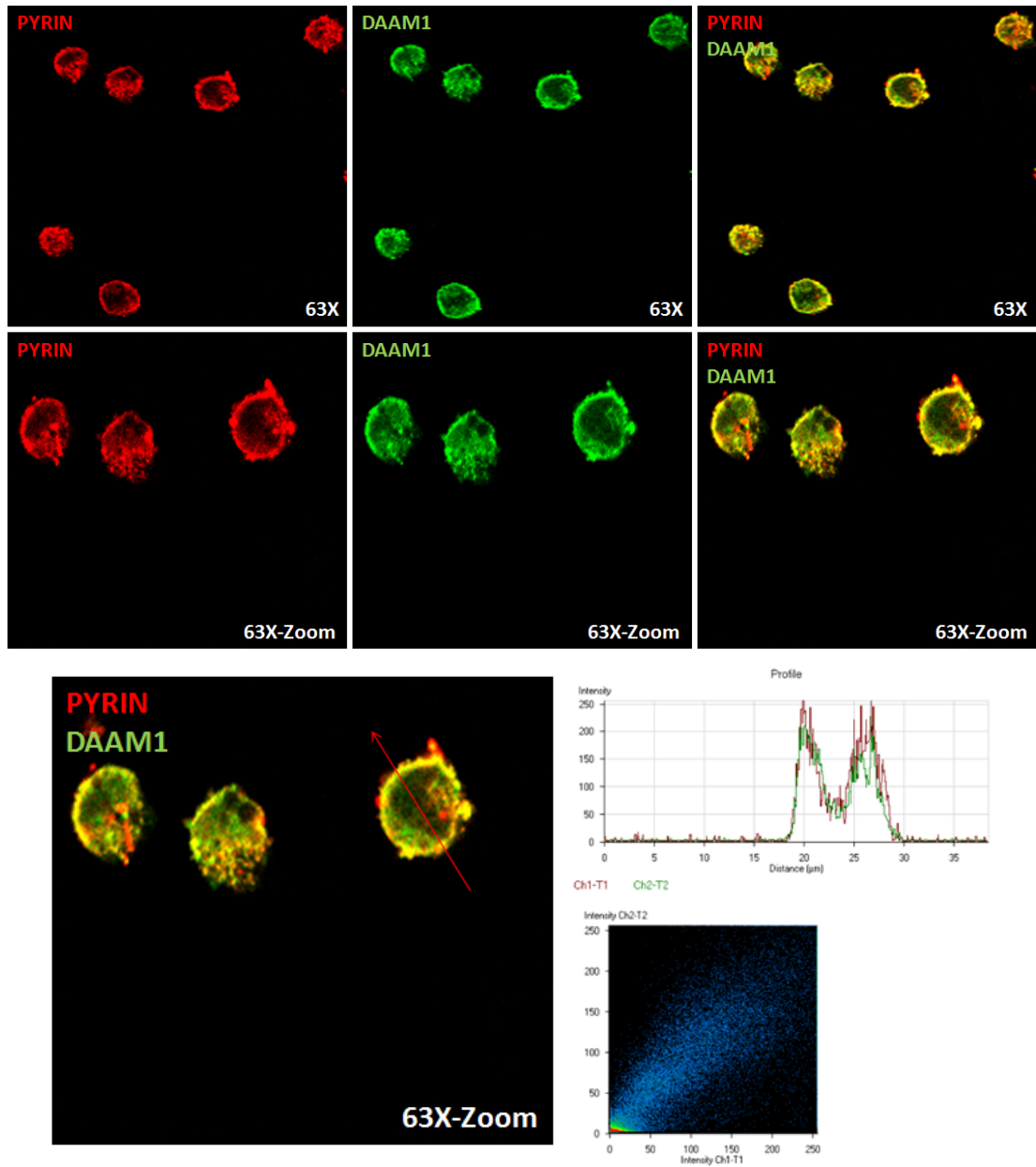


**Şekil 4.36.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-FMNL1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

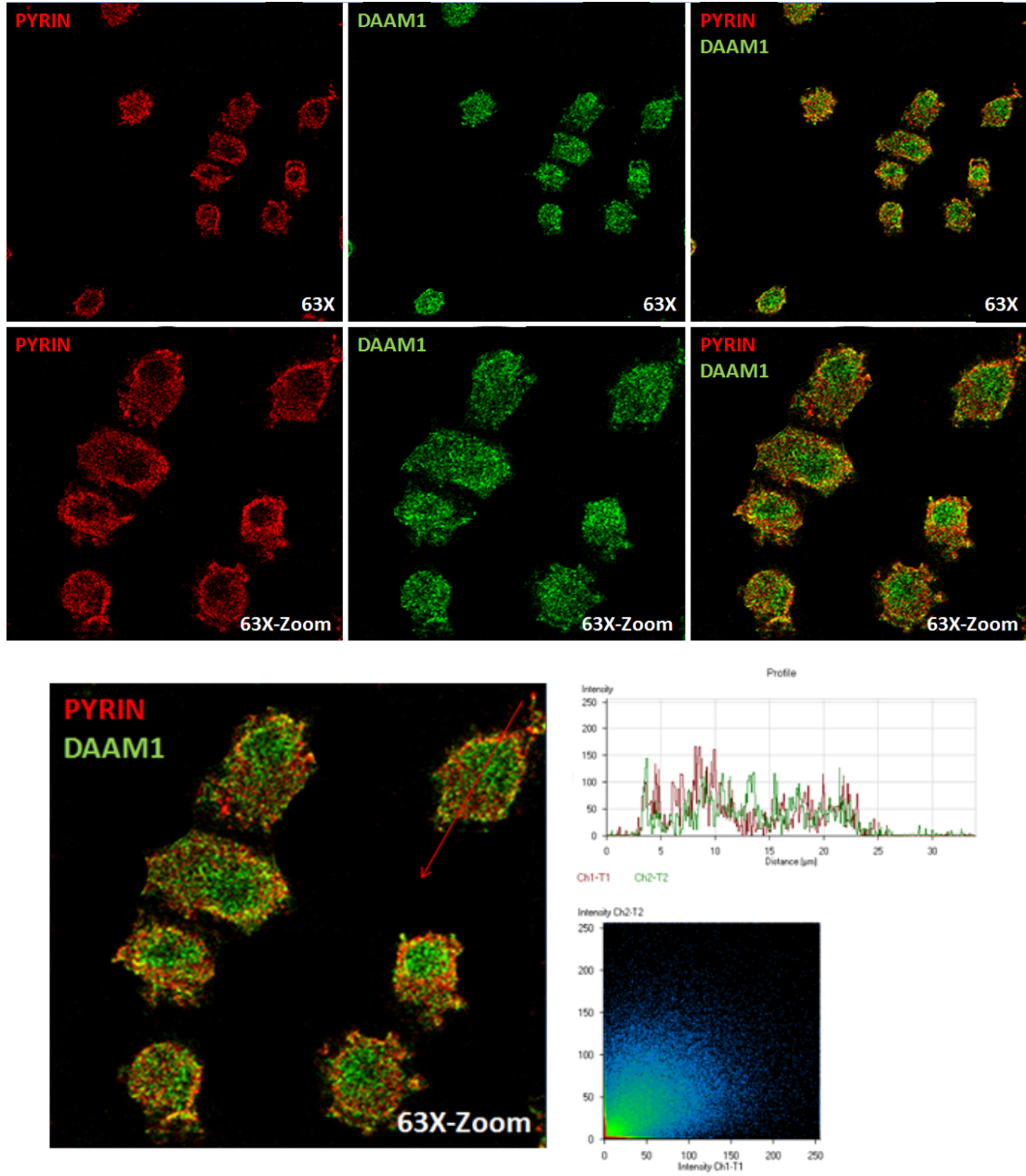


**Şekil 4.37.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-FMNL1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

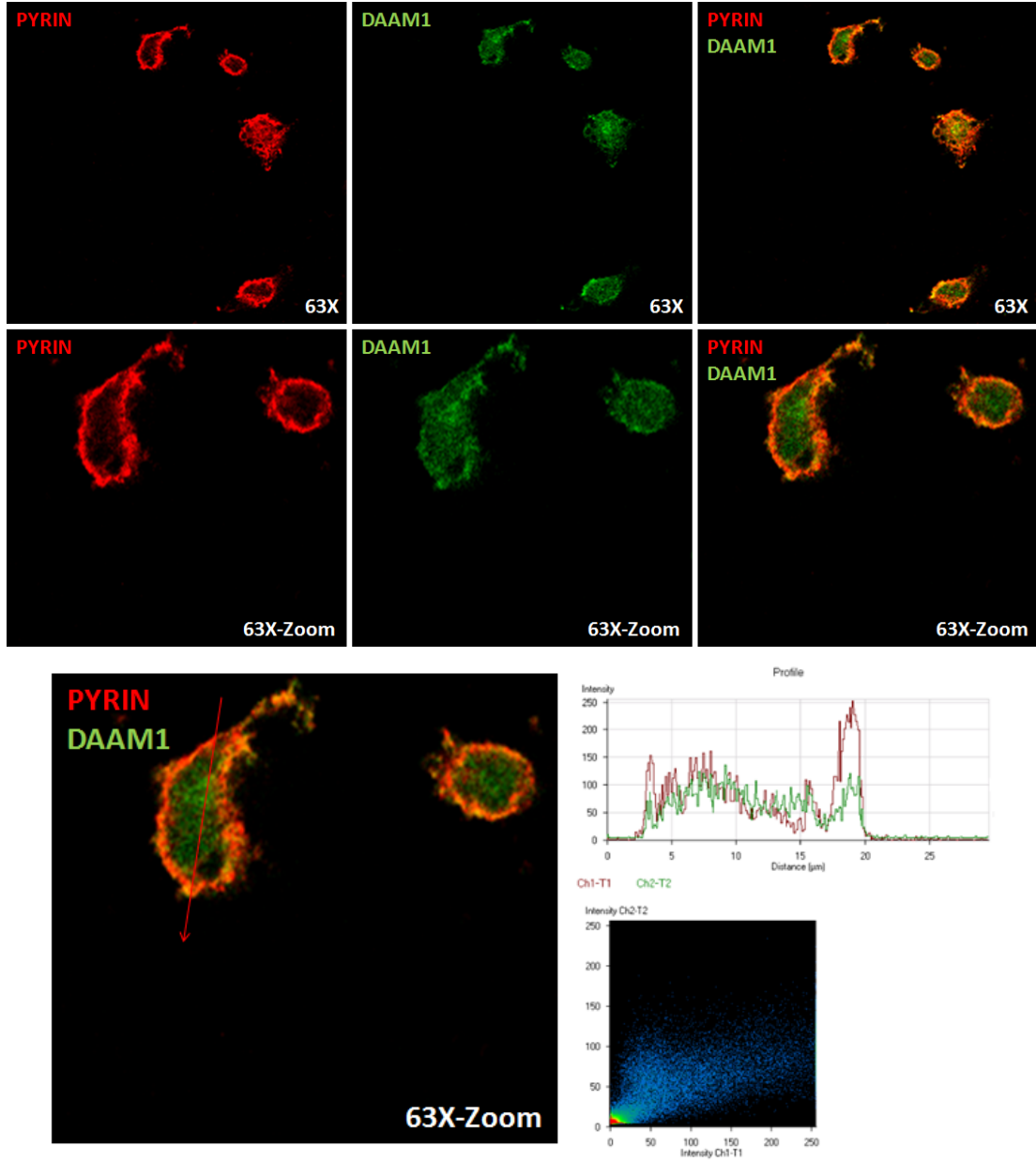
Pyrin-DAAM1 eş boyama sonuçlarına göre; bu iki protein normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada (Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.), farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise polarize olmuş hücrelerin membran çıkıntılılarına doğru (Şekil 4.40.) birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Pyrin ve DAAM1 proteinlerinin birlikte yerleşim gösterdikleri, çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafiklerine göre belirlenmiştir.



**Şekil 4.38.** Normal HL-60 hücrelerinde Pyrin-DAAM1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



**Şekil 4.39.** Farklılaşmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-DAAM1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.



**Şekil 4.40.** Farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-DAAM1 proteinlerinin eş boyama görüntüleri ile birlikte çizilen profil ve korelasyon eğrisi grafikleri.

## 5. TARTIŞMA

Doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olan inflamasyon, vücudun zararlı uyarılara karşı vermiş olduğu ilk biyolojik cevaptır. İnflamasyon kaynağının ortadan kaldırılmasında en kritik rolü oynayan nötrofiller, dolaşımdan çıkıp hasarlı dokulara doğru göç ederek bölgedeki ilk savunmayı gerçekleştirmektedir. Hücrelerin bu göç hareketini gerçekleştirebilmesi, özellikle hücre iskeleti organizasyonu ve bu süreçte rol alan proteinlerle yakından ilişkilidir (1-5).

İnflamasyon ile ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonların doğal bağışıklık cevabında aksaklıklara yol açması ile ortaya çıkan kontrolsüz inflamatuvar yanıtlar, otoinflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır (21). Bu grup içerisinde yer alan AAA, MEFV genindeki mutasyonlar sonucu oluşan ve Türkiye’de oldukça sık rastlanan bir hastalıktır (22, 24).

MEFV geni tarafından kodlanan Pyrin, mutant durumda AAA hastalığına neden olan ve henüz işlevi tam olarak açıklığa kavuşturulamayan bir proteindir (8). Yapılan çalışmalar, Pyrinin interaksiyona girdiği proteinler aracılığıyla inflamasyon ile ilişkili yollara dahil olduğunu göstermiştir (10). Pyrinin özellikle, hücre iskeleti organizasyonunda görev alan PSTPIP1 proteini ile interaksiyona girmesi (11) ve bununla birlikte Pyrinin aktin ve aktin ile ilişkili Arp3 ve VASP proteinleriyle düşük afinite de etkileşimde olduğunu gösteren çalışmalar (12), bu proteinin inflamasyonun önemli bir basamağı olan hücre göçü sürecinde işlevi olabileceğini düşündürmüştür. Buna ek olarak, laboratuvarımızda çeşitli hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar ile Pyrinin, hücre göçünü arttırdığının ve göç sürecinde hücrelerin polarize öncü ucunda PSTPIP1 ile birlikte yerleşimi olduğunu gösterilmesi de, Pyrinin inflamatuvar hücre göçü sürecinde işlevi olabileceğini destekleyen önemli bulgulardır.

Pyrinin inflamatuvar hücre göçü sürecindeki olası işlevinin aydınlatılmasının ilk basamağını oluşturan bu tez çalışmasında; literatür bilgilerine dayanarak belirlenmiş olan aktin iskeletinde rol oynayan ve hücre göçü süreçleriyle ilişkilendirilmiş 9 protein (PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNA1, WDR1,



FMNL1, DAAM1 ve ACTR2) ve Pyrin *in vitro* hücre göçü modeli üzerinde moleküler düzeyde incelenmiştir.

Hücre göçü modelinde, nötrofil-benzeri bir hücre hattı olan HL-60 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler, granülositik farklılaşmayla kolaylıkla nötrofillere dönüştürülebilmeleri ve göçe-tetikleyici ajanlarla uyarılabilmeleri yönünden hücre göçü çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (81, 82). Ayrıca, HL-60 hücrelerinin Pyrin ve Pyrin ile ilişkili proteinleri doğal olarak ifade etmesi ve daha önce laboratuvarımızda bu hücrelerle göç modelinin oluşturulması nedenleriyle, tez çalışmasında bu hücrelerin kullanılması tercih edilmiştir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, aktin ile ilişkili ilgili proteinleri kodlayan genlerin HL-60 hücrelerinde ifade olup olmadıkları belirlenmiştir. Bu kapsamda, önceden tez sürecinde incelenmesi planlanan WIPF3 (*WAS/WASL interacting protein family, member 3*) geninin, bu hücrelerde ifade olmadığı belirlenmesi ile bu gen tez kapsamından çıkartılmıştır. Bunun dışındaki tüm genlerin; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ifadelerinin olduğu kGZ-PZR yöntemiyle gösterilmiştir.

İkinci aşamada, hücrelerin nötrofile farklılaştıkları ve göçe-uyarıldıkları süreçlerde ilgili genlerin ifade değişimleri kGZ-PZR yöntemiyle kantitatif olarak analiz edilmiştir. Genlerin RNA seviyesindeki kat artış/azalışları, ACTB *housekeeping* genine göre normalize edilerek göreceli şekilde kantite edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; DAAM1, ACTR2, FMNL1 ve WDR1 genlerinin farklılaşma sürecinde göçe-uyarılmaya göre daha fazla ifade edildiği (1,82 - 2,56 arası kat artışı) saptanmıştır. Bu genler, hücre iskeletinin düzenlenmesi ve organize edilmesinde aktin ile ilişkili temel süreçlerde görev alan önemli aksesuar proteinleri kodlamaktadır. DAAM1 ve FMNL1, aktin dinamiklerinde kritik işlevlere sahip formin protein ailesi üyeleridir (62, 67). ACTR2 (Arp2), Arp2/3 kompleksinin aktin monomerleriyle ilişki kuran önemli bir alt birimidir (77). WDR1 ise, aktin depolimerizasyonunda rol alan önemli bir adaptör proteindir (59). Normal bir HL-60 hücresinin tam bir nötrofil hücresine dönüşmesi sürecinde, hücre morfolojisi ve dolayısıyla aktin iskeleti organizasyonu büyük değişikliklere uğramaktadır.

Dolayısıyla, bu genlerin farklılaşma sürecinde daha fazla ifade olmaları, ilgili proteinlerin bu değişim sürecinde önemli işlevlere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Hücrelerin göçe-uyarıldıkları süreçte ise, ACTR2 ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmezken; DAAM1, FMNL1 ve WDR1 genlerinde anlamlı ancak farklılaşma sürecine göre daha az artışlar (1,30 - 1,98 arası kat artışları) görülmüştür. Bu durum, hücrenin göç sürecinde metabolik enerjisini daha çok hareket etmede kullanması ve bu süreçte bazı genleri yeniden sentezlemek yerine, var olan gen ürünlerini protein seviyesinde düzenlemeler yaparak kullanmayı tercih etmesi şeklinde açıklanabilir.

Farklılaşma sürecinde daha fazla kat artışı gösteren diğer genler ise, PSTPIP2 ve CTNNB1 genleridir. PSTPIP2, hücre göçü süreçlerinde rol alan ve PSTPIP1 ile homoloji gösteren bir proteindir (35). CTNNB1 ise, hücre-hücre adezyonunda önemli işlevlere sahip, E-kaderin kompleksinin önemli bir üyesidir (53). Bu iki gen, farklılaşma sürecinde yukarıda adı geçen genlere göre görece daha az anlamlı kat artışları göstermiştir (1,51 ve 1,19 kat artış). Bunun sebebi, bu proteinlerin hücre göçü ve hücre adezyonu gibi daha çok protein seviyesinde düzenlenme gerektiren yollarda işlev görmeleri olabilir. Göç sürecinde de, CTNNB1’de 0,74 katlık anlamlı bir azalış görülürken, PSTPIP2 ifadesinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bu genlerin, göç sürecinde de önemli seviyede bir kat artışı göstermemesi, bu proteinlerin ilgili sinyal yollarında translasyon ya da translasyon sonrası süreçlerde düzenlenebileceği fikrini desteklemektedir.

Son olarak LPXN, CORO2A ve LSP1 genleri, farklılaşma sürecine göre göçe-uyarılma sürecinde daha fazla kat artışı (1,31 - 1,51 arası kat artışı) gösteren genlerdir. Hücre göçü ve hücre adezyonu süreçlerinde görev alan LPXN’nin (48), anlamlı olarak farklılaşma sürecinde 1,32, göçe-uyarılma sürecinde ise 1,51 kat arttığı gözlenmiştir. Yine hücre göçü sürecinin düzenlenmesinde rol alan CORO2A ise (51), anlamlı olarak farklılaşma sürecinde 0,76 kat azalırken, göçe-uyarılma sürecinde 1,46 kat artış göstermiştir. Bu sonuçlar, göç süreçlerinde işlev gören bu iki proteinin, özellikle göçe-uyarılma sürecinde transkripsiyonel seviyede düzenlenebileceğini göstermektedir. İnflamasyonda göç, adezyon ve hücre iskeleti düzenlenmesi gibi süreçlerde rol oynayan ve lökositlere özgü bir protein olan LSP1

(40), anlamlı olarak farklılaşma sürecinde 0,74 kat azalış, göçe-uyarılma sürecinde ise 1,31 kat artış göstermiştir. Yapılan çalışmalar ile LSP1'in insan miyeloid lösemik hücre hatlarında çok az ifade olduğunun gösterilmesi, LSP1'in farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerinde görülen düşük ifade seviyelerini açıklayabilir (42).

İfade değişimleri incelenen aktin ile ilişkili genlerin, özellikle göç sürecinde göze çarpan değerlerde kat artışları göstermediği görülmüştür. Bu genlerin kodladıkları proteinlerin büyük bir kısmı, hücre göçü ve hücre adezyonu süreçlerinde aktin iskeletinin düzenlenmesini hedef alan sinyal yollarında görevli olan proteinlerdir. Bu tip önemli yollar için, hücrede her an aktif bir şekilde işlev görebilecek proteinler gereklidir. Bu yüzden, bu yollarda rol alan proteinler; transkripsiyonel seviyeden çok fosforilasyon/defosforilasyon, protein-protein etkileşimleri ya da hücre içi yerleşim değişikliği gibi protein seviyesindeki organizasyonlarla düzenlenirler.

Bu tez çalışması kapsamında; PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1, DAAM1 ve ACTR2 genlerinin ifade düzeyleri, hücre göçü modeli oluşturulmuş HL-60 hücre hatlarında ilk defa incelenmiştir. Bu çalışmanın, inflamasyona temel oluşturan ve nötrofil hücrelerine en uygun modeli teşkil eden HL-60 hücrelerinde gerçekleştirilmesi literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Tezin üçüncü aşamasında ise, HL-60 hücrelerinde MEFV geni ifadesi araştırılmıştır. İlk olarak, hücrelerin farklılaşma ve göçe-uyarılma süreçlerindeki kat artışları kGZ-PZR yöntemiyle analiz edilmeye çalışılmıştır. Yapılan deneylerde birçok farklı koşul denenmesine rağmen, MEFV geni ifadesinin kGZ-PZR yöntemiyle kantite edilebilir seviyede olmadığı görülmüştür. Bunun sebebi, HL-60 hücrelerinde MEFV geni ifadesinin çok düşük olmasıdır. Düşük ifade seviyesinden dolayı amplifikasyonun 30. döngüden itibaren görülmeye başlanması, göreceli kantitasyon için uygun koşulların oluşmasını engelleyen bir faktör olmuştur. Bunun üzerine, MEFV ifadesi PZR yöntemiyle gösterilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemle elde edilen sonuçlara göre; MEFV'in hücreler farklılaştıklarında ve göçe-uyarıldıklarında ifade olduğu görülmüştür. Bant yoğunluklarına göre yapılan göreceli karşılaştırmalar sonucunda, göçe-uyarılmış hücrelerde MEFV ifadesinin arttığı saptanmıştır. Normal

hücrelerde ise, MEFV'in transkripsiyonel ifadesinin çok daha bazal seviyede olduğu ve jelde görüntülenebilir düzeyde olmadığı tespit edilmiştir.

MEFV geninin, THP-1 hücrelerinde yüksek seviyede ifade olduğu, ancak HL-60 hücrelerinde sadece granülositik veya monositik farklılaşmadan sonra ifade edildiği yapılan çalışmalar sonucunda da gösterilmiştir (10). Normalde, başta nötrofiller olmak üzere eozinofil, bazofil, monosit, dendritik hücreler ve sinoviyal fibroblastlarda ifade olan MEFV'in, bu hücrelerde de ifade seviyesinin düşük olduğu, ancak tetiklenme sonucu ifade seviyesinde artış olduğu bilinmektedir (22).

Tezin son aşamasında, aktin ile ilişkili ilgili proteinlerin göç sürecinde Pyrin ile birlikte yerleşim gösterip göstermediklerini araştırmak amacıyla; normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde eş boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan önce, ilk olarak Pyrinin bu hücrelerdeki yerleşimi belirlenmiştir. Buna göre, Pyrinin normal ve farklılaşmış hücrelerde sitoplazmada olduğu, göçe-uyarılmış hücrelerde ise hücrelerin polarize uçlarına ve uzantılarına doğru yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir. Sonraki aşamada, aktin ile ilişkili proteinlerin Pyrin ile birlikte eş boyamaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNA1, WDR1, FMNL1 ve DAAM1 proteinlerinin normal ve farklılaşmış hücrelerde Pyrin ile birlikte sitoplazmada, farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise Pyrin ile birlikte hücrelerin polarize öncü ucunda ve hücre uzantılarında yerleşim gösterdikleri belirlenmiştir. Birlikte yerleşimlerin nicel analizleri çizilen profil ve korelasyon eğrilerine göre değerlendirilmiştir. Nicel değerlendirmelere göre, normal hücrelerde PSTPIP2, LPXN ve WDR1'in; farklılaşmış hücrelerde PSTPIP2, LPXN ve FMNL1'in Pyrin ile daha yüksek seviyede birlikte yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise, Pyrinin özellikle PSTPIP2, LPXN, LSP1 ve FMNL1 proteinleri ile daha güçlü bir birliktelik göstermiştir. Bu proteinlerden özellikle PSTPIP2 ve LPXN, hücrelerin 3 durumunda da Pyrin ile kuvvetli birliktelik göstermelerinden dolayı, Pyrin ile özellikle göç sürecindeki ilişkilerinin daha detaylı analizlerle incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Yapılan immünfloresan boyamalar ile birlikte; aktin ile ilişkili 8 proteinin normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerindeki hücre içi yerleşimleri, aynı şekilde 3 farklı hücre durumunda Pyrin ile birlikte yerleşim gösterdikleri ilk defa bu tez çalışması kapsamında gösterilmiştir.

Aktin ile ilişkili ilgili proteinlerin genellikle sitoplazmik olduğu, yalnız CORO2A ve CTNBN1'in bazı durumlarda çekirdekte de yerleşim gösterebileceği bilinmektedir (52, 53). Bunun yanında, bu proteinlerin sitoplazma, hücre membranı ya da hücre uzantılarında aktin ile birlikte yerleşimleri olduğu da çeşitli hücreler üzerinde gösterilmiştir (37, 43, 48, 51, 65, 67). Pyrinin ise; hücrelerin durumlarına bağlı olarak sitoplazma, hücre uzantıları ve hücrenin polarize olmuş uçlarında aktin ile birlikte yerleşim gösterdiği, bunun yanında bazı izoformlarının da çekirdekte yerleşimi olduğu yine farklı hücreler üzerinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (12, 29, 31).

Pyrinin göçe-uyarılmış hücrelerin polarize uçlarına ve uzantılarına doğru yerleşim gösterdiği bulguları, bu proteinin göç sürecinde bir şekilde aktin iskeletine dahil olduğunu göstermektedir. Özellikle, Pyrinin göç sürecinde hücrelerin polarize uçlarında aktin ile ilişkili proteinlerle birlikte yerleşimlerinin gösterilmesi; Pyrinin bu proteinlerle birlikte ya da bu proteinler aracılığıyla aktin iskeletine dahil olduğu ve Pyrinin aktin düzeneği üzerinden inflamatuvar hücre göçü sürecinde rol alabileceği fikrini destekleyen önemli bir sonuç olmuştur.

Pyrinin hücre iskeleti ile ilişkili olduğunun gösterildiği iki önemli çalışma arasından Waite ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada, Pyrinin aktin ile birlikte yerleşim gösterdiğinin bulunmasının ardından, yapılan immün-çöktürme deneyleri ile Pyrinin aktin ile düşük afiniteye interaksiyona girdiği görülmüştür (12). Bu sonuçlar, Pyrinin aktin yerine aktin-adaptör proteinleri ile ilişki kurarak bu düzeneğe dahil olabileceğini düşündürmüştür. İlk olarak, Pyrinin PSTPIP1 aracılığıyla aktin iskeletinde yer alabileceği öngörülmüştür. Ancak yapılan çalışmalar sonucu, Pyrinin PSTPIP1'in olmadığı durumlarda da aktin iskeletinde bulunduğu görülmüştür. Bunun üzerine, Pyrinin aktin düzeneğine başka adaptör proteinlerle dahil olabileceği düşüncesi öne sürülmüştür (12).

Pyrinin, aktin iskeleti ve hücre göçü süreçleriyle ilişkili 8 protein ile özellikle göç sürecinde birlikte olduklarının gösterilmesi; Pyrinin bu proteinlerden biri ya da birkaçı ile etkileşime girerek aktin iskeletine dahil olabileceğini destekleyen önemli bir ön bulgu olmuştur.

Bu tez çalışması, Pyrinin aktinle ilişkili proteinlerle olan yakınlığının belirlenmesi ve Pyrinin inflamatuvar hücre göçü sürecindeki olası işlevinin aydınlatılması konusunda ön araştırma niteliğinde bir çalışma olmuştur. Tez kapsamında elde edilen bulgular göz önünde bulundurularak yapılabilecek protein-protein ilişkisini direkt olarak gösteren ileri çalışmalarla birlikte; Pyrinin ilgili proteinlerle olan ilişkisi ve inflamatuvar hücre göçü sürecindeki olası rolü aydınlatılabilecektir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### Sonuçlar

- Aktin ile ilişkili PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1, DAAM1 ve ACTR2 genlerinin; HL-60 hücrelerinin normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış durumlarında ifade oldukları gösterildi.
- İlgili genlerin, hücrelerin farklılaşma (ortalama 1,42;  $p \leq 0,0397$ ) ve göç-uyarıma (ortalama 1,26;  $p \leq 0,0397$ ) süreçlerindeki kat artışları belirlendi.
- MEFV geninin, normal HL-60 hücrelerinde bazal seviyede bir ifadeye sahip olduğu, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ifade artışı olduğu gösterildi.
- Pyrinin, normal ve farklılaşmış HL-60 hücrelerinde sitoplazmada, göç-uyarılmış hücrelerde ise membran ve uzantılara doğru yerleşim gösterdiği belirlendi.
- Aktin ile ilişkili PSTPIP2, LSP1, LPXN, CORO2A, CTNNB1, WDR1, FMNL1 ve DAAM1 proteinlerinin normal ve farklılaşmış HL-60 hücrelerde Pyrin ile birlikte sitoplazmada yerleşim gösterdikleri belirlendi.
- İlgili proteinlerin, göç sürecinde farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinin polarize öncü ucuna ve hücre uzantılarına doğru Pyrin ile birlikte yerleşim gösterdikleri saptandı.
- Normal HL-60 hücrelerinde PSTPIP2, LPXN, WDR1; farklılaşmış HL-60 hücrelerinde PSTPIP2, LPXN, FMNL1; farklılaşmış-uyarılmış hücrelerde ise PSTPIP2, LPXN, LSP1, FMNL1 proteinlerinin Pyrin ile daha kuvvetli bir birlikteliğe sahip olduğu saptandı.

### Öneriler

- İlgili proteinlerin miktarları, göç modeli oluşturulmuş HL-60 hücrelerinin değişik evrelerinde *Western-Blot* yöntemi ile analiz edilmelidir.
- Protein seviyesinde düzenlenen proteinlerin fosforile/defosforile durumları da *Western-Blot* yöntem ile analiz edilmelidir.

- IF boyamalar ve *Western-Blot* analizleri birlikte değerlendirilerek, Pyrin ile direkt ilişkili olduğu düşünülen aday proteinler belirlenmelidir.
- Belirlenen aday proteinlerle immün-çöktürme çalışmaları yapılarak, hangi protein ya da proteinlerin Pyrin ile etkileşime girdiği saptanmalıdır.
- Pyrin ifadesinin susturularak ortadan kaldırılması sonrasında, immünfloresan boyama ve *Western-Blot* çalışmaları tekrarlanmalı ve göç sürecinde meydana gelen değişiklikler tespit edilmelidir.
- Farklı mutasyonlara sahip AAA hastalarından ve sağlıklı kontrol bireylerden elde edilen nötrofil hücrelerinde kGZ-PZR ve IF boyama deneyleri tekrar edilerek, ilgili proteinlerin nötrofiller üzerindeki etkileri moleküler seviyede incelenmelidir.

Tez kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda yapılabilecek tüm bu çalışmalar sonucunda; inflamasyon sürecinin önemli bir aşaması olan hücre göçü mekanizmasının anlaşılması, Pyrinin bu sürece hangi proteinler aracılığıyla ve hangi aşamada dahil olduğunun açıklığa kavuşturulması mümkün olacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
2. Sadik, C.D., Kim, N.D., Luster, A.D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, 32(10), 452-460.
3. Kumar, V., Sharma, A. (2010). Neutrophils: cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10, 1325-1334.
4. Caielli, S., Banchereau, J., Pascual, V. (2012). Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 24, 671-677.
5. Luster, A.D., Alon, R., Von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, 6(12), 1182-1190.
6. Pollard, T.D., Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326, 208-212.
7. Parkos, C.A. (1997). Molecular events in neutrophil transepithelial migration. *Bioessays*, 19(10), 865-873.
8. Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C. ve diğ erleri. (2000). The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95(10), 3223-3231.
9. Seshadri, S., Duncan, M.D., Hart, J.M., Gavrillin, M.A., Wewers, M.D. (2007). Pypin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1beta processing and release. *The Journal of Immunology*. 179(2), 1274-1281.
10. Chae, J.J., Aksentijevich, I., Kastner D.L. (2009). Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British Journal of Haematology*, 146(5), 467-478.
11. Shoham, N.G., Centola, M., Mansfield, E., Hull, K.M., Wood, G., Wise, C.A. ve diğ erleri. (2003). Pypin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *PNAS*, 100(23), 13501-13506.

12. Waite, A.L., Schaner, P., Hu, C., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Hong, A. ve diğeri. (2009). Pyrin and ASC co-localize to cellular sites that are rich in polymerizing actin. *Experimental Biology and Medicine*, 234, 40-52.
13. Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369.
14. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G. ve diğeri. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302, 1704-1709.
15. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A. ve diğeri. (2008). *Molecular Cell Biology*, 6. Edition. USA: W. H. Freeman and Company.
16. Newton, K., Dixit, V.M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 1-19.
17. Pick, R., Brechtel, D., Walzog, B. (2013). Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. *Molecular Immunology*, 55, 70-75.
18. Kolaczowska, E., Kuberski, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13, 159-175.
19. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, 5. Edition. USA: Garland Science.
20. Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, 145, 1012-1022.
21. Touitou, I., Kone-Paut, I. (2008). Autoinflammatory diseases. *Best Practise and Research Clinical Rheumatology*, 22(5), 811-829.
22. Schaner, P.E., Gumucio, D.L. (2005). Familial Mediterranean Fever in the post-genomic era: how an ancient disease is providing new insights into inflammatory pathways. *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy*, 4, 67-76.
23. Infevers. Erişim: Ocak 2014, <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/index>.
24. Özaltın, F., Özen, S. (2003). Ailevi Akdeniz ateşi. *Türkiye Tıp Dergisi*, 10(2), 93-97.

25. Taskiran, E.Z., Cetinkaya, A., Balci-Peynircioglu, B., Akkaya, Y.Z., Yilmaz, E. (2012). The effect of colchicine on pyrin and pyrin interacting proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 3536-3546.
26. Cronstein, B.N., Molad, Y., Reibman, J., Balakhane, E., Levin, R.I., Weismann, G. (1995). Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 96, 994-1002.
27. Grandemange, S., Aksentijevich, I., Jeru, I., Gul, A., Touitou, I. (2011). The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes and Immunity*, 12, 497-503.
28. Gumucio, D.L., Diaz, A., Schaner, P., Richards, N., Babcock, C., Schaller, M. ve diğ erleri. (2002). Fire and ice: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20, S45-S53.
29. Chae, J.J., Wood, G., Richard, K., Jaffe, H., Colburn, N.T., Masters, S.L. ve diğ erleri. (2008). The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-κB through its N-terminal fragment. *Blood*, 112(5), 1794-1803.
30. Balci-Peynircioglu, B., Waite, A.L., Hu, C., Richards, N., Staubach-Grosse, A., Yilmaz, E. ve diğ erleri. (2008). Pyrin, product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *Journal of Cellular Physiology*, 216, 595-602.
31. Mansfield, E., Chae, J.J., Komarow, H.D., Brotz, T.M., Frucht, D.M., Aksentijevich, I. ve diğ erleri. (2000). The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood*, 98(3), 851-859.
32. Çetinkaya, A. (2011). ***Pyrin Proteininin Hücre Göçü Üzerine Etkisinin İncelenmesi***. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
33. Akkaya, Z.Y. (2012). ***Hücre Göçü Sürecinde Pyrin-PSTPIP1 İlişkisinin İncelenmesi***. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

34. Ben-Chetrit, E., Bergmann, S., Sood, R. (2006). Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology*, 45, 274-282.
35. Wu, Y., Dowbenko, D., Lasky, L.A. (1998). PSTPIP2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30487-30496.
36. Yeung, Y.G., Soldera, S., Stanley, E.R. (1998). A novel macrophage actin-associated protein (MAYP) is tyrosine-phosphorylated following colony stimulating factor-1 stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30638-30642.
37. Chitu, V., Pixley, F.J., Macaluso, F., Larson, D.R., Condeelis, J., Yeung, Y. ve diğeri. (2005). The PCH family member MAYP/PSTPIP2 directly regulates F-actin bundling and enhances filopodia formation and motility in macrophages. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 2947-2959.
38. Chitu, V., Ferguson, P.J., Bruijn, R., Schlueter, A.J., Ochoa, L.A., Waldschmidt, T.J. ve diğeri. (2009). Primed innate immunity leads to autoinflammatory disease in PSTPIP2-deficient *cmo* mice. *Blood*, 114(12), 2497-2505.
39. Grosse, J., Chitu, V., Marquardt, A., Hanke, P., Schmittwolf, C., Zeitlmann, L. ve diğeri. (2006). Mutation of Mouse Mayp/Pstpip2 causes a macrophage autoinflammatory disease. *Blood*, 107(8), 3350-3358.
40. Jongstra-Bilen, J., Jongstra, J. (2006). Leukocyte-specific protein 1 (LSP1). *Immunologic Research*, 35(1-2), 65-73.
41. Huang, C., Zhani L., Ai, Y., Jongstra, J. (1997). LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 17-19.
42. Li, Y., Guerrero, A., Howard, T.H. (1995). The actin-binding protein, lymphocyte-specific protein 1, is expressed in human leukocytes and human myeloid and lymphoid cell lines. *The Journal of Immunology*, 155, 3563-3569.

43. Wu, Y., Zhan, L., Ai, Y., Hannigan, M., Gaestel, M., Huang, C. ve diğerleri. (2007). MAPKAPK2-mediated LSP1 phosphorylation and fMLP-induced neutrophil polarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 170-175.
44. Wang, C., Hayashi, H., Harrison, R., Chiu, B., Chan, J.R., Ostergaard, H.L. ve diğerleri. (2002). Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 169, 415-423.
45. Liu, L., Cara, D.C., Kaur, J., Raharjo, E., Mullaly, S.C., Jongstra-Bilen, J. ve diğerleri. (2005). LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration. *Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 409-418.
46. Pulford, K., Jones, M., Banham, A.H., Haralambieva, E., Mason, D.Y. (1999). Lymphocyte-specific protein 1: a specific marker of human leucocytes. *Immunology*, 96, 262-271.
47. Chen, P., Kroog, G.S. (2010). Leupaxin is similar to paxillin in focal adhesion targeting and tyrosine phosphorylation but has distinct roles in cell adhesion and spreading. *Cell Adhesion and Migration*, 4(4), 527-540.
48. Lipsky, B.P., Beals, C.R., Staunton, D.E. (1998). Leupaxin is a novel LIM domain protein that forms a complex with Pyk2. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(19), 11709-11713.
49. Tanaka, T., Moriwaki, K., Murata, S., Miyasaka, M. (2010). LIM domain-containing adaptor, leupaxin, localizes in focal adhesion and suppresses the integrin-induced tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cancer Science*, 101(2), 363-368.
50. Sahu, S.N., Nunez, S., Bai, G., Gupta, A. (2007). Interaction of Pyk2 and PTP-PEST with leupaxin in prostate cancer cells. *American Journal of Physiology*, 292, C2288-C2296.
51. Marshall, T.W., Aloor, H.L., Bear, J.E. (2009). Coronin 2A regulates a subset of focal-adhesion-turnover events through the cofilin pathway. *Journal of Cell Science*, 122, 3061-3069.

52. Huang, W., Ghisletti, S., Saijo, K., Gandhi, M., Aouadi, M., Tesz, G.J. ve diğerleri. (2011). Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature*, 470, 414-419.
53. Hinck, L., Nathke, I.S., Papkoff, J., Nelson, W.J. (1994).  $\beta$ -catenin: a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends in Biochemical Sciences*, 19, 538-542.
54. Shapiro, L. (1997). The multi-talented  $\beta$ -catenin makes its first appearance. *Structure*, 5, 1265-1268.
55. Willert, K., Nusse, R. (1998).  $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8, 95-102.
56. Bienz, M. (2004).  $\beta$ -catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signaling. *Current Biology*, 15(2), R64-R67.
57.  $\beta$ -catenin. Erişim: Ocak 2014, <http://www.en.wikipedia.org/Beta-catenin>.
58. Morin, P.J. (1999). Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*, 21(12), 1021-1030.
59. Li, J., Briehar, W.M., Scimone, M.L., Kang, S.J., Zhu, H., Yin, H. ve diğerleri. (2007). Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-cofilin-mediated actin depolymerization. *Nature Cell Biology*, 9(3), 276-286.
60. Kato, A., Kurita, S., Hayashi, A., Kaji, N., Ohashi, K., Mizuno, K. (2008). Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. *Biochemical Journal*, 414, 261-270.
61. Kile, B.T., Panopoulos, A.D., Stirzaker, R.A., Hacking, D.F., Tahtamouni, L.H., Willson, T.A. ve diğerleri. (2007). Mutations in the cofilin partner Aip1/Wdr1 cause autoinflammatory disease and macrothrombocytopenia. *Blood*, 110(7), 2371-2380.
62. Han, Y., Eppinger, E., Schuster, I.G., Weigand, L.U., Liang, X., Kremmer, E. ve diğerleri. (2009). Formin-like 1 is regulated by N-terminal myristoylation and induces polarized membrane blebbing. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33409-33417.
63. Yamamoto, S., Taniuchi, I., Watanabe, T. (2000). FRL, a novel formin-related protein, binds to Rac and regulates cell motility and survival of macrophages. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6872-6881.

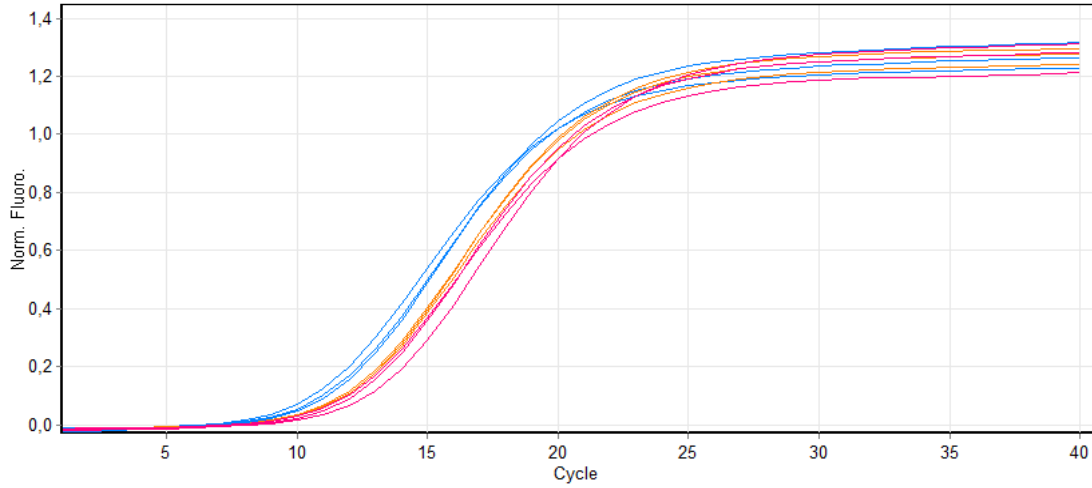
64. Zhou, F., Leder, P., Martin, S.S. (2006). Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded exon-2. *Experimental Cell Research*, 312, 1119-1126.
65. Gomez, T.S., Kumar, K., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Leibson, P.J., Billadeau, D.D. (2007). Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity*, 26, 177-190.
66. Mersich, A.T., Miller, M.R., Chkourko, H., Blystone, S.D. (2010). The formin FRL1 (FMNL1) is an essential component of macrophage podosomes. *Cytoskeleton*, 67, 573-585.
67. Liu, W., Sato, A., Khadka, D., Bharti, R., Diaz, H., Runnels, L.W. ve diğ erleri. (2008). Mechanism of activation of the formin protein Daam1. *PNAS*, 105(1), 210-215.
68. Li, D., Hallett, M.A., Zhu, W., Rubart, M., Liu, Y., Yang, Z. ve diğ erleri. (2011). Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis. *Development*, 138, 303-315.
69. Ang, S.F., Zhao, Z., Lim, L., Manser, E. (2010). DAAM1 is a formin required for centrosome reorientation during cell migration. *Plos One*, 5(9), 1-10.
70. Higashi, T., Ikeda, T., Shirakawa, R., Kondo, H., Kawato, M., Horiguchi, M. ve diğ erleri. (2008). Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by Diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8746-8755.
71. Habas R, Dawid, I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier. *Journal of Biology*, 4(2), 1-4.
72. Aspenström, P., Richnau, N., Johansson, A. (2006). The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics. *Experimental Cell Research*, 312, 2186-2194.
73. Ju, R., Cirone, P., Lin, S., Griesbach, H., Slusarski, D.C., Crews, C.M. (2010). Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis. *PNAS*, 107(15), 6906-6911.

74. Zigmond, S.H. (1998). Actin cytoskeleton: the Arp2/3 complex gets to the point. *Current Biology*, 8, R654-R657.
75. Machesky, L.M., Gould, K.L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 117-121.
76. Weaver, A.M., Young, M.E., Lee, W., Cooper, J.A. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Cell Biology*, 15, 23-30.
77. Semba, S., Iwaya, K., Matsubayashi, J., Serizawa, H., Kataba, H., Hirano, T. ve diğeri. (2006). Coexpression of actin-related protein 2 and Wiskott-Aldrich Syndrome family verproline-homologous protein 2 in adenocarcinoma of the lung. *Clinical Cancer Research*, 12(8), 2449-2454.
78. Schafer, D.A., Schroer, T.A. (1999). Actin-related proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 341-363.
79. Higgs, H.N., Pollard, T.D. (2001). Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 649-676.
80. Millard, T.H., Sharp, S.J., Machesky, L.M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochemical Journal*, 380, 1-17.
81. Collins, S.J. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood*, 70(5), 1233-1244.
82. Hauert, A.B., Martinelli, S., Marone, C., Niggli, V. (2002). Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34, 838-854.
83. Bustin, S.A. (2004). *A to Z of Quantitative PCR*. USA: International University Line.
84. Ledderose, C., Heyn, J., Limbeck, E., Kreth, S. (2011). Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC Research Notes*, 4(427), 1-11.

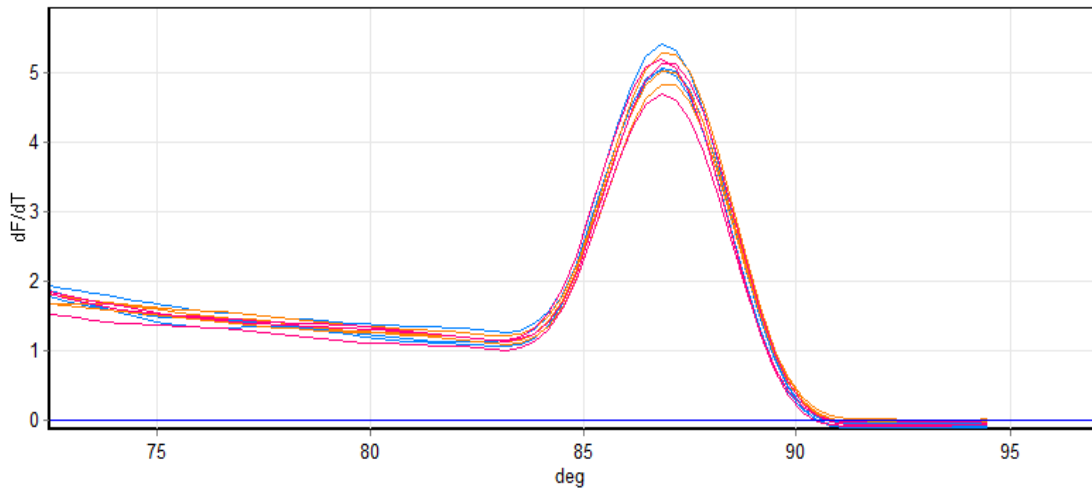


## EKLER

### EK 1. cDNA örneklerinin kontrolünde kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları

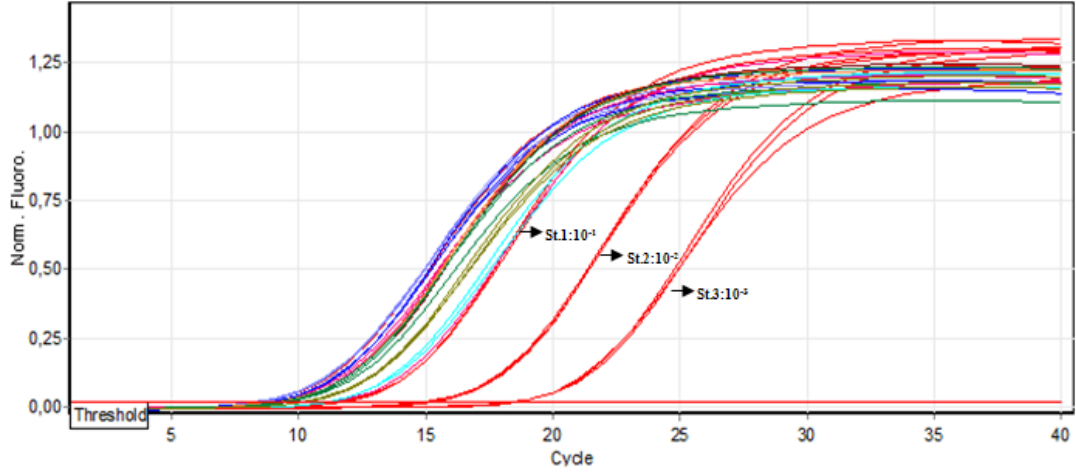


**Şekil Ek 1.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerine ait cDNA örneklerinin ACTB primeri ile gerçekleştirilen kGZ-PZR sonucu elde edilen amplifikasyon eğrisi.

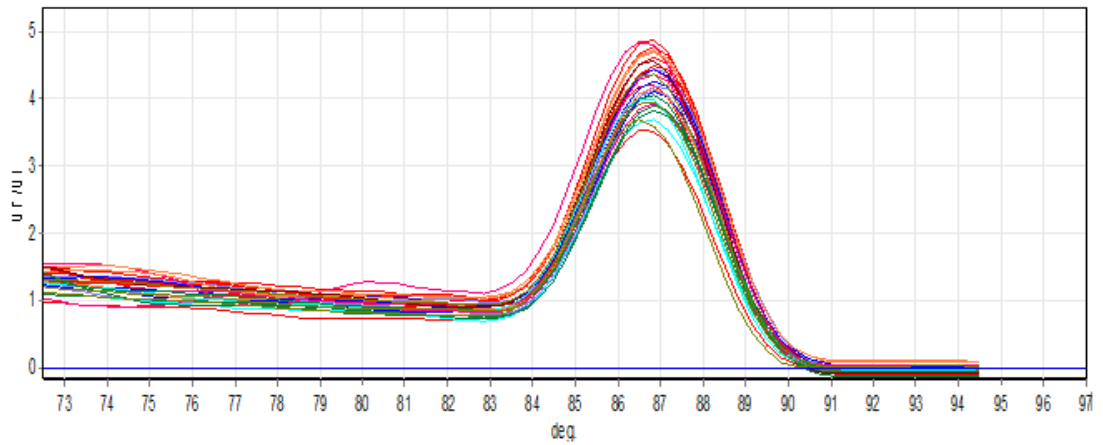


**Şekil Ek 1.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerine ait cDNA örneklerinin ACTB primeri ile gerçekleştirilen kGZ-PZR sonucu elde edilen erime eğrisi.

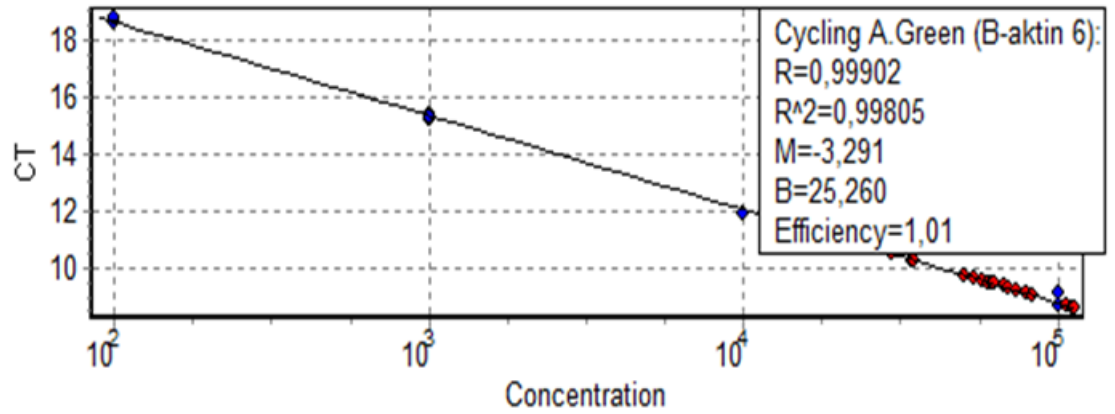
**EK 2. ACTB gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



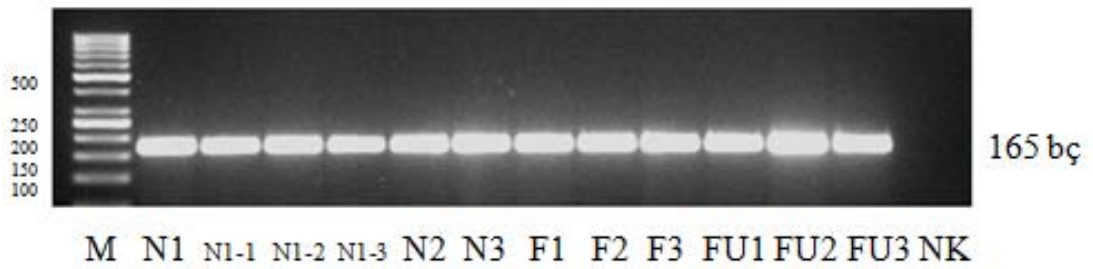
**Şekil Ek 2.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTB geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 2.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTB geni erime eğrisi.

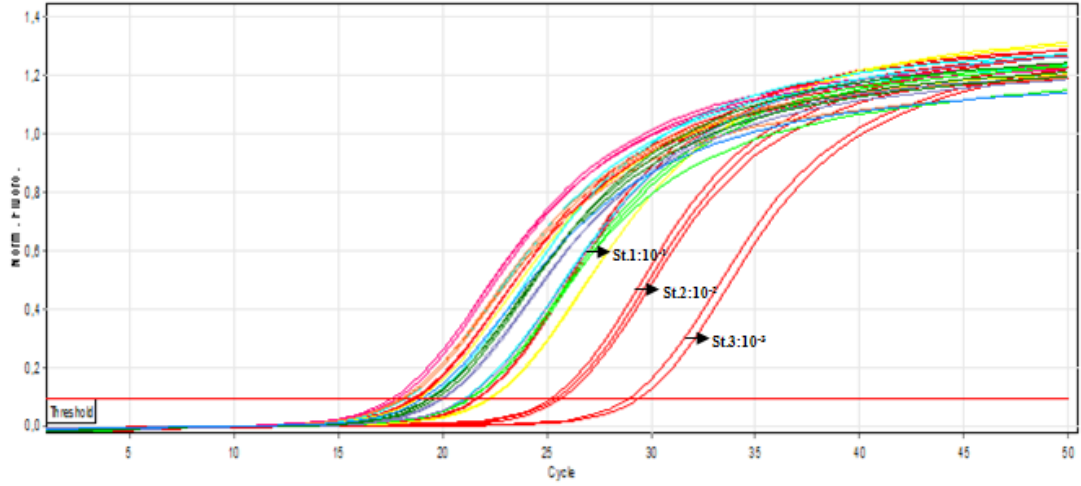


**Şekil Ek 2.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTB geni standart eğrisi.

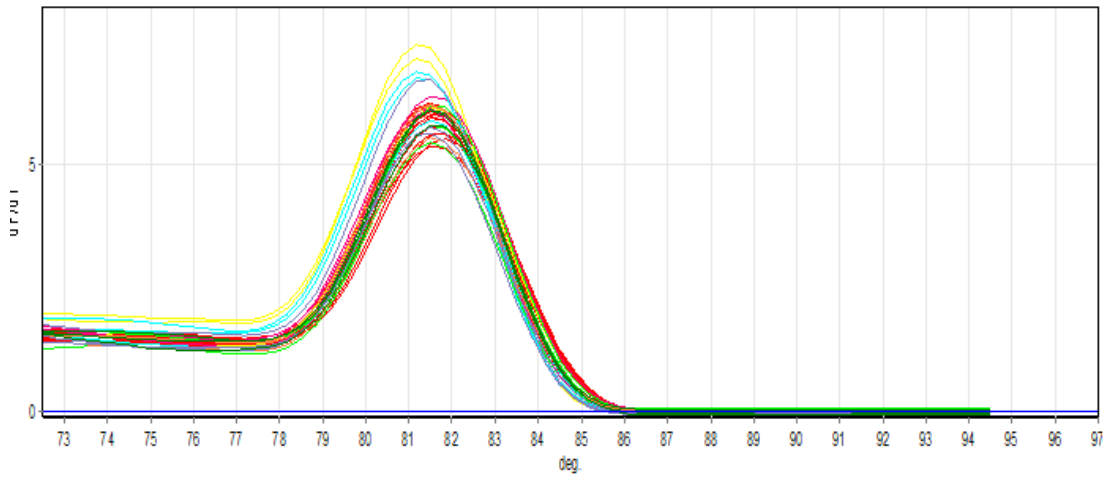


**Şekil Ek 2.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTB geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

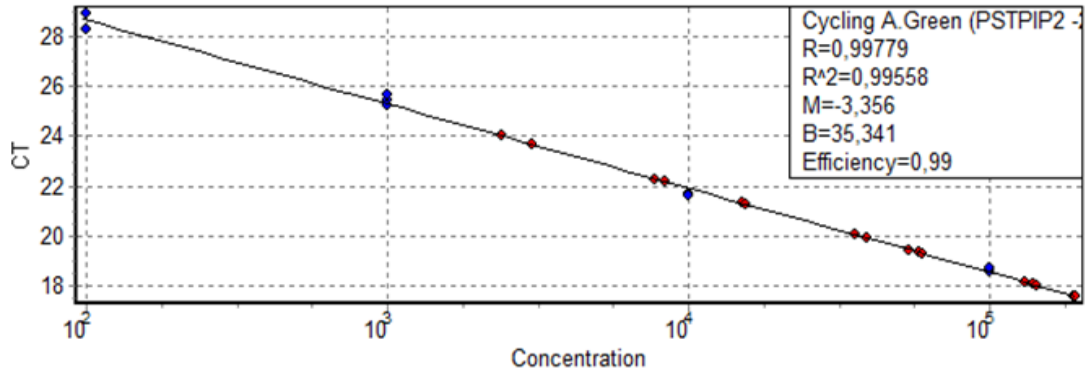
**EK 3. PSTPIP2 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



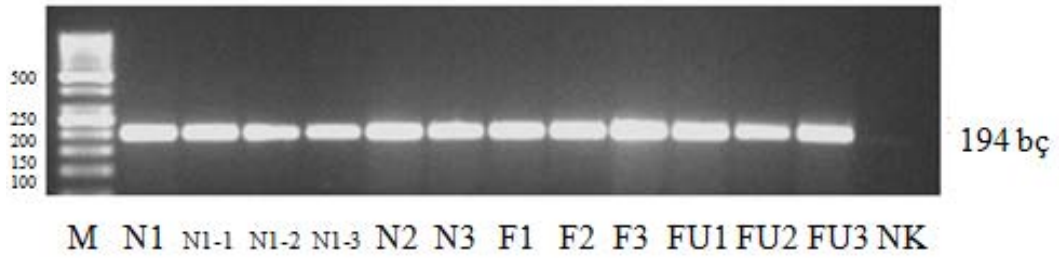
**Şekil Ek 3.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde PSTPIP2 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 3.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde PSTPIP2 geni erime eğrisi.

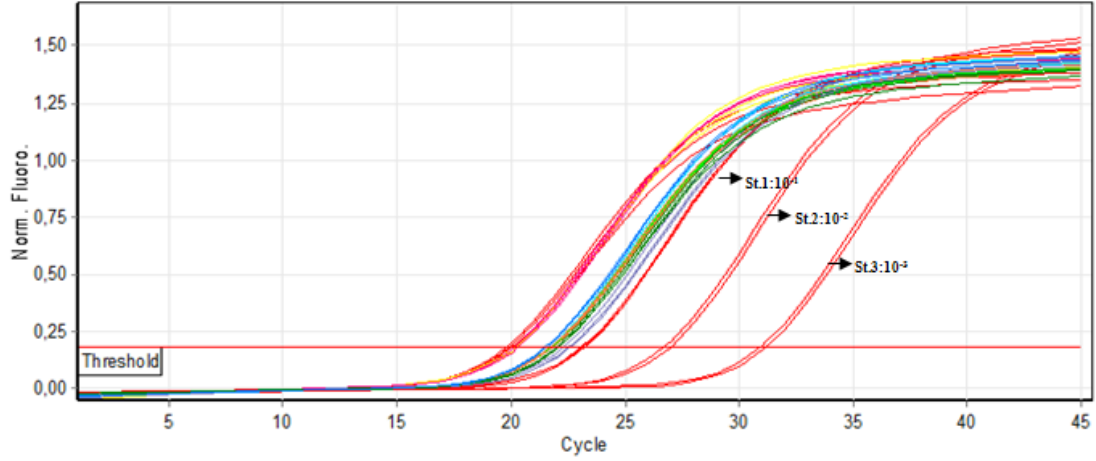


**Şekil Ek 3.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde PSTPIP2 geni standart eğrisi.

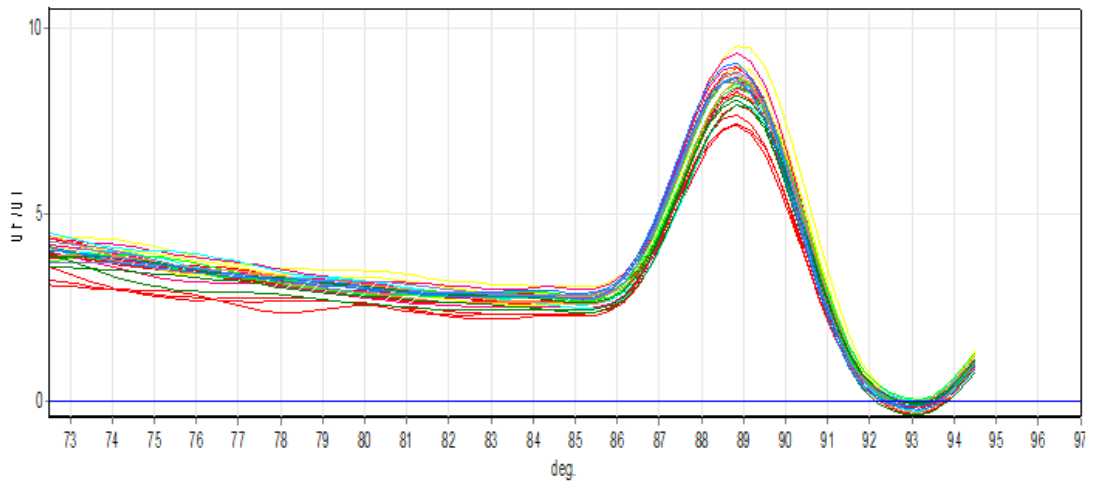


**Şekil Ek 3.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde PSTPIP2 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

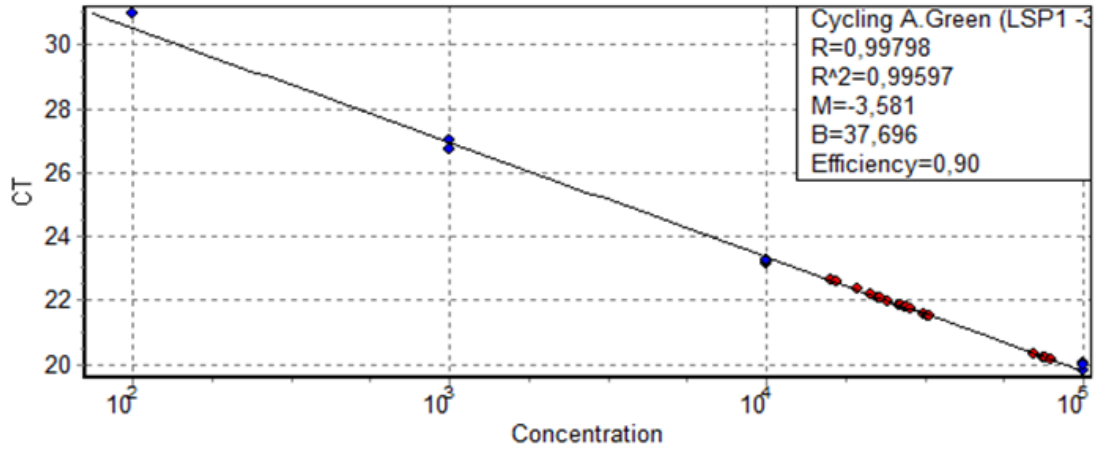
**EK 4. LSP1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



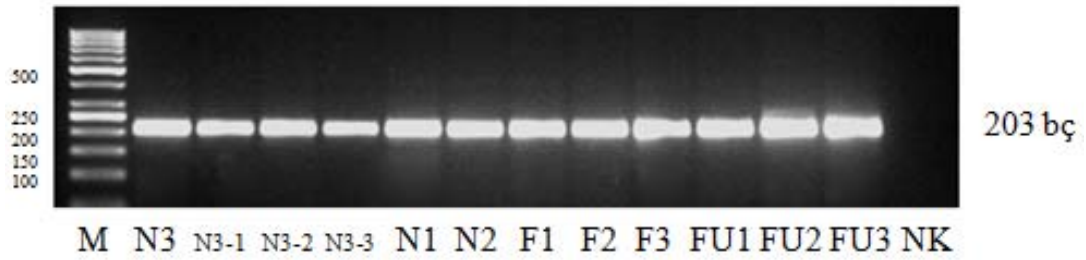
**Şekil Ek 4.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LSP1 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 4.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LSP1 geni erime eğrisi.

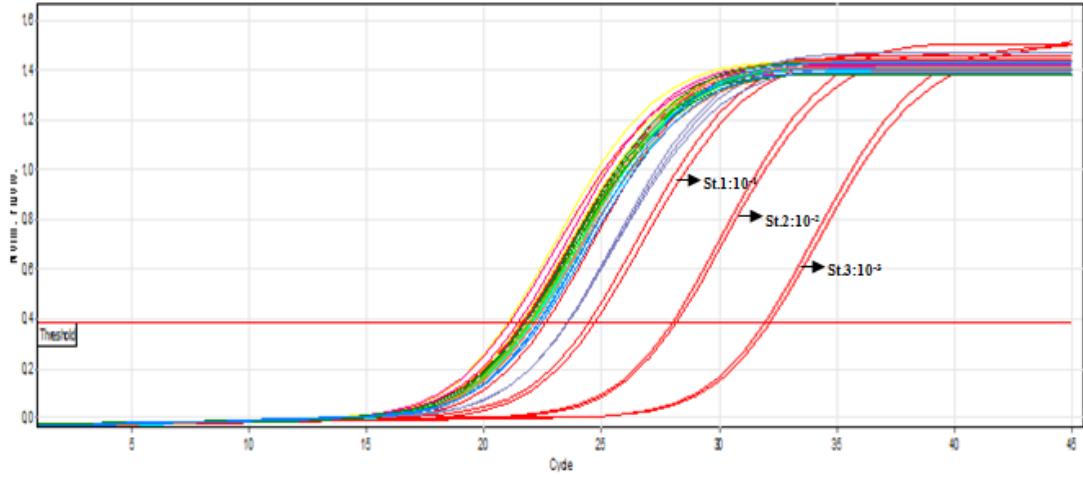


**Şekil Ek 4.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LSP1 geni standart eğrisi.

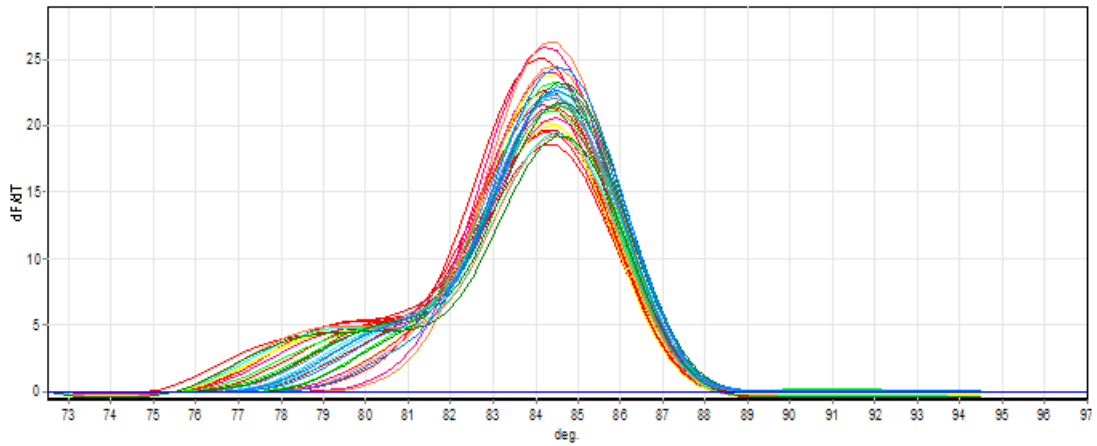


**Şekil Ek 4.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LSP1 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroferez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

**EK 5. LPXN gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**

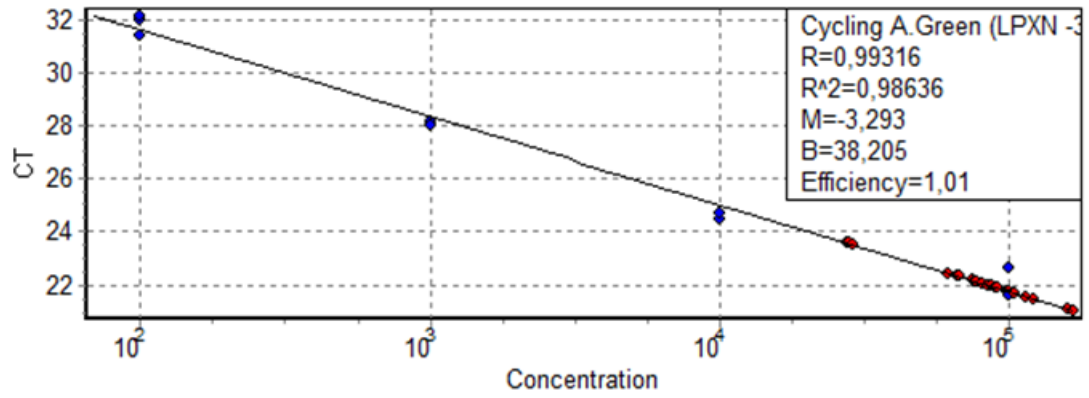


**Şekil Ek 5.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LPXN geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).

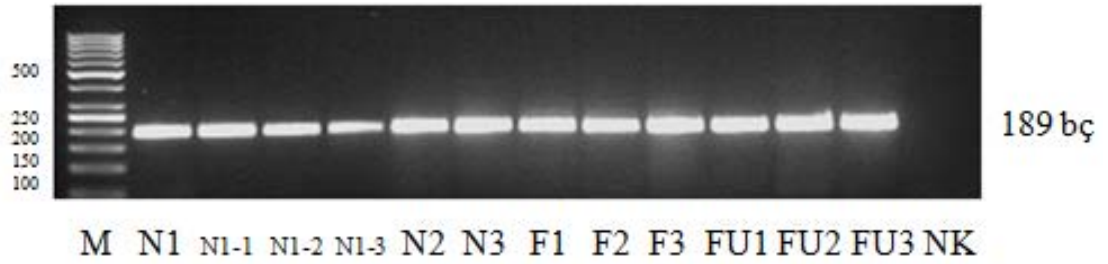


**Şekil Ek 5.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LPXN geni erime eğrisi.



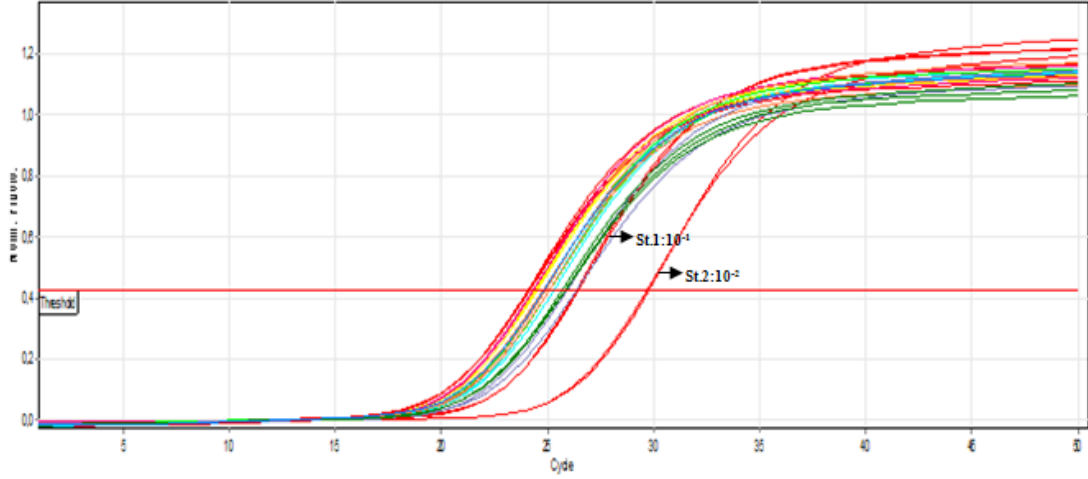


**Şekil Ek 5.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LPXN geni standart eğrisi.

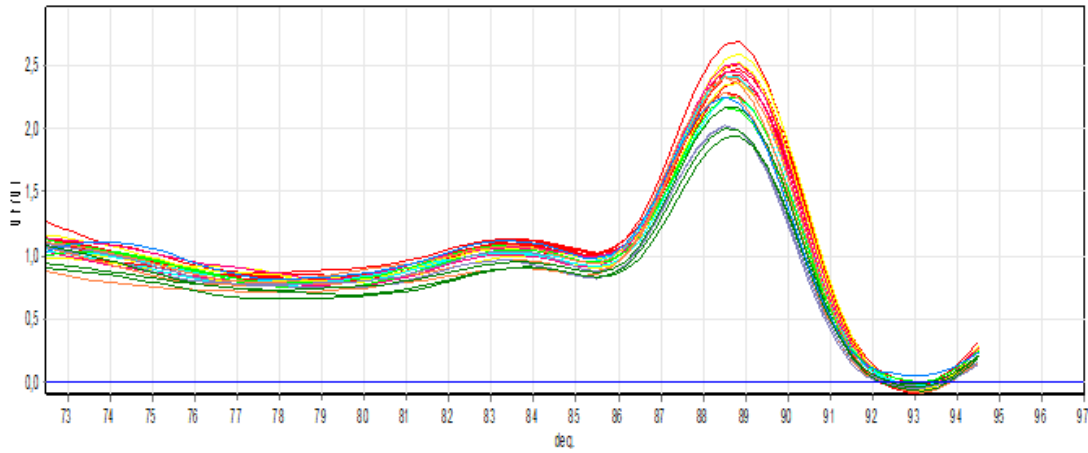


**Şekil Ek 5.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde LPXN geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

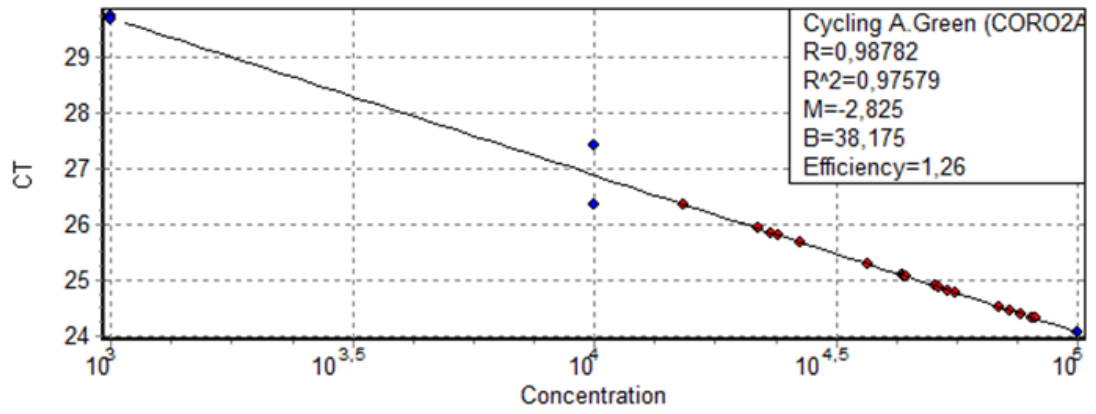
**EK 6. CORO2A gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



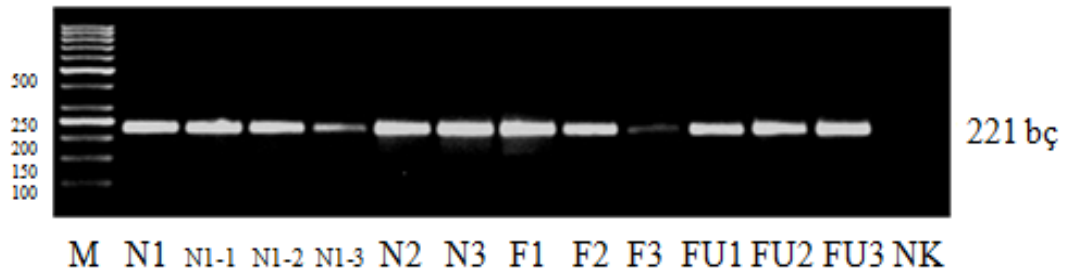
**Şekil Ek 6.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CORO2A geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 6.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CORO2A geni erime eğrisi.

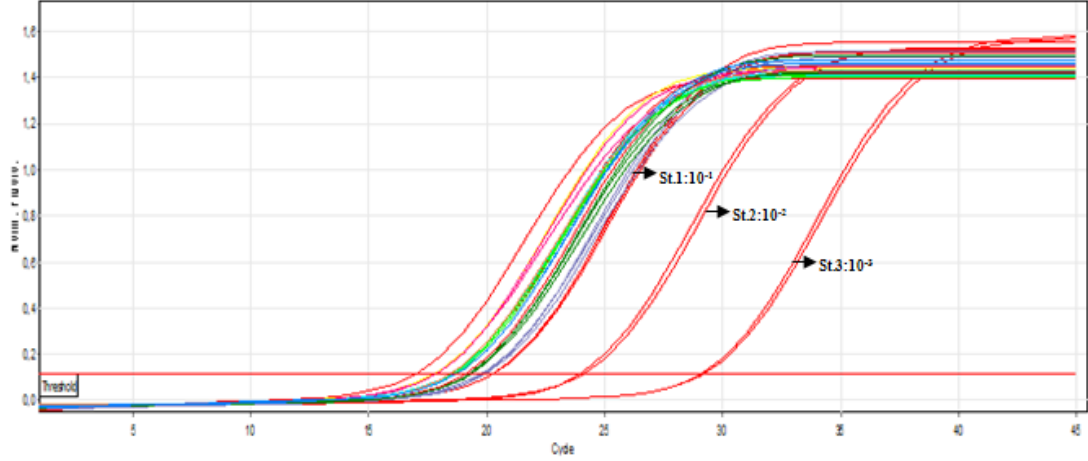


**Şekil Ek 6.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CORO2A geni standart eğrisi.

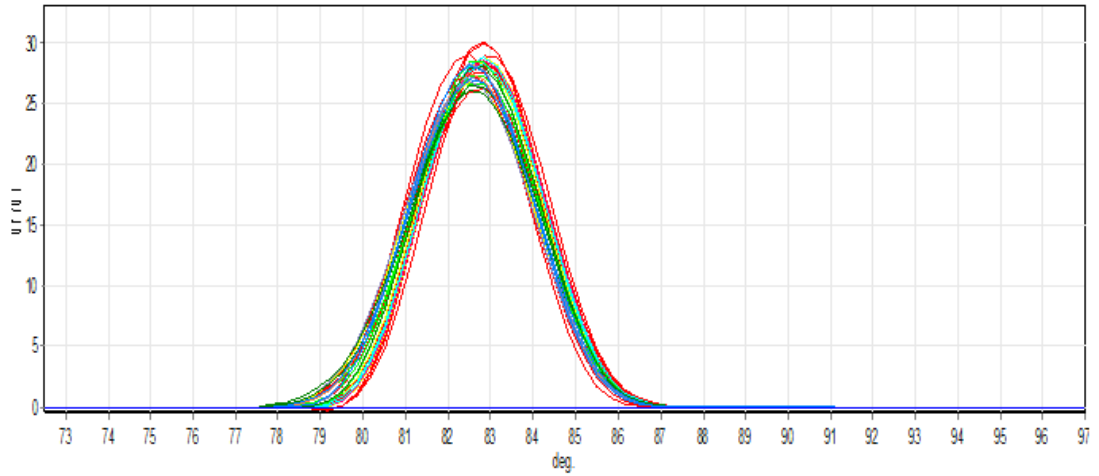


**Şekil Ek 6.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CORO2A geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

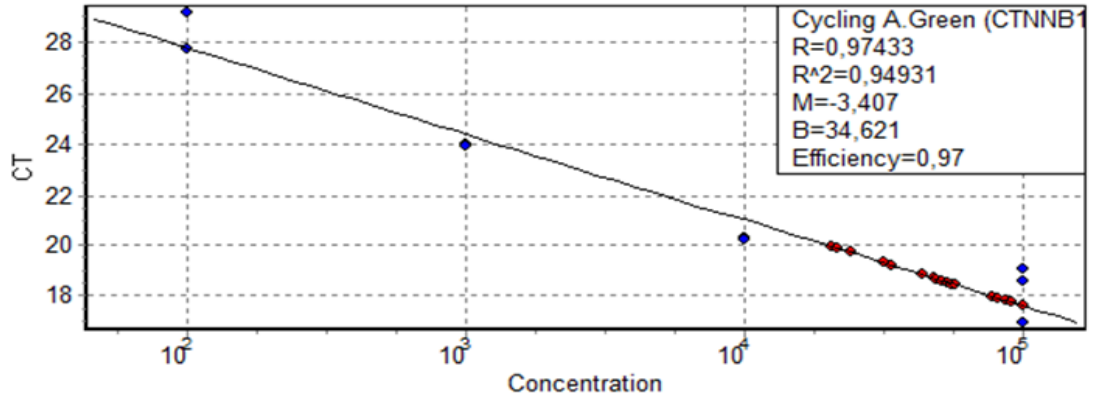
**EK 7. CTNNB1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



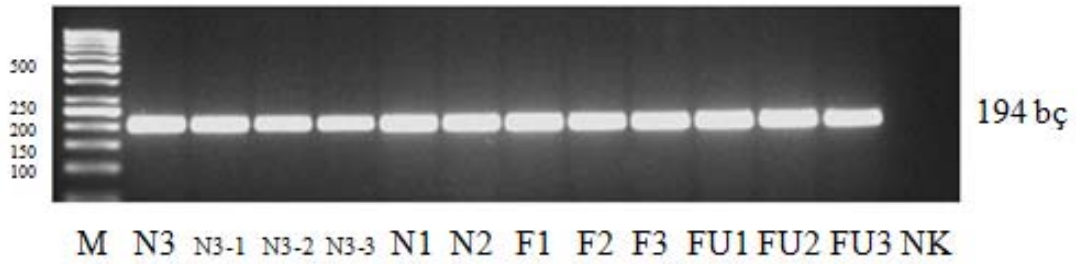
**Şekil Ek 7.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CTNNB1 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 7.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CTNNB1 geni erime eğrisi.

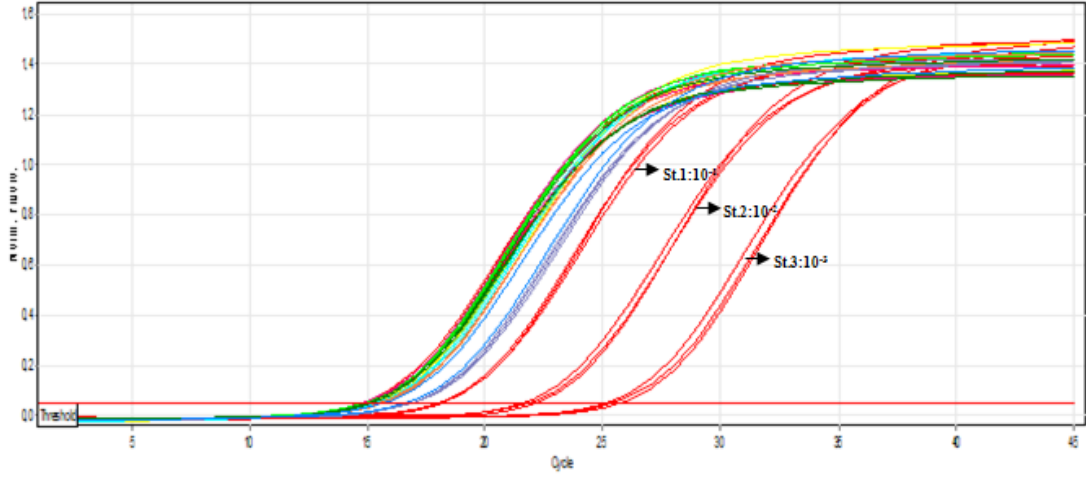


**Şekil Ek 7.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CTNNB1 geni standart eğrisi.

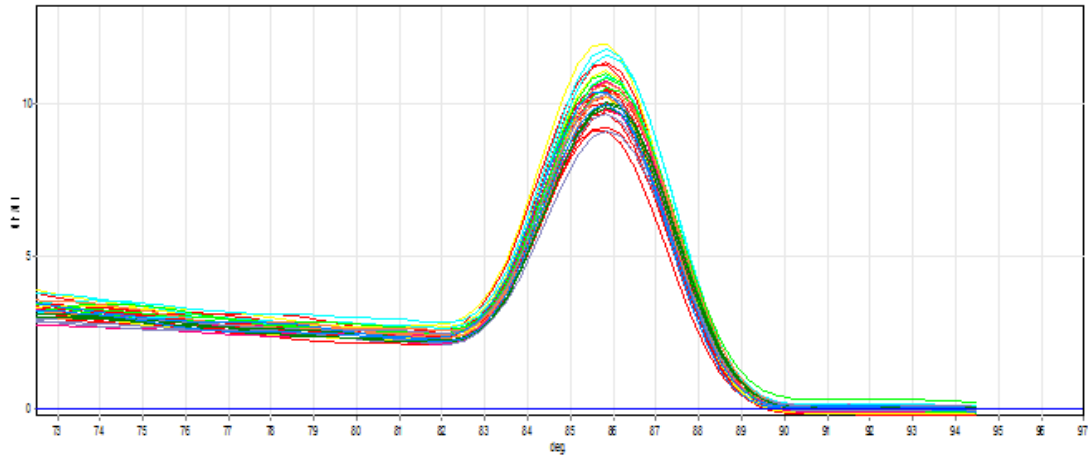


**Şekil Ek 7.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde CTNNB1 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

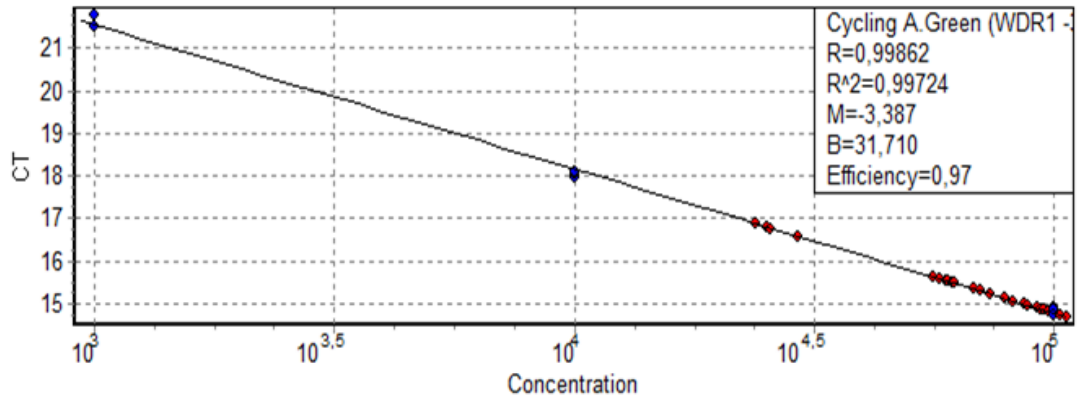
**EK 8. WDR1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



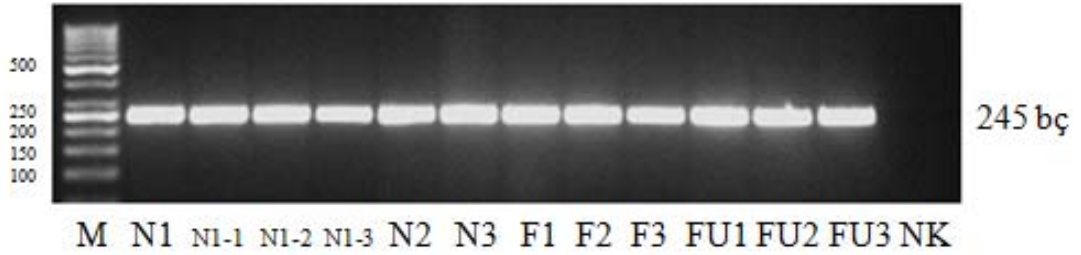
**Şekil Ek 8.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde WDR1 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 8.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde WDR1 geni erime eğrisi.

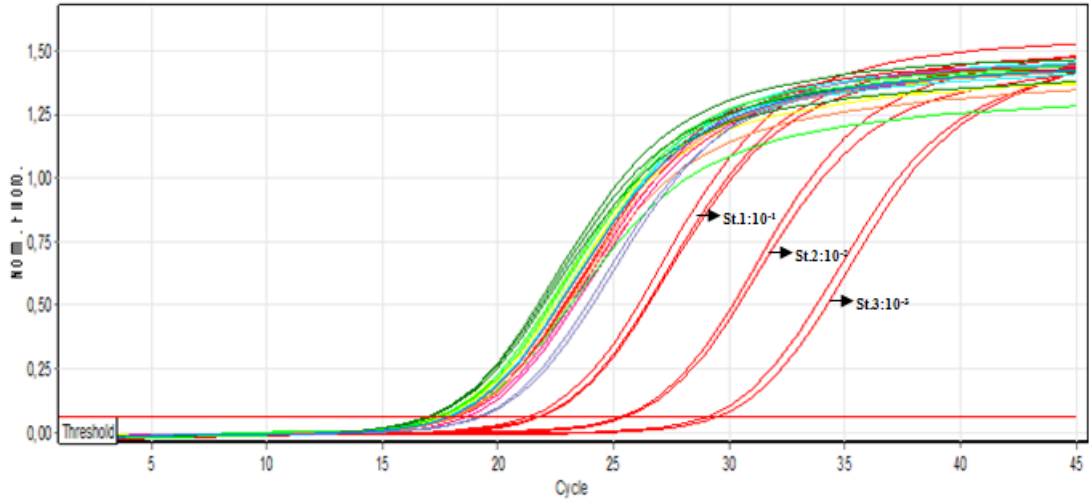


**Şekil Ek 8.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde WDR1 geni standart eğrisi.

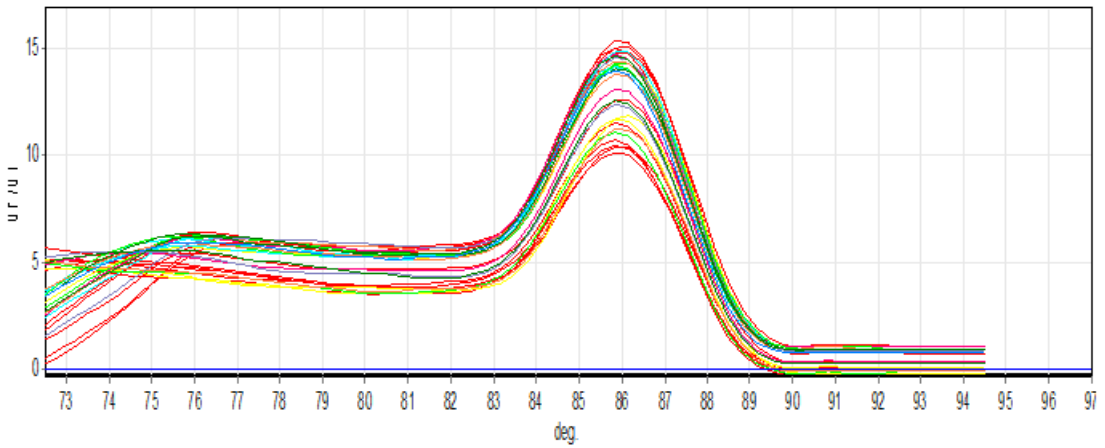


**Şekil Ek 8.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde WDR1 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroferez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

**EK 9. FMNL1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**

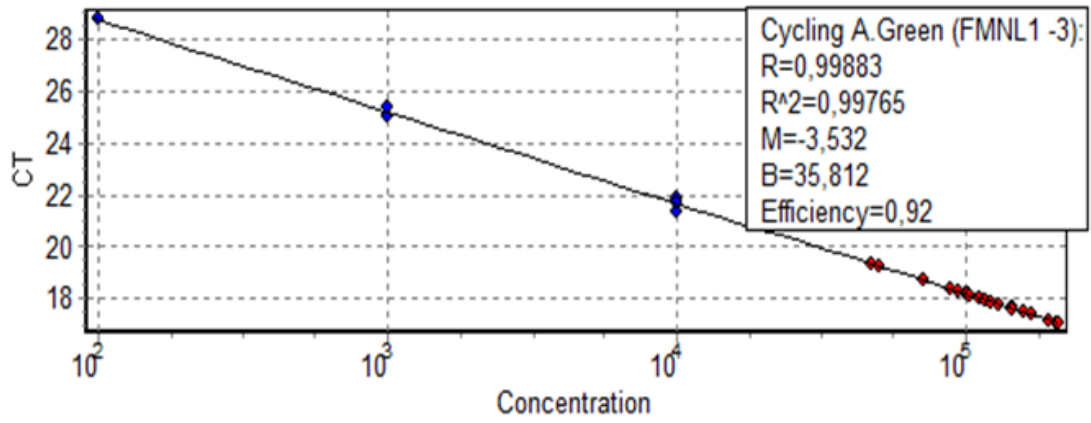


**Şekil Ek 9.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde FMNL1 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).

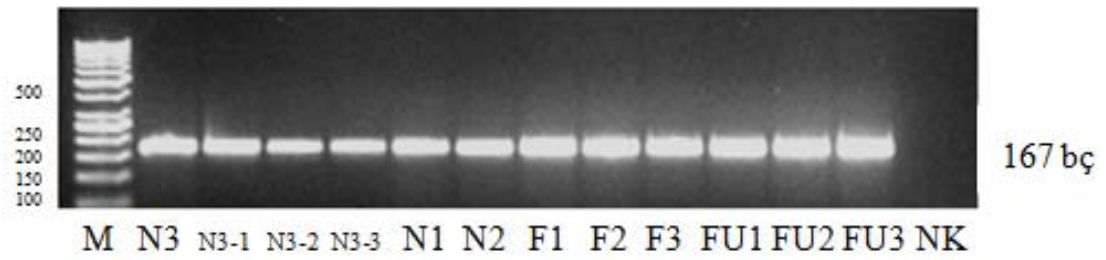


**Şekil Ek 9.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde FMNL1 geni erime eğrisi.



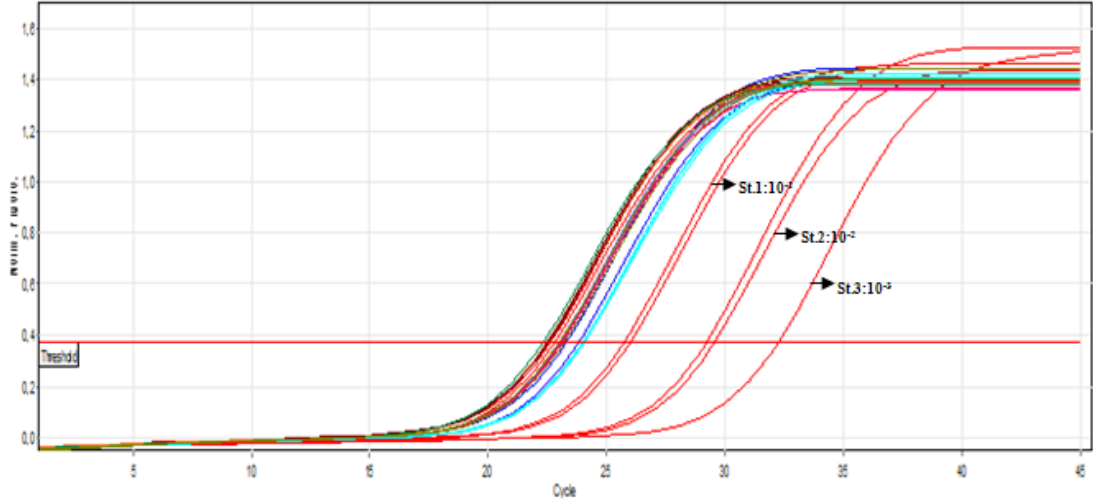


**Şekil Ek 9.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde FMNL1 geni standart eğrisi.

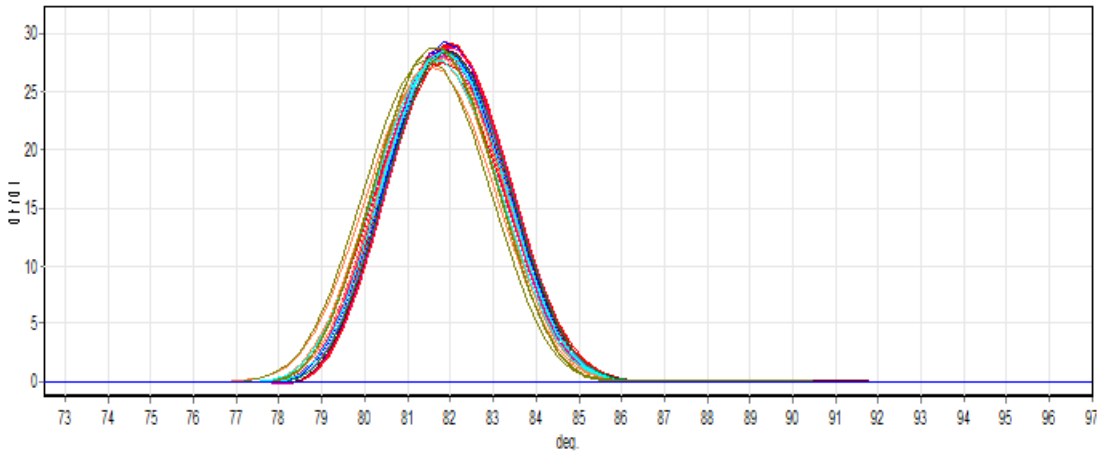


**Şekil Ek 9.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde FMNL1 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

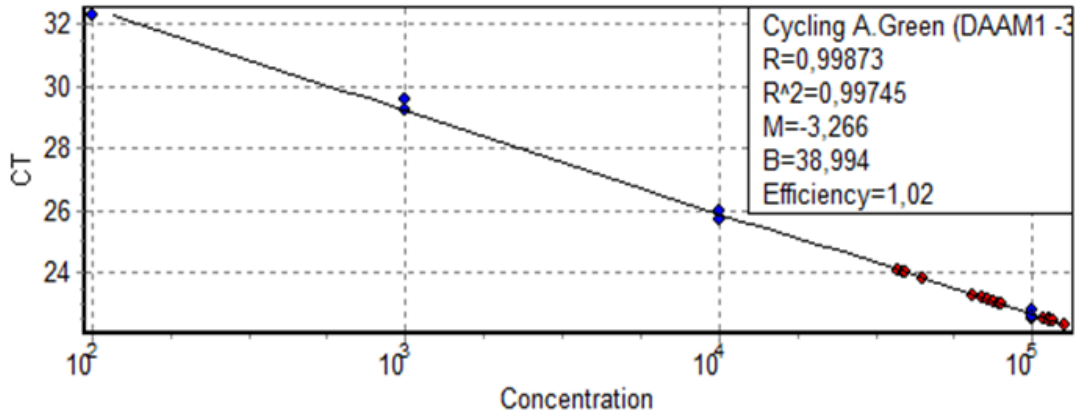
**EK 10. DAAM1 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



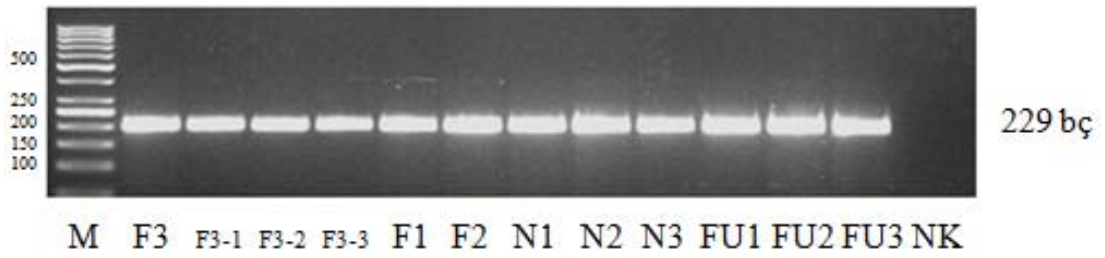
**Şekil Ek 10.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde DAAM1 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 10.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde DAAM1 geni erime eğrisi.

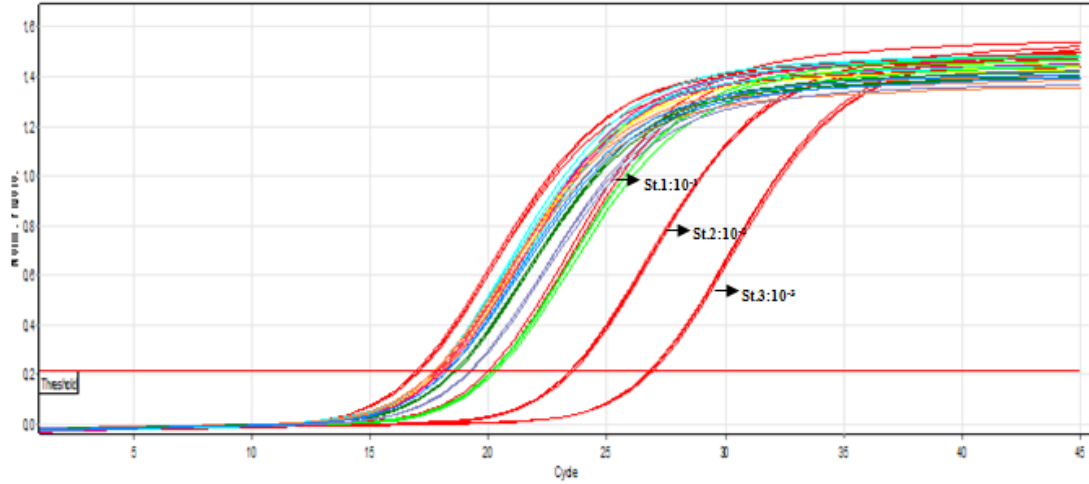


**Şekil Ek 10.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde DAAM1 geni standart eğrisi.

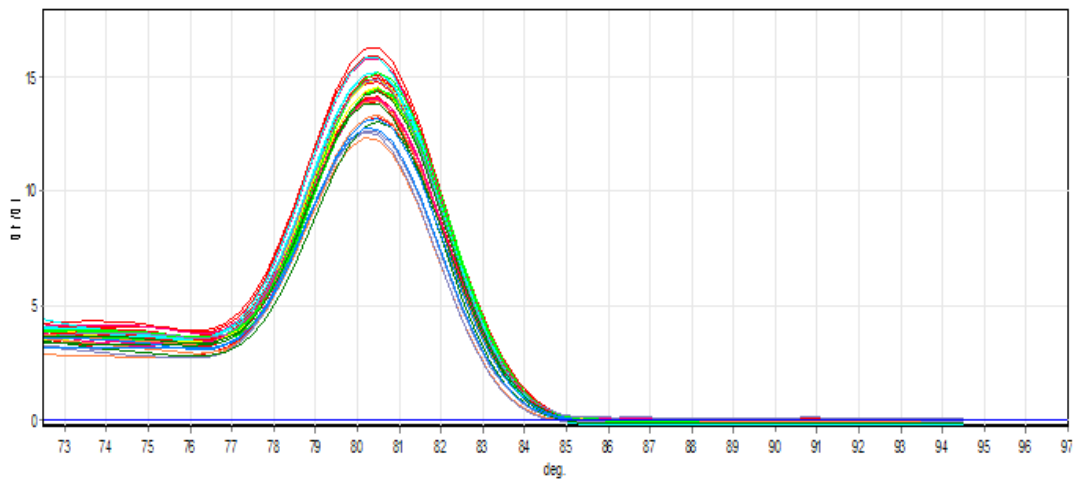


**Şekil Ek 10.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde DAAM1 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

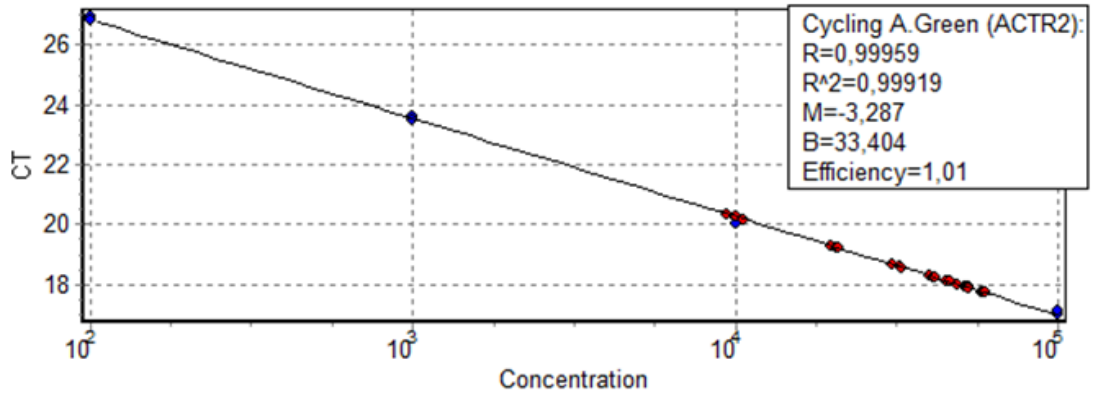
**EK 11. ACTR2 gen ifadesinin kGZ-PZR ile elde edilen analiz sonuçları ve agaroz jel elektroforez görüntüsü**



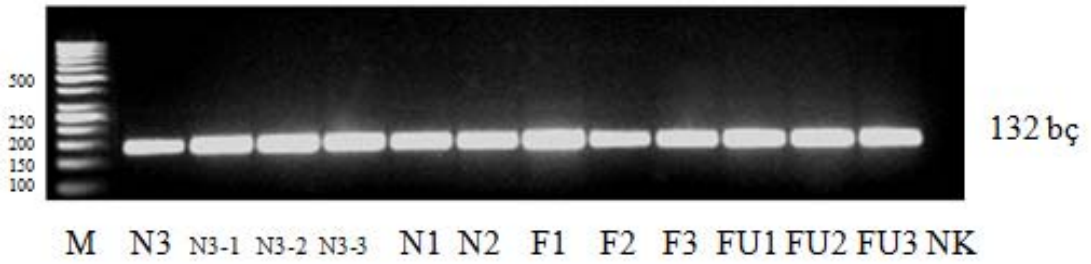
**Şekil Ek 11.1.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTR2 geni amplifikasyon eğrisi (St: Standart örnek dilüsyonları).



**Şekil Ek 11.2.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTR2 geni erime eğrisi.



**Şekil Ek 11.3.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTR2 geni standart eğrisi.



**Şekil Ek 11.4.** Normal, farklılaşmış ve farklılaşmış-uyarılmış HL-60 hücrelerinde ACTR2 geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Normal HL-60, F: Farklılaşmış HL-60, FU: Farklılaşmış-Uyarılmış HL-60, NK: Negatif Kontrol).

