

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

**KOLŞİSİNİN PYRİN VE PYRİN İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Zihni Ekim TAŞKIRAN

Tıbbi Biyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

**ANKARA
2012**

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

**KOLŞİSİNİN PYRİN VE PYRİN İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Zihni Ekim TAŞKIRAN

Tıbbi Biyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Engin YILMAZ**

**ANKARA
2012**

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Program: Tezli Doktora

Tez Başlığı: Kolşisinin Pysin ve Pysin ile İlişkili Proteinler Üzerine Etkisi

Öğrenci Adı-Soyadı: Zihni Ekim Taşkiran

Savunma Sınavı Tarihi: 18 Eylül 2012

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

Jüri Başkanı:

Prof.Dr. Serap DÖKMECİ

Hacettepe Üniversitesi

Tez danışmanı:

Prof.Dr. Engin YILMAZ

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr. Hayat YURTER

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr. Mustafa ARICI

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof.Dr. Abdullah EKMEKÇİ

Gazi 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. Mustafa Kadri ALTUNDAĞ

Müdür Y.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması sürecinde bana katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Engin Yılmaz'a; Yrd. Doç. Dr. Banu Balcı-Peynircioğlu'na; tez izleme komitesindeki katkılarından ötürü Prof. Dr. Mustafa Arıcı ve Prof. Dr. Serap Dökmeçi'ye; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki tüm öğretim üyelerine ve çalışanlarına; özverili ve uyumlu bir ekip çalışmasını ortaya koymalarından ötürü çalışma grubu arkadaşlarım Dr. Arda Çetinkaya ve Yeliz Akkaya'ya; çalışmada kullanılan vektörler ve hücre hatlarını sağlayan Prof. Dr. Deborah Gumucio'ya; canlı hücre görüntüleme ve mikroskopi uygulamalarındaki katkılarından ötürü Öğr. Gör. Dr. Burcu Hayta'ya ve Dr. Gamze Bora'ya; mikrodizin verilerinin analizinde yardımını esirgemeyen arkadaşım Mehmet Deniz Akyüz'e; en zor dönemlerimde değerli fikirleri ve yol gösterici eğilimleri ile bana her zaman destek veren, eğitimimde önemli rol oynamış Prof. Dr. Meral Özgüç'e, Dr. Ayşe Yüzbaşıoğlu'na ve Dr. Yunus Kasım Terzi'ye; her zaman yanımda olan eşim Candan Taşkiran başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Taşkıran ZE. Kolşisinin Pyrin ve Pysin ile İlişkili Proteinler Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2012. Otoinflamatuvar hastalıklar içinde en yaygın olanı ailevi Akdeniz ateşidir (AAA). Mutasyona uğraması durumunda bu hastalığa neden olan Pysin proteini, MEFV geni tarafından kodlanmaktadır. Tam olarak işlevi bilinmese de Pysin'in inflamasyonun düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmektedir. Mikrotübül bozucu bir ajan olan kolşisin, AAA tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolşisinin, etkisini mikrotübüller üzerinden gerçekleştirdiği düşünülse de, AAA'daki özgül tedavi edici etkisinin hangi yol ile olduğu henüz bilinmemektedir. Hastaların kolşisine verdiği cevap AAA'nın ayırıcı tanı ölçütleri arasında yer almaktadır. Bu noktadan yola çıkarak, kolşisinin Pysin ve/veya Pysin ile ilişkili proteinler üzerine özgül bir etkisi olduğu düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, HeLa hücrelerinde 7,5 ng/ml derişimde kolşisin uygulaması sonucu Pysin ve ASC'nin birlikte bulunduğu *speck* miktarının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca COS7 hücrelerinde yapılan çalışmalarda 10 ng/ml derişimde kolşisin uygulaması sonucu Pysin ve PSTPIP1'nin birlikte oluşturduğu retiküler fibril miktarının da azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Bununla beraber, THP-1 hücrelerinde farklı derişimlerde kolşisin uygulaması sonucu *MEFV* ifadesinin baskılandığı görülmüştür. Diğer yandan THP-1 hücrelerinde kolşisin uygulaması sonrası aktin iskeletinin yeniden düzenlendiği gösterilmiştir. Pysin'in de aktin ilişkili bir protein olması, *MEFV* ifadesindeki azalmanın aktin iskeletindeki yeniden düzenlenmeden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Son bölümde yapılan mikrodizin çalışmasında, kolşisin uygulamasının aktin ile ilişkili birçok genin ifadesinde değişikliğe sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu proteinlerin bazıları hücre göçü mekanizmasında düzenleyici olarak işlev görmektedir. Dolayısıyla kolşisinin aktin iskeletini yeniden düzenleyerek hücre göçünü baskıladığı düşünülmüştür. Tez çalışması kapsamında kolşisinin mikrotübülleri bozmaksızın, hem hücre hem de transkriptom düzeyindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak, kolşisin ve psirin arasındaki bağlantının aydınlatılması ile kolşisinin AAA tedavisindeki özgül rolü hakkında fikir edinilebilmiştir.

Anahtar kelimeler: Pysin, kolşisin, ASC, PSTPIP1, Siva, ailevi Akdeniz ateşi, hücre göçü.

Bu çalışma HÜBAB (060 110 1025) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Taskiran ZE. The effect of colchicine on pyrin and pyrin-interacting proteins. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2012. *MEFV* which encodes pyrin, causes familial Mediterranean fever (FMF), the most common auto-inflammatory disease. Pyrin is believed to be a regulator of inflammation, though the nature of this regulatory activity remains to be identified. Prophylactic treatment with colchicine, a microtubule toxin, has had a remarkable effect on disease progression and outcome. It has been thought that, inhibition of microtubule polymerization is the main mechanism of action of colchicine. But, the exact cellular mechanism explaining the efficacy of colchicine in suppressing FMF attacks is still unclear. Given the ability of colchicine treatment to be considered as a differential diagnosis criteria of FMF. We hypothesized that colchicine may have a specific effect on pyrin and pyrin interacting proteins. This study showed that administration of 7,5 ng/ml colchicine reduces ASC speck rates in HeLa cells. Also it is demonstrated that 10 ng/ml colchicine prevents reticulated fibrils formed by Pyrin and PSTPIP1 in COS7 cells. We further noted that, colchicine down-regulates *MEFV* expression in THP-1 cells. We also observed that colchicine causes re-organization of actin cytoskeleton in THP-1 cells. Pyrin is an actin-binding protein that specifically localizes with polymerizing actin filaments. Thus, *MEFV* expression might be affected by re-organization of actin cytoskeleton. Finally, microarray experiments showed that colchicine administration change the expression levels of actin-related genes. Also some of these genes play regulatory roles in cell migration pathways. According to this, it has been thought that colchicine inhibits cell migration via inducing actin re-organization. In this study, the actions of colchicine on both cellular and transcriptional levels were identified. The data presented here reveal an important connection between colchicine and pyrin which might explain the remarkable efficacy of colchicine in preventing FMF attacks.

Keywords: Pyrin, colchicine, ASC, PSTPIP1, Siva, familial Mediterranean fever, cell migration.

This study is supported by HÜBAB (060 110 1025).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Otoinflamatuvar Hastalıklar ve Ailevi Akdeniz Ateşi	3
2.2. MEFV Geni	6
2.3. Pyrin Proteini	6
2.4. Pyrin ile İlişkili Proteinler	8
2.5. Kolşisinin Önemi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Gereçler	15
3.1.1 Hücre Kültürü	15
3.1.2 Vektör Kasetlerinin Çoğaltılması	15
3.1.3 HeLa ve COS7 Hücrelerinde Transfeksiyon	15
3.1.4 İmmünfloresan Boyama	16
3.1.5 RNA Eldesi	17
3.1.6 cDNA Sentezi	17
3.1.7 Gerçek Zamanlı PZR	17
3.1.8 Mikrodizin Sistemi	17
3.2 Yöntemler	19
3.2.1. Hücre Kültürü	19

3.2.2. Mikrotübül Yapısını Bozmayan Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi	19
3.2.3. Vektör Kasetlerinin Çoğaltılması	20
3.2.4. COS7 ve HeLa Hücrelerinde Transfeksiyon	20
3.2.5. Canlı Hücre Görüntüleme	20
3.2.6. İmmünfloresan Boyama	21
3.2.7. THP-1 Hücrelerinden RNA Eldesi	21
3.2.8. cDNA Sentezi	22
3.2.9. Gerçek Zamanlı PZR	22
3.2.10. Mikrodizin Sistemi	25
3.2.11. Verilerin Değerlendirilmesi	29
4. BULGULAR	31
4.1. Mikrotübül Organizasyonunu Bozmayan Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi	31
4.1.1. Kolşisin Uygulamasının THP-1 Hücrelerinde Aktin İskeletine Olan Etkisi	31
4.2. Kolşisinin <i>Speck</i> Oluşumuna Etkisi	35
4.3. Kolşisinin Retiküler Fibrillere Etkisi	36
4.4. Kolşisinin Pysin-Siva2 Etkileşimine Etkisi	39
4.5. Kolşisinin Pysin ve İlişkili Proteinlerin Gen İfadesine Olan Etkisi	39
4.5.1. MEFV İfadesinin Düşük Kolşisin Derişimlerinde ve Farklı Zaman Aralıklarında İncelenmesi	41
4.5.2. MEFV İfadesinin Bazı Steroidal ve Steroidal Olmayan İlaçlar Varlığında İfadesinin Araştırılması	43
4.6. Kolşisinin Transkriptoma Olan Etkisi	44
4.6.1. Süspanse ve Farklılaşmış THP-1 Hücrelerinden Alınan Verilerin Karşılaştırılması	47
4.6.2. Kolşisin Uygulanmış ve Uygulanmamış Süspanse THP-1 Hücrelerinden Alınan Verilerin Karşılaştırılması	48
4.6.3. Kolşisin Uygulanmış ve Uygulanmamış Farklılaşmış THP-1 Hücrelerinden Alınan Verilerin Karşılaştırılması	48
4.6.4. Mikrodizin Sonuçlarının Kantitatif PZR ile Doğrulanması	49

5.TARTIŞMA	51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	62
EKLER	
EK-1 Tez Çalışması Kapsamında Yayınlanan Makale	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	ailevi Akdeniz ateşi
ASC	<i>Apoptosis associated speck like protein containing a CARD</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CAPS	<i>Cryopyrin associated syndromes</i>
CINCA	<i>Chronic infantile neurological cutaneous articular syndrome</i>
COS7	<i>CV-1 in origin, carrying the SV40</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DAPI	<i>Diamidinophenylindole</i>
DIRA	<i>Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GFP	<i>Green florescent protein</i>
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HIDS	<i>Hyper IgD syndrome</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein epithelial cells</i>
IL-1 β	İnterleukin 1 β
LPS	Lipopolisakkarit
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MEFV	<i>MEditerranean FeVer</i>
MWS	<i>Muckle_Wells syndrome</i>
NF κ B	<i>Nuclear Fctor kappa-b</i>
NOMID	<i>Neonatal-onset multisystem inflammatory disease</i>
PAPA	Piyojenik arthrit piyoderma gangrenozum acne
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PSTPIP1	<i>Proline serine threonine phosphatase interacting protein</i>
PyD	Pyrin domain
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SAA	Serum amiloid A

TRAPS	<i>Tumour necrosis factor associated periodic syndrome</i>
YFP	<i>Yellow florescent protein</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. Doğal immün sistemdeki hataların fenotipe yansımaları.	3
2.2. İnflamasyonun ana sitokini IL-1 β salınım yolağının şema ile gösterimi.	5
2.3. MEFV geni yapısı ve AAA fenotipi ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar.	6
2.4. Pyrin proteininin farklı bölgelerinin şematik gösterimi.	7
2.5. Pyrin ve Siva-2 birlikte transfekte edilmiş bir COS7 hücresi.	9
2.6. Transfekte HeLa hücrelerinde sitoplazmik ve <i>speck</i> şeklinde ASC ifadesi.	10
2.7. HeLa hücrelerinde Pyrin ve ASC'nin <i>speck</i> yapısı içerisinde birlikte bulunduğu gösterilmesi.	10
2.8. Pyrin ve PSTPIP1 birlikte transfekte edilen COS7 hücresinde retiküler fibril yapısının gösterilmesi.	11
2.9. Pyrin, PSTPIP1 ve ASC proteinlerinin oluşturduğu moleküler platform 'pyroptosis'.	12
4.1. Farklı derişimlerdeki kolşisinin hücre hatlarına etkisi.	32
4.2. Farklı derişimlerde kolşisin ile inkübe edilen THP-1 hücrelerindeki aktin iskeleti yapısı.	33
4.3. Filopod yapısının kolşisinden geri dönüşümlü olarak etkilenmesi.	34
4.4. Pyrin ve mutant pyrin formlarının ASC ile <i>speck</i> oluşturma yüzdeleri ve kolşisinin bu oluşuma etkisi.	36
4.5. COS7 hücresinde retiküler fibril yapısının oluşumu.	38
4.6. Süspanse THP-1 hücrelerinde kolşisinin <i>MEFV</i> , <i>ASC</i> , <i>PSTPIP1</i> ve <i>Siva</i> ifadesi üzerine etkisi.	40
4.7. Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde kolşisinin <i>MEFV</i> , <i>ASC</i> , <i>PSTPIP1</i> ve <i>Siva</i> ifadesi üzerine etkisi.	42
4.8. Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde farklı sürelerde kolşisinin uygulanması durumunda <i>MEFV</i> ifadesinin ölçümü.	43
4.9. Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde çeşitli anti-inflamatuvar ilaçların <i>MEFV</i> ifadesine olan etkisinin incelenmesi.	44

- 4.10. *Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. chipleri üzerinde kontrol problemlerinin hibridizasyon sonrası verdiği karakteristik imza. 45
- 4.11. Çalışma grubundaki *chip*'lerin korelasyon şeması. 46
- 4.12. Çalışma gruplarının birbiri ile farklı olduğunun gösterilmesi. 46
- 5.1. Kolşisinin aktin iskeletini yeniden düzenleyerek hücre göçünü baskılaması. 57

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Otoinflamatuvar hastalıkların özellikleri	4
Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan primer çiftleri ve özellikleri	24
Tablo 3.2. Poly-A RNA kontrol örneğın seri seyreltmesi	25
Tablo 4.1. Mikrodizin çalışması sonucu elde edilen bazı gen ifadesi değişikliklerinin kantitatif PZR ile doğrulanması	50

1. GİRİŞ

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA) en sık görülen otoinflamatuvar hastalıklardan biridir. Otozomal resesif kalıtılan AAA hastalığı, MEFV (*MEditerranean FeVer*) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (1,2). MEFV, Pysin proteinini kodlamaktadır. Miyeloid kökenli hücrelerde ve fibroblastlarda ifade edilen Pysin, inflamatuvar yollarda görevli birçok protein gibi PYD ve SPRY protein bölgelerini içerir (3). İşlevi tam olarak bilinmese de, inflamasyonun düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda Pysin'in hem proinflamatuvar hem de anti-inflamatuvar işlevi olabileceğine yönelik bulgular bildirilmiştir (4). Bu çalışmalarda Pysin ile etkileşime giren birçok protein saptanmıştır. Bu proteinlerden önemli olanları ve üzerinde çalışılanları; ASC (*A*poptosis-associated *s*peck like *p*rotein containing a *C*ARD), PSTPIP1 (*P*roline *s*erine *t*hreonine *p*hosphatase *i*nteracting *p*rotein 1) ve Siva'dır (5, 6, 7). Bu proteinlerin işlevini aydınlatmak adına, birbirleri ile etkileşimleri hakkında yeni bulguların elde edilmesi oldukça önemlidir.

AAA tedavisinde kullanılan en etkili ilaç kolşisinidir. Kolşisin kullanımı hem ateş ataklarını, hem de hastalığın en ciddi klinik bulgusu olan amiloid birikimini önler (8). Mikrotübül yapısını bozan bir molekül olan kolşisinin, hücre göçünü mikrotübüller üzerinden engellediği ve AAA tedavisini sağladığı öne sürülmüştür (9). Kolşisinin AAA hastalığına özgül etkisi, ilacın Pysin veya Pysin ile ilişkili proteinler üzerinde bir etkiye/etkilere sahip olduğunu düşündürmektedir.

Kolşisinin mikrotübülleri bozmayacak derişimdeki etkilerinin araştırılması, Pysin ve Pysin ile ilişkili proteinlerin inflamasyon yollarındaki işlevinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Yapılan çalışmalarda, Pysin ve ASC'nin birlikte bulunduğu *speck*'leri, mikrotübül bozucu bir molekül olan nokadozolün azalttığı gösterilmiştir (10). Bu sonuç, kolşisin için de benzer bir etkinin olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Üstelik yalnızca ASC *speck*'leri açısından değil, Pysin-PSTPIP1 ya da Pysin-Siva ilişkisinin de kolşisin uygulamasından etkilenip etkilenmediği araştırılmalıdır.

Bu tez çalışmasının amacı; kolşisinin Pysin ve Pysin ile ilişkili proteinlerin hücre ve moleküler düzeydeki etkisinin ortaya çıkarılmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda, tez çalışmasının ilk bölümünde kolşisinin yukarıda bahsedilen protein etkileşimlerine olan etkisi araştırılmıştır.

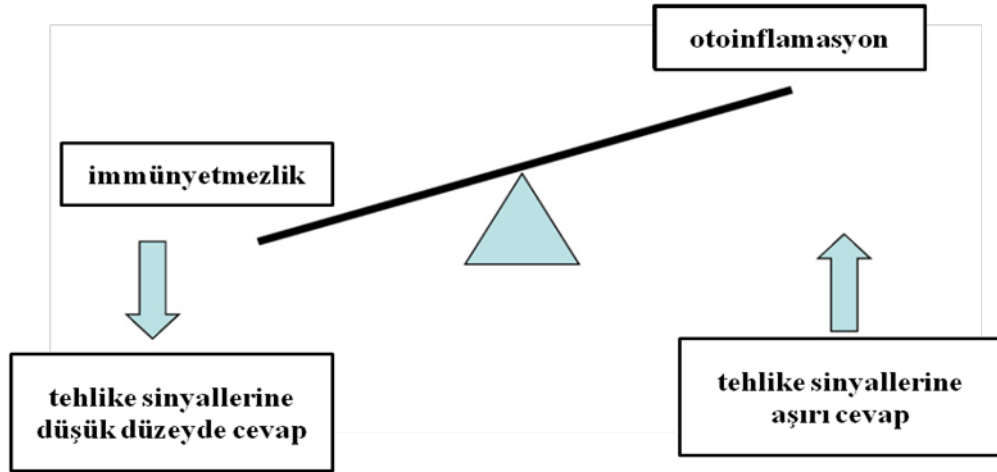
Bir diğer önemli soru da kolşisinin gen ifadesine etki edip etmediğidir. Bu güne kadar kolşisinin gen ifadesine olan etkisi, endotel benzeri HUVEC hücrelerinde araştırılmış ve kolşisin uygulaması yapılan hücrelerde, hücre adezyonu, kemokin reseptörleri gibi bazı gen gruplarında mRNA seviyesinde değişimlerin olduğu gösterilmiştir (11). Ancak Pysin ve Pysin ile ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden hücrelerde (örneğin, İnsan pre-monosit hücre hattı THP-1) herhangi bir gen ifadesi çalışması henüz yapılmamıştır. Tez çalışmasının ikinci bölümünde, kolşisinin THP-1 hücrelerinde gen ifadesine olan etkisi araştırılmıştır.

Kolşisinin moleküler düzeydeki etkisi bilindiği takdirde, Pysin, ASC, PSTPIP1 ve Siva'nın rolleri daha iyi anlaşılacaktır. Bu proteinlerin rolleri aydınlatıldığında sadece AAA patogenezi için değil, inflamasyon mekanizmasının rol oynadığı koşullar için önemli bulgular elde edilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otoinflamatuvar Hastalıklar ve Ailevi Akdeniz Ateşi

İnflamasyon, organizmaları infeksiyon ya da doku hasarı gibi durumlara karşı koruyan fizyolojik bir mekanizmadır. Doğal immün sistemin bir parçası olan inflamasyon, tehlike sinyallerini tanıyan *Toll*-benzeri reseptörler, Nod-benzeri reseptörler, sitokinler ve kemokinler tarafından düzenlenir (12). İnflamasyon veya doğal immün sistemin bileşenleri işlev göremediklerinde immün-yetmezlik durumu ortaya çıkmaktadır. Bu sistemlerin normalden fazla çalışması ya da normal koşullarda organizma için tehlike oluşturmayan bir etkenin, tehlike sinyali gibi algılanıp cevap verilmesi ise, otoinflamasyon olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.1).



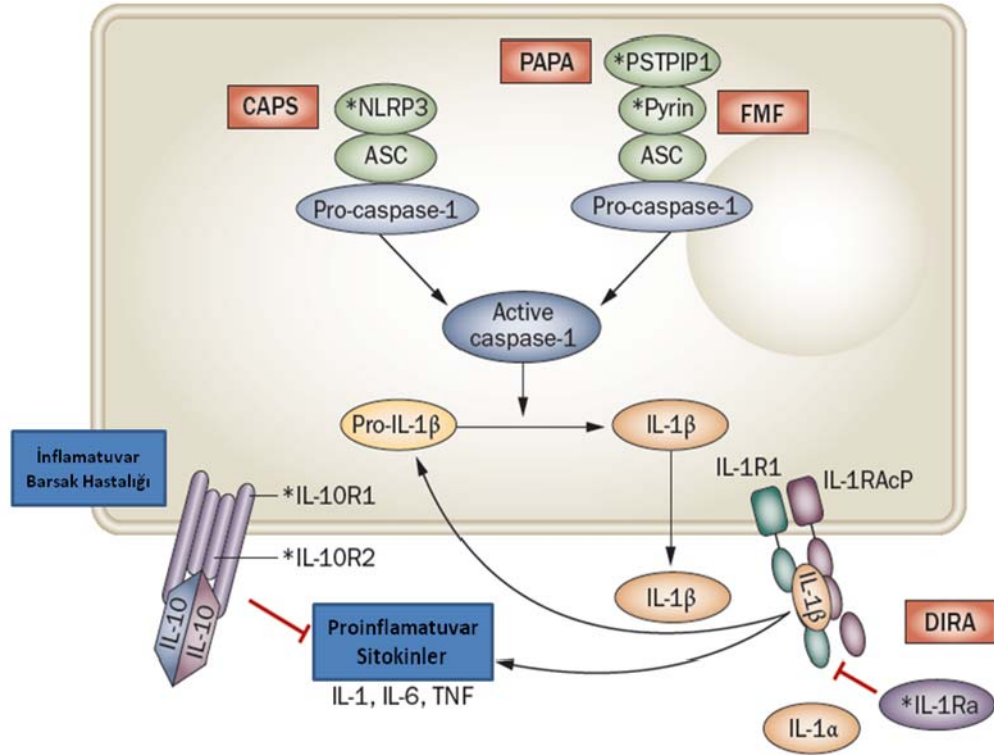
Şekil 2.1 Doğal immün sistemdeki hataların fenotipe yansımaları.

Klinik özellikleri oldukça çeşitlilik gösteren otoinflamatuvar hastalıklar, inflamasyon yolaklarında görevli olan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu güne kadar; ailevi Akdeniz ateşi (AAA), 'pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, acne syndrome' (PAPA), 'hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome' (HIDS), 'tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome' (TRAPS), 'Muckle_Wells syndrome' (MWS) ve *familial cold autoinflammatory disease* (NOMID/CINCA) gibi otoinflamatuvar hastalıklara neden olan genler tanımlanmıştır (Tablo 2.1) (13).

Bu hastalıklardan sorumlu olan genlerin veya ilişkili oldukları düzenleyici genlerin apoptozis, inflamasyon ve sitokin işlenmesinde rol oynayan proteinleri kodladıkları gösterilmiştir. Bu proteinlerin işlevlerinin ortaya çıkarılması ve otoinflamatuvar hastalıkların patogenezinin anlaşılması, inflamasyonun temel mekanizmalarının aydınlatılmasına yardımcı olacaktır (Şekil 2.2).

Tablo 2.1. Otoinflamatuvar hastalıkların özellikleri.

Hastalık	Bilinen tetikleyici	Sensör	Aracı/Aracı yolak	Hedef doku
CAPS OMIM: 120100,191900 ve 607115	soğuk, enfeksiyon, stres	NLRP3(cryopyrin)	IL-1 β aşırı salınımı	deri, göz, eklemler
AAA OMIM: 249100	bilinmiyor	Pyrin	IL-1 β salınımı ve düzensiz apoptozis	deri, göz, eklemler, periton, plevra
PAPA OMIM: 604416	bilinmiyor	PSTPIP1	IL-1 β salınımı	deri, eklemler
PGA OMIM: 186580	bilinmiyor	NOD2	NF-K β üretiminde artış	deri, göz, eklemler
HIDS OMIM: 260920	aşılama	Mevalonat kinaz	IL-1 β salınımı	deri, göz, eklemler, lenf nodları
DIRA OMIM: 147679	mekanik deri travması, enfeksiyon	bilinmiyor	IL-1 β sinyal yolağında düzensizlik	deri, kemikler, akciğer, kan damarları
TRAPS OMIM: 191190	stres, travma	bilinmiyor	IL-1 β , IL-6, TNF-alfa artışı	deri, göz, eklemler, periton, plevra



Şekil 2.2 İnflamasyonun ana sitokini IL-1 β salınım yolağının şema ile gösterimi (14).

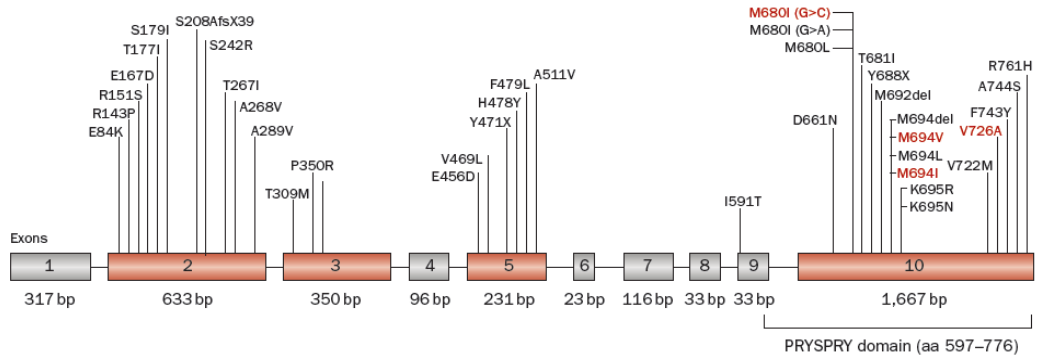
Otoinflamatuvar hastalıklar içerisinde en yaygın olanı ailevi Akdeniz ateşi (AAA) hastalığıdır. Yahudi, Ermeni ve Arap toplumlarında hastalığın görülme sıklığı 1/250-1/1000 olarak bildirilmiştir (15). Türkiye’de ise, görülme sıklığı 1/1073 olarak rapor edilmiştir (16).

Belirli aralıklarla ortaya çıkan, 1-3 gün süren, ateş, karın ve eklem ağrıları gibi klinik bulgularla seyreden ataklar, AAA hastalığının karakteristik özelliğidir. AAA hastalığında en önemli sorun amiloid birikimidir. Serum amiloid A (SAA) proteininin böbreklerde birikmesi sonucunda, hastalarda kronik böbrek yetmezliği ortaya çıkmaktadır. Böbreklerin dışında, kalp, böbrek üstü bezleri, karaciğer, tiroid bezi ve ince bağırsaklarda da amiloid birikimi görülmektedir (17).

AAA ataklarını ve amiloidoz gelişimini önlemesinden dolayı kolşisin, günümüze kadar kullanılan en yaygın tedavi olmuştur. Kolşisine cevap vermeyen hastalarda (tüm AAA hastalarının %10’u), interferon-alfa veya TNF- α reseptör baskılayıcısı olan etanersept de kullanılabilir (18).

2.2. MEFV Geni

Mutasyonları sonucunda AAA fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olan *MEFV*, 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) yer almakta olup, 1997 yılında iki farklı grup tarafından tanımlanmıştır (1,2). 3505 nükleotid içeren 10 ekzondan oluşan *MEFV*, Pirin proteinini kodlamaktadır (Şekil 2.3). Günümüze kadar 208 *MEFV* varyasyonu tanımlanmış ve bunlardan 91 tanesinin ailesel Akdeniz ateşi klinik bulguları ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (19). M694V (%51,4), M680I (%14,4), V726A (%8,6), E148Q (%3,5) ve M694I (%1,7) mutasyonları Türk AAA hastalarında en sık görülen mutasyonlar olarak rapor edilmiştir (20,21).



Şekil 2.3 MEFV geni yapısı ve AAA fenotipi ile ilişkilendirilmiş mutasyonlar.

2.3. Pirin Proteini

Çoğunlukla nötrofiller ve monositlerde ifade edilen Pirin'in, dendritik hücrelerde, deri ve sinoviyal fibroblastlarda da ifade edildiği bildirilmiştir (22, 23, 24). 781 aminoasitten oluşan Pirin, 86 kDa moleküler ağırlığında, arjinin ve lizin amino asitlerince zengin, pozitif yüklü bir proteindir. Pirin proteini, dört fonksiyonel bölge içermektedir. Bu bölgeler; amino ucu PYRIN bölgesi (PyD veya DAPIN), 'B box zinc finger' bölgesi (zf-B-box), 'Coiled coil' bölgesi (PRY), karboksi ucu SPRY bölgesi olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.4) (3).



Şekil 2.4 Pyrin proteininin farklı bölgelerinin şematik gösterimi.

Pyrin'in AAA hastalığındaki işlevi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak inflamasyonu düzenleyen temel proteinlerden biri olduğu düşünülmektedir. Transfekte hücre hatları (COS7, 293T, HeLa) ve monositlerde sitoplazmada, sinoviyal fibroblastlar ve nötrofillerde ise çekirdekte yerleşim göstermesi, Pyrin'in hücre tipine göre çeşitli proteinler ile etkileşime girerek farklı işlevler üstlenebileceğini göstermektedir (23, 24).

Pyrin'in işlevini belirlemek için yapılan çalışmalarda hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar rolü olabileceği yönünde sonuçlar rapor edilmiştir. İlk çalışmalardan elde edilen bulgular, inflamasyonu baskılayıcı bir etkisi olduğunu düşündürmüştür. Pyrin'in inflamasyonun ana sitokini IL-1 β aktive edici enzim olan kaspaz-1'i baskıladığının gösterilmesi bu fikri destekleyen önemli çalışmalardan biridir (25). Bu çalışmada, Pyrin'de bulunan SPRY bölgesinin kaspaz-1'e bağlanarak, olgun kaspaz-1'in üretilmesini engellediği ve bu yol üzerinden IL-1 β üretiminde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, Pyrin'in anti-inflamatuvar bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmüştür.

Daha sonra yapılan çalışmalarda, Pyrin'in proinflamatuvar bir rol oynadığı fikri güçlenmeye başlamıştır. İnsan pre-monosit hücre hattı (THP-1 hücreleri) ile yapılan bir çalışmada, siRNA ile Pyrin ifadesinin baskılandığı hücrelerde IL-1 β salınımının azaldığı; yine aynı çalışmada, viral vektörler ile Pyrin ifadesi aşırı ifade edildiğinde IL-1 β salgılanmasının arttığı bildirilmiştir (26). Pyrin ifadesinin IL-1 β salınımı ile doğru orantıda olması, Pyrin'in inflamasyonun oluşumu yönünde (pro-inflamatuvar) bir rol oynadığını göstermiştir.

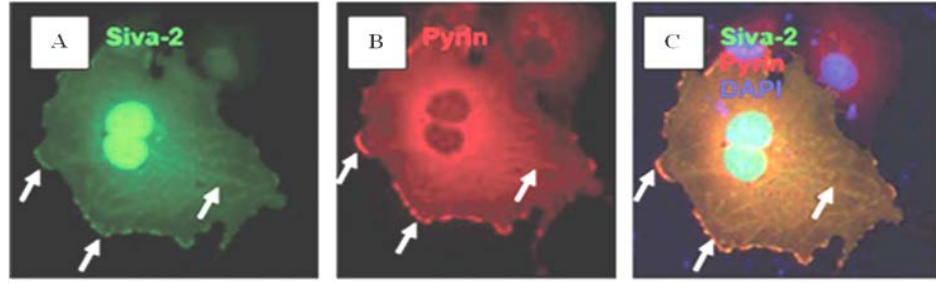
2.4. Pyrin ile İlişkili Proteinler

Pyrin'in işlevini belirleyebilmek için etkileşime girdiği proteinler saptanmaya çalışılmıştır.

Jeru ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Pyrin'in 14.3.3. protein ailesinin iki üyesi ile etkileşimde olduğu tespit edilmiştir (27). Bunlar 14.3.3.t ve 14.3.3.e proteinleridir. 14.3.3. ailesi hücre içi sinyal iletiminde işlev gören *scaffold* tipinde proteinlerdir. Bu iki 14.3.3. üyesi, Pyrin'in hücre çekirdeğine yerleşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, Pyrin'in 14.3.3. proteinlerine bağlı olarak hücrenin farklı bölgelerinde sinyal iletimine katılabileceğini düşündürmektedir.

Bir önceki kısımda da bahsedildiği gibi, Pyrin kaspaz-1 proteini ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşiminde, Pyrin'in karboksi terminalindeki SPRY bölgesinin ve kaspaz-1'in ligand bağlama bölgesinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (25).

Pyrin ile etkileşimde bulunabilen diğer bir proteinde Siva'dır. Siva proteini fibroblast, monosit ve nötrofillerde ifade edilmektedir (7). Siva geninin iki farklı transkripsiyon varyantı bulunmaktadır. Bu varyantlar, Siva1 ve Siva2 proteinlerini kodlamaktadır. Bunlardan Siva2, alternatif kırılma ile *death domain homology* bölgesi eksik olan varyanttır. Siva 1 ve Siva 2 proteinleri ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarda, her iki proteinin de proapoptotik özellikleri tanımlanmıştır (27, 29). Pyrin-Siva etkileşimi incelendiğinde, Siva'nın birinci ekzonunun kodladığı protein bölgesinin ve *MEFV*'in 10. ekzonundan kodlanan SPRY bölgesinin bu etkileşim için gerekli olduğu gösterilmiştir (7). *MEFV* mutasyonlarının büyük çoğunluğunun 10. ekzonda olduğu düşünüldüğünde Siva'nın AAA patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği olasılığı vardır. Siva'nın apoptotik etkisinden ötürü bu etkileşimin hücre ölümü açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Hücre kültüründe yapılan, oksidatif stres sonucu tetiklenen hücre ölümü modelinde, Siva'nın apoptotik etkisinin Pyrin tarafından azaltıldığı gösterilmiştir. Diğer yandan, Pyrin ve Siva 2'nin birlikte transfekte edildiği hücrelerde bu iki proteinin hücre membranının hemen altına yerleştiği tespit edilmiştir (Şekil 2.5). Bu etkileşimin, hücre yerleşim açısından ele alındığında, hücre göçünde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (7).

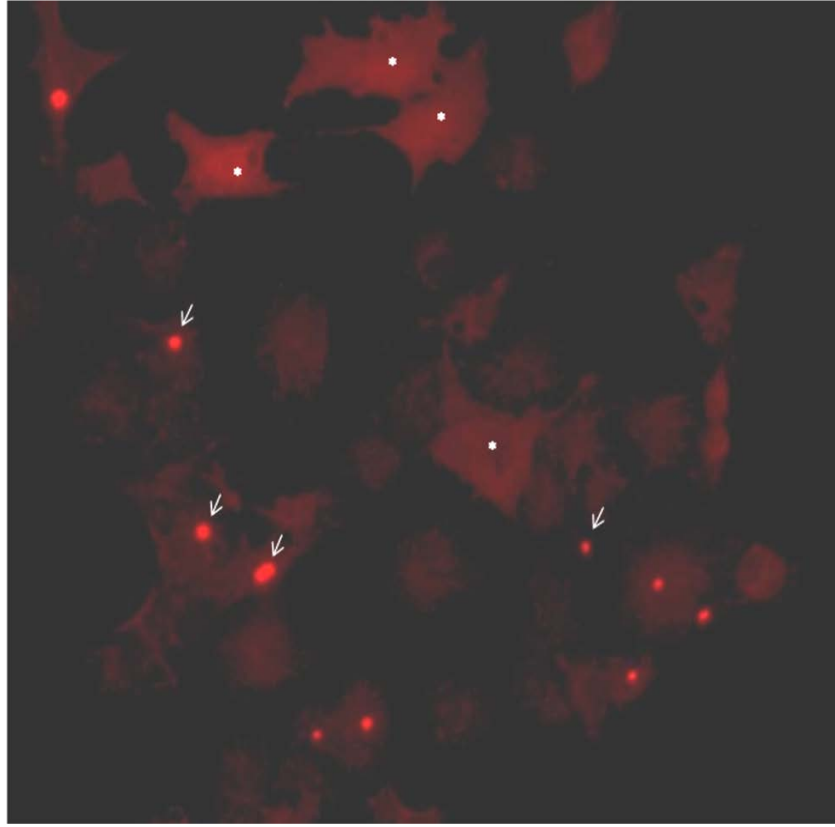


Şekil 2.5. Pyrin ve Siva-2 birlikte transfekte edilmiş bir COS7 hücresi (7). A, Siva-2 (yeşil); B, Pyrin (kırmızı), proteinlerinin yerleşimi ve C, ikisinin çakıştırılmış görüntüsü (sarı). Siva-2 çekirdek ve sitoplazmada, Pyrin ise sadece sitoplazmada yerleşmiştir. Pyrin ve Siva, hücre zarının hemen altındaki bölgede bir arada bulunmaktadır.

Pyrin ile ilişkili diğer bir protein de ASC'dir. ASC, HL60 hücrelerinde yapılan hücre ölümü çalışmalarında tespit edilmiştir. Apoptoza giren hücrelerin sitoplazmalarında *speck* adı verilen, çekirdeğe yakın, yoğun bir birikim oluşturması ile karakterize bir protein olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.6) (30).

ASC'nin inflamatuvar sinyal yollarında işlevi olduğu gösterilmiştir. Özellikle, inflamazom adı verilen, kaspazları aktive ederek inflamatuvar süreci başlatan, çok moleküllü yapılar içerisinde ASC'nin bulunduğu gösterilmiştir (31). Bu çok moleküllü yapının bir araya gelmesi ASC oligomerizasyonu sayesinde hızlanmaktadır. Buna ek olarak ASC'nin, inflamatuvar araçların salınması ile sonuçlanan *pyroptosis* ismi verilen, makrofajların programlı ölümünde anahtar protein olduğu gösterilmiştir (32).

Başka bir çalışmada, transfekte hücrelerde Pyrin ve ASC'nin *speck* yapısı içerisinde birlikte bulunduğu ve Pyrin mutant iken *speck* miktarında artış meydana geldiği gösterilmiştir (Şekil 2.7) (10). Bu sonuçlar, Pyrin ve ASC'nin inflamasyonun düzenlenmesinde birlikte işlev gördükleri fikrini desteklemektedir.

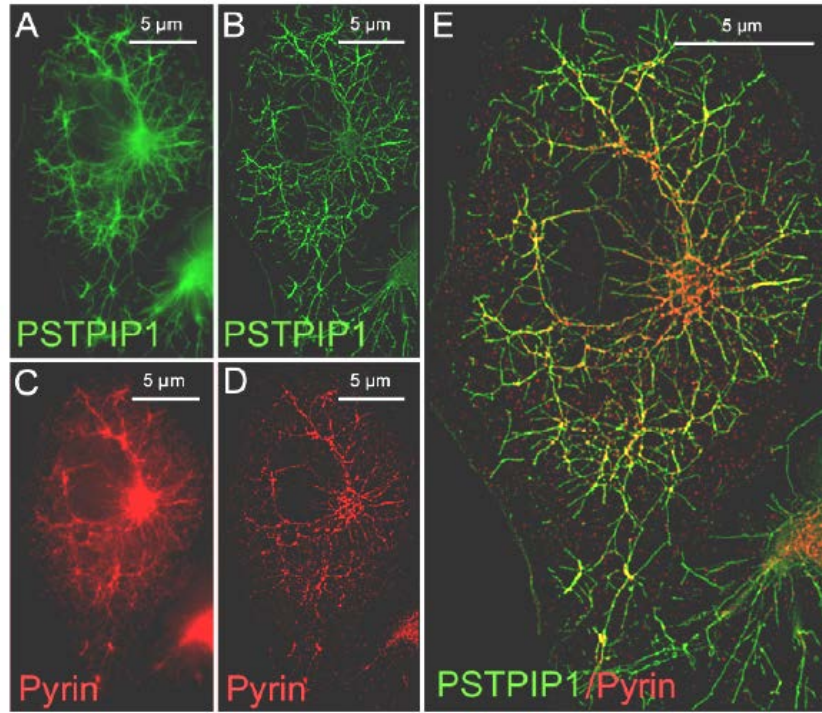


Şekil 2.6. Transfekte HeLa hücrelerinde sitoplazmik (yıldız) ve *speck* (ok) şeklinde ASC ifadesi. *Speck* yapısı küme şeklinde, çekirdeğe yakın bir yerleşim göstermektedir.



Şekil 2.7. HeLa hücrelerinde Pyrin ve ASC'nin *speck* yapısı içerisinde birlikte bulunduğu gösterilmesi (33). A) ASC-YFP (sarı floresan protein ile füzyona uğratılmış ASC proteini), B) kırmızı floresan işaretli antikor ile Pyrin, C) çakıştırılmış görüntü; Pyrin ve ASC *speck* yapısı içerisinde birlikte yerleşim göstermektedir (sarı renk). DAPI ile boyanan hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir.

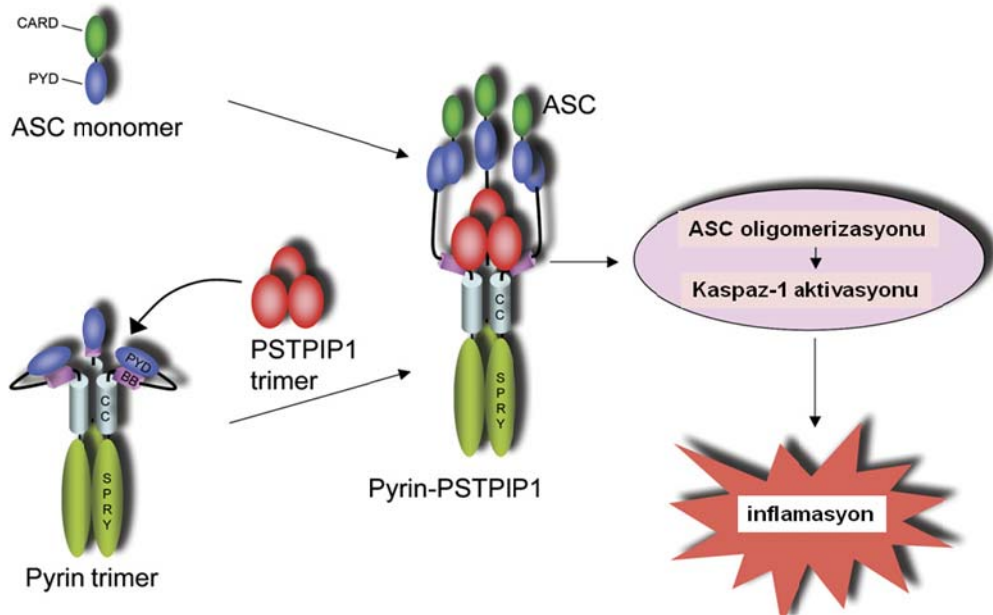
Hücre göçünün düzenleyici proteinlerinden olan PSTPIP1 de Pyrin'in etkileşime girdiği proteinlerden biridir (34,35). PSTPIP hücre iskeletinin organizasyonunda işlev görür. PSTPIP1'i kodlayan gende meydana gelen mutasyonların PAPA (Pyogenic arthritis with pyoderma gangrenosum and acne) sendromuna sebep olduğu gösterilmiştir (36). Pyrin-PSTPIP1 etkileşiminin hücre göçünü düzenlemede beraber çalıştığı, dolayısıyla inflamasyonun meydana gelmesinde rol oynadıkları düşünülmüştür. Hücrelere tek başına transfekte edildiğinde filament şeklinde bir yerleşim gösteren PSTPIP1, Pyrin ile birlikte transfekte edildiğinde "retiküler fibril" olarak isimlendirilen düzenli bir yapı oluşturmaktadır (Şekil 2.8) (33). Bu yapının işlevi henüz bilinmemektedir.



Şekil 2.8. Pyrin ve PSTPIP1 birlikte transfekte edilen COS7 hücrelerinde retiküler fibril yapısının gösterilmesi (33). PSTPIP1 (yeşil) (A-B), Pyrin (kırmızı) proteinlerinin yerleşimi (C-D) ve ikisinin çakıştırılmış görüntüsü (E). Pyrin ve PSTPIP1 retiküler fibril yapısında, özellikle dallanma bölgelerinde bir arada bulunmaktadır.

Pyroptosis mekanizmasında, PSTPIP1'in Pyrin ile etkileşime girerek ASC oligomerizasyonuna yardımcı olduğu, üstelik mutant PSTPIP1'in ASC oligomerizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 2.9). Bu üç proteinin oluşturduğu *pyroptozom* isimli moleküler platform, inflamasyonun başlatılmasından sorumludur (37).

Bu fikri doğrulayan bir başka bulgu da, inflamasyonda önemli olan hücre tiplerinin (monosit, nötrofil gibi) Pyrin, ASC ve PSTPIP1 proteinlerini doğal olarak ifade etmesi ve inflamasyonu uyaran etkenlerin varlığında ASC oligomerizasyonunun başlamasıdır.



Şekil 2.9 Pyrin, PSTPIP1 ve ASC proteinlerinin oluşturduğu moleküler platform '*pyroptosis*' (35).

Pyrin'in hücre içindeki yerleşimini belirlemek amacı ile yapılan çalışmalarda, sitoplazmada aktin ve aktin ile ilişkili proteinlerle aynı bölgede bulunduğu gösterilmiştir (38). Ayrıca, göç eden ya da kutuplaşmış bir hücrede Pyrinin polimerize aktin ile birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak diğer hücre iskelet elemanları (mikrotübüller ve ara-filamentler) ile Pyrin arasında herhangi bir ilişki şimdiye kadar saptanmamıştır.

Pyrin'in işlevini ortaya çıkarmak adına yapılan diğer önemli çalışmalar ise *knock-out* fare çalışmalarıdır. Ancak ilk yapılan *knock-out* fare, AAA hastalığının benzeri bir fenotip göstermemiştir. Bunun en önemli sebebi olarak insanda mutasyonların en sık bulunduğu 10. ekzonun, fare MEFV geninde bulunmaması gösterilmiştir (39). Sonraki çalışmalar, *knock-in* olarak isimlendirilen, insan MEFV genini fare embriyosuna yerleştirme yolu ile yapılmış, ancak yine AAA fenotipi ortaya çıkmamıştır. Fakat bu farelerin monositlerinde artan sitokin üretimi tespit edilmiştir (40). Deney hayvanları ile yapılan çalışmaların kısıtlayıcı basamağı AAA ataklarını tetikleyen etkenin bilinmemesidir. Bu durum, Pyrin'in işlevini araştırırken deney sistemlerinde uygun modeli kurmayı engellemektedir.

Diğer bir otoinflamatuvar hastalık olan gut patogenezinin aydınlatılması yukarıda bahsedilen fikir doğrultusunda gerçekleşmiştir. Beslenme alışkanlığı ile doğrudan ilişkili olan gut hastalığında, organizmada biriken monosodyum urat (MSU) kristalleri aşırı inflamasyona sebep olmaktadır (41). Yapılan çalışmalarda MSU kristallerinin NLRP3 aktivasyonuna yol açtığı ve IL-1 β üretiminde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, inflamatuvar atakları tetikleyen etkenin/etkenlerin ne olduğu bilindiğinde otoinflamatuvar bir hastalığın patogenezini ortaya çıkarmak mümkün olabilmıştır.

AAA atakların sebebi henüz bilinmediği için benzer yaklaşımlar ile Pyrin proteininin işlevini araştırmak mümkün olmamıştır. Bu tez çalışmasının kapsamında, AAA hastalığının tedavisinde kullanılan ilacın etki mekanizması üzerinden bir hipotez geliştirilmiştir: 'Kolşisin, AAA ataklarını Pyrin ve/veya ilişkili proteinler üzerinden mi engelliyor?' sorusunun cevabı bulunduğu Pyrin'in (ve/veya ilişkili proteinlerin) işlevi hakkında yeni bilgiler elde edilmiş olacaktır.

2.5. Kolşisinin Önemi

AAA hastalığında sıklıkla kullanılan ve hastalığın ayırıcı tanısını sağlayan kolşisinin etki mekanizması henüz bilinmemektedir. Kolşisinin bilinen en temel etkisi mikrotübül depolimerizasyonudur. Şimdiye kadar, doğal immün sistemde görevli hücrelerde mikrotübül depolimerizasyonu sonucunda, hücre göçü, sitokin salınımı gibi işlevlerin etkilendiği gözlenmiştir. Bu yaklaşım, kolşisinin AAA hastalığı üzerindeki etkisini açıklamaya yeterli değildir. Kolşisinin etkisini daha iyi

anlayabilmek için, mikrotübülleri bozmayan düşük derişimlerde protein etkileşimlerine ve gen ifadesine ne şekilde etki ettiği incelenmelidir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, Pyrin-ASC birlikteliğinin, mikrotübül bozucu bir ajan olan nokodazol ile ortadan kalktığı gösterilmiştir (10). Bu sonuç, kolşisin için de benzer bir etkinin olup olmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Üstelik yalnızca ASC *speck*'leri değil, Pyrin ve PSTPIP1 proteininin birlikte oluşturduğu retiküler fibril yapısının ve Pyrin-Siva birlikteliğinin de kolşisin varlığında nasıl etkilendiği bilinmemektedir.

Giriş kısmında da bahsedildiği gibi, Ben-Chetrit ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kolşisinin gen ifadesi üzerine etkisi mikrodizin yöntemi ile incelenmiş ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (11). Ancak söz konusu çalışmada kullanılan hücrelerin Pyrin ve ilişkili proteinleri ifade etmemesi, kolşisinin bu genlere etki edip etmediği sorusunun da cevapsız kalmasına neden olmuştur. Bu sebeple, Pyrin ve ilişkili proteinleri doğal olarak ifade eden THP-1 hücreleri üzerinde kolşisinin gen ifadesine olan etkisi tez çalışması kapsamında incelenmiştir.

Kolşisin uygulamasının tedavideki özgül etkisi bilinmediğinden, başka hangi yolları etkileyip etkilemediği merak konusudur. Mikrodizin sistemi kullanılarak yapılan transkriptom incelemesi sayesinde insan genomundaki tüm genlerinin ifadesi ölçülebilmektedir. Kolşisin uygulaması yapılan hücrelerin transkriptom verileri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında kolşisinden etkilenen yollar ortaya çıkarılabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre Kültürü

HeLa (İnsan epitel hücre hattı) (ATCC)

COS7 (Maymun fibroblast benzeri hücre hattı) (ATCC)

THP-1 (İnsan pre-monosit hücre hattı) (ATCC)

* Hücre hatları Michigan Üniversitesi Hücre ve Gelişimsel Biyoloji Bölümü, Dr. Deborah Gumucio tarafından hediye edilmiştir.

L-Glutamin (Biochrome)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Biochrome)

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Biochrome)

Fetal Dana Serumu (FCS) (Biochrome)

Streptomisin/Penisilin (Biochrome)

Tripsin EDTA (Biochrom)

Kolşisin Solüsyonu (Biological Industries)

Forbol Mristol Asetat (PMA) (Sigma)

3.1.2. Vektör Kasetlerinin Çoğaltılması

Tripton (Applichem)

Maya Özütü (Applichem)

Sodyum Klorür (Sigma)

Bakto Agar (Applichem)

Kanamisin (Gibco)

E.coli JM109 kompetan Hücre

Wizard DNA Pürifikasyon Kiti (Promega)

3.1.3. HeLa ve COS7 Hücrelerinde Transfeksiyon

Fugene HD (Roche) transfeksiyon ajanı

pcDNA3.1

pcDNA3.1 - GFP

pcDNA3.1 - Pyrin-GFP

pcDNA3.1 - myc-Pyrin
 pcDNA3.1 - myc-PyrinM694V
 pcDNA3.1 - myc-PyrinM680I
 pcDNA3.1 - myc-PyrinV726A
 pcDNA3.1 - ASC-YFP
 pcDNA3.1 - PSTPIP1-GFP
 pcDNA3.1 - flag-PSTPIP1A230T

* Vektörler Michigan Üniversitesi Hücre ve Gelişimsel Biyoloji Bölümü, Dr. Deborah Gumucio tarafından hediye edilmiştir.

3.1.4. İmmüno Floresan Boyama

Paraformaldehit (PFA) (Sigma)

1X PBS (*Phosphate buffered saline*) (pH 7,4) :

NaCl (Carlo Erba)	14 mM
KCL (Carlo Erba)	3 mM
KH ₂ PO ₄ (Carlo Erba)	0,9 mM
NaHPO ₄ (Merck)	6,4 mM

Triton X-100 (Sigma) :	% 0,2 / PBS (h/h)
Keçi Serumu (Sigma) :	% 10 / PBS (h/h)
Dana serum albumini (Sigma) :	% 10 / PBS (a/h)
Tween 20 (Sigma) :	% 0,1 / PBS (h/h)

Birincil Antikorlar:	Fare monoklonal anti-insan α -tübülin (Sigma)
	Fare poliklonal anti-insan Pyrin (Abnova)
	Tavşan poliklonal anti-myc (Sigma)
	Fare monoklonal anti-flag (Sigma)

Floresan İşaretli İkincil Antikorlar:	Keçi Anti-Tavşan AF488 (Molecular Probes)
	Keçi Anti-Fare AF568 (Molecular Probes)
	Keçi Anti-Fare AF488 (Molecular Probes)

Falloidin-AF488 (Invitrogen)

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

ProLong Antifade Kit (Molecular Probes)

3.1.5. RNA Eldesi

Dietil pirokarbonat (DEPC) (Sigma)

Trizol Reagent (Invitrogen)

Kloroform (Sigma)

Etanol (Riedel)

3.1.6. cDNA Sentezi

Reverse Transcriptase Tampon 5X (Qiagen)

Reverse Transcriptase (Qiagen)

Genomic DNA wipe out Tampon 7X (Qiagen)

Oligo dT primer

RNaz içermeyen su

3.1.7. Gerçek Zamanlı PZR

Jump-start SYBR Green karışımı:
(2X) (Sigma)

20 mM Tris-HCL, pH 8.3,
100 mM KCl, 0,4 mM dATP,
0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP,
0,4 mM dTTP, Stabilizatör,
0,05 U / µl Taq DNA polimeraz,
Jump Start Taq antibody,
SYBR Green I boyası

MgCl₂ (Sigma)

25 mM

3.1.8. Mikrodizin Sistemi

GeneChip[®] 3' IVT Express Kiti (Affymetrix)

Poly-A RNA kontrol

Poly-A kontrol seyreltme tamponu

İlk zincir tampon karışımı
 İlk zincir enzim karışımı
 İkinci zincir standart tampon karışımı
 İkinci zincir enzim karışımı
 IVT Biotin işareti
 IVT İşaretleme tampon karışımı
 IVT Enzim karışımı
 RNA Bağlama boncukları
 aRNA Bağlama tamponu
 aRNA Yıkama solüsyonu
 aRNA Seyreltme tamponu
 Manyetik *stand*
 5X Fragmentasyon tamponu
 Kontrol Oligo B2
 20X Hibridizasyon solüsyonu

GeneChip[®] Hibridizasyon, Yıkama ve Boyama Kiti (Affymetrix)

Pre-Hibridizasyon karışımı
 2X Hibridizasyon solüsyonu
 DMSO (dimetil sülfoksit)
 Boyama karışımı-1
 Boyama karışımı-2
 Array yükleme tamponu
 Yıkama tamponu-A
 Yıkama tamponu-B

GeneChip[®] Hibridizasyon fırını 645

GeneChip[®] Fluidics istasyonu 450

GeneChip[®] 3000 Scanner 7G

GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında, maymun fibroblast benzeri COS7, insan rahim serviks epiteli kanser hücreleri HeLa ve insan monosit öncülü THP-1 hücre hatları kullanılmıştır. COS7 ve HeLa hücreleri aderen hücreler olup, haftada 2-3 defa pasajlanarak % 10 oranında ısı ile inaktive edilmiş FBS, % 1 glutamin ve % 1 streptomisin/penisilin içeren DMEM besiyeri içerisinde çoğaltıldı. Pasajlama öncesinde hücreler Tripsin-EDTA ile kültür kaplarından kaldırıldı. THP-1 hücreleri ise, süspanse hücrelerdir. Bu haliyle monositlere benzeyen hücreler, % 10 oranında ısı ile inaktive edilmiş FBS, % 1 glutamin ve % 1 antibiyotik (streptomisin/penisilin) içeren RPMI besiyeri içerisinde, haftada 2 kez pasajlanarak çoğaltıldı.

THP-1 hücreleri normalde süspanse haldedir ve pre-monosit olarak sınıflandırılırlar. THP-1 hücrelerinin farklılaşması ve makrofaj haline gelmesi için hücrelere farklılaştırma protokolü uygulanması gerekmektedir (42). Bu çalışmada THP-1 hücreleri bir DAG (diaçilgliserol) türevi olan PMA (forbol miristol asetat) ile farklılaştırılmıştır. 200 nM derişimde PMA içeren besiyerinde 3 gün inkübasyonun ardından, 4 gün boyunca normal besiyerinde inkübe edilen THP-1 hücreleri makrofaj benzeri özellik kazanmıştır.

3.2.2. Mikrotübül Yapısını Bozmayan Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan 3 farklı hücre hattı için, farklı derişimlerde (HeLa ve COS7 hücreleri için 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 ve 100; THP-1 hücreleri için 100, 150, 200, 250, 500 ve 1000 ng/ml) kolşisin içeren besiyerlerinde $\sim 5 \times 10^4$ hücre inkübe edildi. 24 saat inkübasyonun ardından her bir örnek % 4'lük paraformaldehit çözeltisi ile fikse edildi. Bu örneklerde hücre iskelet elemanlarından aktin iskeletini görüntülemek için, falloidin-AF488 ile kemifloresan boyama, mikrotübülleri görüntülemek için ise, fare anti-tübülin antikoru ile immünfloresan boyama yapıldı. Örnekler hücre çekirdeği ve hücre iskeleti bütünlüğü açısından *Leica* IM50 floresan mikroskopu altında incelendi.

3.2.3. Vektör Kasetlerinin Çoğaltılması

Tez çalışmasında kullanılan tüm vektör kasetleri (flag-ASC, ASC-YFP, myc-pyrin, myc-pyrinM694V, myc-pyrin M680I, myc-pyrinY688X, myc-pyrinV726A, PSTPIP1-GFP ve flag-PSTPIP1A230T dizilerini içeren CMV (sitomegalovirüs) promotor bölgesine sahip ökaryotik ekspresyon vektörleri) transformasyon ile *E. coli* JM109 kompetan hücrelerine aktarıldı. Bu vektör kasetlerini içeren koloniler seçilerek Promega Wizard DNA Purifikasyon Kiti ile plasmid DNA'ları izole edildi. Elde edilen plasmidlerin *Nano Drop ND-1000* (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak miktar ve saflık tayini gerçekleştirildi.

3.2.4. COS7 ve HeLa Hücrelerinde Transfeksiyon

Kolşisinin, pyrin ve pyrin ile ilişkili proteinlere olan etkisini incelemek amacı ile kuyu başına $\sim 5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde zeminine lamel yerleştirilmiş 6'lı hücre kültürü kapları içinde, CMV promotor bölgesine sahip ökaryotik ekspresyon vektörleri, ticari olarak satılan bir transfeksiyon ajanı (FUGENE HD, Roche) ile transfekte edildi. Transfeksiyon için, transfekte edilecek vektör (1000 ng), 6 μ l *Fugene HD* ile 100 μ l DMEM içerisinde hücre kültürü kabininde yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından bu transfeksiyon karışımı antibiyotiksiz besiyeri içerisinde hücrelere verildi. 6 saat boyunca % 5 CO₂, 37⁰C'de inkübasyonun ardından hücreler taze besiyeri veya kolşisin içeren besiyeri içerisinde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. En son aşamada % 4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilen hücreler, 1X PBS ile yapılan yıkamanın ardından yine 1X PBS içerisinde 4⁰C'de saklandı.

3.2.5. Canlı Hücre Görüntüleme

Hücrelerin deney sistemindeki inkübasyon süresi boyunca görüntülenmesi *Leica Application Suite* (AF6000) programı yardımı ile canlı hücre görüntüleme aparatı altında gerçekleştirildi. Transfekte COS7 hücrelerinde, GFP (Yeşil Floresans Protein) kaynaklı floresan takip edilerek 488 nm dalga boyundaki ışık altında, 15 dakikada bir resim çekilirken, THP-1 hücrelerinde 20 dakikada bir faz-kontrast merceği altında resim çekildi. Çekilen resimler *Movie Maker* programı kullanılarak

kısa videolar haline getirildi. Bu teknik sayesinde retiküler fibril oluşum süreci ve kolşisinin hücre iskeleti ile ilgili yapılara olan etkisi gözlemlenebildi.

3.2.6. İmmünofloresan Boyama

Tez çalışmasında, Pürin ve ilişkili proteinlerin hücre içerisindeki yerleşimlerini görmek amacıyla immünofloresan boyama gerçekleştirildi. İlk olarak, 1X PBS içerisinde bekletilen hücreler, hacimce % 0,2'lik TritonX-100/PBS çözeltisi ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve hücre zarının geçirgen hale gelmesi sağlandı. Bir sonraki aşamada hücreler, % 10 keçi serumu, % 10 sığır serum albumini ve % 0,1 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile bloke edildi. Hücreler birincil antikolar ile 1:1000 seyreltme oranıyla 2 saat inkübe edildikten sonra % 0,1 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 3 kez yıkandı. Uygun ikincil antikoların 1:1000 seyreltme oranı ile 2 saatlik inkübasyonun ardından tekrar % 0,1 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile yıkanan hücrelere çekirdeklerin görüntülenmesi için 1 dakika süreyle DAPI boyaması yapıldı. En son aşamada lamellerin üzerine *mounting medium* damlatıldı ve lamaların üzerine kapatıldı. Hazırlanan preparatlar *Leica IM50* floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenip değerlendirildi.

3.2.7. THP-1 Hücrelerinden RNA Eldesi

24 saat boyunca 100 ng/ml kolşisinin içeren besiyeri içerisinde inkübe edilen THP-1 hücrelerinden (her bir kuyu içinde $\sim 1 \times 10^6$ hücre) RNA eldesi gerçekleştirildi.

RNA eldesinde kullanılan tüm malzemeler % 1 DEPC ile muamele edilmiş distile sudan geçirilerek RNaz enziminin inhibe edilmesi sağlandı. RNA eldesi için aşağıda verilen yöntem kullanıldı:

- -80°C'den çıkarılan örnekler eriyene kadar buz üzerinde bekletildi.
- Üzerine 200 µl kloroform eklendi ve karıştırıldı.
- 4°C'de 12.000 g'de 15 dk santrifüj edildi.
- Üst faz steril 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı.
- Yeni tüpe aktarılan faza 750 µl saf etanol eklendi ve karıştırıldı.
- -20°C'de 30 dk bekletildi.

- 4°C’ de 12.000 g’de 10 dk santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
Pellet üzerine 750 µl, %75’lik etanol eklendi.
- 4°C’ de 7.500 g’de 5 dk santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
- Kalan etanolün uçması için, pellet, 60°C’de inkübe edildi ve üzerine önceden DEPC ile muamele edilmiş sudan eklenerek RNA’nın çözülmesi sağlandı.
- İzole edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.

3.2.8. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için *Quantitect* (Qiagen) kiti kullanılarak iki ayrı karışım hazırlandı.

Karışım I:	RNA	1 µg
	gDNA <i>wipeout</i> tampon (7X)	2 µl
	RNaz’sız dH ₂ O	14 µl’ye tamamlandı
	TOPLAM:	14 µl

Karışım I hazırlandıktan sonra RNA örnekleri 42°C’de 5 dk denatüre edildi ve inkübasyondan sonra örnekler buz üzerine alındı ve bu sırada karışım II hazırlandı.

Karışım II:	Reaksiyon Tamponu (5X)	4 µl
	<i>Reverse transkriptaz</i>	1 µl
	Primer (0,5µg)	1 µl
	TOPLAM:	6 µl

Karışım II, karışım I’e eklendi ve örnekler, *Amplification PCR System 9700 Applied Biosystems’* cihazında 42°C 30 dk ve 95°C 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlandı. Sentez sonrası örneklere, 60 µl dH₂O eklenerek hacim 80 µl’ye çıkarıldı ve örnekler -20°C’de saklandı.

3.2.9. Gerçek Zamanlı PZR

Tez çalışmasında, kolşisinin Pyrin ve ilişkili proteinlerin ifadesine olan etkisi mRNA düzeyinde araştırılırken gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanıldı.

Gerçek zamanlı (*Real-Time*) polimeraz zincir reaksiyonu, cDNA'ya dönüştürülen RNA molekülünün enzimatik tepkime ile in-vitro çoğaltılması temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde kantitasyon, reaksiyon sırasında oluşan ürüne bağlanan boya ile birlikte artan floresan ışımının ölçülmesi sayesinde yapılır. Tez çalışması kapsamında yapılan gerçek zamanlı PZR deneylerinde *SYBR Green I* floresan boya kullanıldı. Boya, her bir reaksiyon döngüsünde meydana gelen çift iplikli DNA ürününün küçük oluşuna bağlanarak ışımaya vermektedir. Reaksiyon sırasında meydana gelen ürünün artışına doğru orantılı olarak, DNA - boya kompleksi meydana gelir ve orantılı olarak floresan ışımaya artmaktadır.

Gerçek zamanlı PZR Koşulları:

2X <i>SYBR Green</i> karışımı	5 µl
25 mM MgCl ₂	1,2 µl
<i>Forward</i> primer (10 pmol/ µl)	0,4 µl
<i>Reverse</i> primer (10 pmol/ µl)	0,4 µl
cDNA	2,0 µl
Distile su	1 µl
TOPLAM:	10 µl

10 µl RT-PZR reaksiyonu *Rotor-Gene 6000 (Qiagen)* cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

94°C'de	2 dk	} 40 döngü
94°C'de	5 sn	
59°C'de	20 sn	

Deneylelerdeki değişkenlere bağlı olarak meydana gelen ifade değişimleri göreceli ($\Delta\Delta C_t$ yöntemi) kantitasyon ile *Rotor Gene 6000 Software* kullanılarak hesaplandı. İfade değişimleri hesaplanırken, *ACTB* (insan beta-aktin geni) gen ifadesi, normalizatör olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan primer çiftlerinin özellikleri tablo 3.1'de verilmiştir. (Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR sonuçları EK-CD'de verilmiştir)

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan primer çiftleri ve özellikleri.

Gen adı	Transkript no	Primer dizileri (5'-3')	Tm	Amplikon boyu (bp)
ACTB	NM_001101.3	F: CGCAAAGACCTGTACGCCAAC	64,84	164
		R: GAGCCGCCGATCCACACG	66,28	
MEFV (1)	NM_000243.2	F: TGGACTCGGCAACAGAACC	62,66	162
		R: CGTCAACTGGGTCTCCTTCC	62,66	
MEFV (2)	NM_000243.2	F: GGGAGGAGAAGGCAGTGAG	61,85	192
		R: AGCAGGGCGATGTCCTGGG	67,11	
PSTPIP1	NM_003978.3	F: GCAGCATAGACGCCGACATC	64,10	178
		R: CTCCGTGCAGCAGTCCAG	63,71	
ASC	NM_013258.4	F: CTCTACCTGGAGACCTACG	58,79	183-240
		R: CGGTGCTGGTCTATAAAGTG	58,53	
SIVA	NM_006427.3	F: TGCCTGCGAGCCGTGGATG	68,74	193
		R: GCTTGAGCCAGCCTCAGGTCTC	67,62	
PSTPIP2	NM_024430.3	F: CACATTCAGCTTGCACAGAG	59,95	194
		R: TCTGCCTCATCTTTGTCCC	59,48	
TNS1	NM_022648.4	F: ACCTGCTGTTCAACCTCTC	59,73	206
		R: GACAACCTCTATCCTGCCTC	59,71	
CTNNB1	NM_001098209.1	F: CCATTACAACCTCCACAACC	59,05	193
		R: ACCACTAGCCAGTATGATGAG	59,17	
DAAM1	NM_014992.1	F: AACTGCCCGAGAACAAACTG	61,30	210
		R: GCTCTCCGACCATCAATCAC	61,01	
FLNB	NM_001164317.1	F: CTCTCAAACCCAACTCAACC	59,53	146
		R: GTCCTCAACAAACACCATCAC	59,88	
FMNL1	NM_005892.3	F: ATGAACTTCCGTGTCTTCCCT	59,13	167
		R: TTCTTGGTCTCTGTGTCCTC	59,14	
FMNL2	NM_052905.3	F: TCAAGCAAACAGAAGATACCAC	59,09	177
		R: CAAGCATTCCACAAAGTCCA	59,15	
LPXN	NM_001143995.1	F: CACTTCTTCTGCTCTCACTG	58,39	187
		R: ACAAACAAAGCACTCTGGG	58,65	
PALLD	NM_001166108.1	F: CCAACTTCATATCTCTGCCGA	60,08	174
		R: GATTCACCTCCCTTGCCGA	60,17	
TLN1	NM_006289.3	F: ACACCATCCTAACCGTCAC	59,49	150
		R: AGTTCTCCAGATCACTTTCCC	59,59	
RND3	NM_005168.3	F: AGGCAACATCAATGAAGGAG	58,34	177
		R: CTGTAGGAACGTAATTCTCGG	58,40	
TLR1	NM_003263.3	F: AGGATAACAAAGGCATATTGGG	58,66	230
		R: GTCTTTAGGAACGTGGATGAG	58,59	
TLR5	NM_003268.5	F: ATTCTCTGCCTCAGCCTC	59,56	112
		R: CTGGTTTGGTACTGTGGA	59,94	
TLR7	NM_016562.3	F: TCAACCAGACCTTACATTCC	59,31	213
		R: TTCTGTCAAATGCTGTCTGTG	59,88	
TLR8	NM_138636.4	F: TGGTTCTCTTGACACTTCAGT	59,38	145
		R: TTAGTCTCCTTTCCCAGGCT	60,38	

3.2.10. Mikrodizin Sistemi

Tez çalışmasının bu bölümünde, THP-1 hücrelerinde 100 ng/ml derişimdeki kolşisinin transkriptoma olan etkisini incelemek amacı ile *Affymetrix* firmasının mikrodizin sistemi kullanıldı. Sistem 9 aşamadan oluşmaktadır:

- Poly-A RNA kontrolleri hazırlama
- Tek zincir cDNA sentezi
- Çift zincir cDNA sentezi
- In-vitro transkripsiyon ile işaretli aRNA sentezi
- aRNA saflaştırılması
- aRNA miktar tayini
- Fragmentasyon
- Hibridizasyon
- Yıkama-boyama-tarama

Poly-A RNA Kontrollerini Hazırlama

Poli-A RNA kontrolleri, total RNA ile birlikte amplifiye olup işaretlenmektedir. Kontroller sayesinde *GeneChip* arraylerin hibridizasyon yoğunlukları denetlenmekte, bu ise başlangıçtaki RNA kalitesinden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Kit içerisinde bulunan Poly-A kontrol RNA ve seyreltme tamponu kullanılarak uygun seri seyreltme tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo. 3.2. Poly-A RNA kontrol örneğın seri seyreltmesi

Başlangıç miktarı	Seri Seyreltme				4.üncü seyreltmeden alınacak miktar
	Birinci seyreltme	İkinci seyreltme	Üçüncü seyreltme	Dördüncü seyreltme	
100 ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 µl

Çalışmaya alınan örneklerin (total RNA 100 ng olarak) *poly-A* seyreltmesi:

- Birinci seyreltme hazırlarken 38 μ l Poly-A seyreltme tamponu üzerine 2 μ l Poly-A kontrol RNA eklendi ve karışımları sağlandı (1:20).
- İkinci seyreltme hazırlarken ilk seyreltmeden 2 μ l çekerek yeni tüpte 98 μ l Poly-A seyreltme tamponu ile karıştırıldı (1:50).
- Üçüncü seyreltme hazırlarken ikinci seyreltmeden 2 μ l çekerek yeni tüpte 98 μ l Poly-A seyreltme tamponu ile karıştırıldı (1:50).
- Dördüncü seyreltme hazırlarken üçüncü seyreltmeden 2 μ l çekerek yeni tüpte 18 μ l Poly-A seyreltme tamponu ile karıştırıldı (1:10).
- Dördüncü seyreltmeden 2 μ l çekilip 100 ng olan total RNA'ya eklendi.

Tek Zincir cDNA Sentezi

İlk olarak tek zincir karışımı hazırlandı:

İlk zincir standart tampon karışımı	4 μ l
İlk zincir enzim karışımı	1 μ l
Toplam:	5 μ l

- Total RNA/poly-A Kontrol karışımı (5 μ l), ana karışıma eklendi. Son hacmin 10 μ l olması sağlandı.
- Örnekler *thermal cycler* cihazında 42 °C'de 2 saat inkübe edildi.

Çift Zincir cDNA Sentezi

Ana karışım:

İkinci zincir standart tampon karışımı	5 μ l
İkinci zincir enzim karışımı	2 μ l
RNaz'sız dH ₂ O	13 μ l
Toplam:	20 μ l

- Çift zincir karışımı, Her cDNA örneğine 10 µl olacak şekilde buz üzerinde dağıtıldı.
- Hazırlanan reaksiyon karışımı 16 °C’de 1 saat ve 65 °C’de 10 dakika inkübe edildi.

In-vitro Transkripsiyon (IVT) ile İşaretli aRNA Sentezi

IVT karışımı:

IVT Biotin işareti	4 µl
IVT İşaretleme tamponu	20 µl
IVT Enzime karışımı	6 µl
Toplam:	30 µl

- Hazırlanan karışımı her bir çift zincir cDNA örneğine (20 µl) buz üzerinde eklendi.
- Reaksiyon karışımı 40 °C’de 16 saat inkübe edildi.

aRNA Saflaştırılması

aRNA Bağlama karışımı:

RNA Bağlama boncukları	10 µl
aRNA Bağlama tamponu	50 µl
Toplam:	60 µl

- Hazır halde olan 60 µl aRNA bağlama tamponu, 60 µl örneğin üzerine eklendi (120 µl).
- Her örneğe 120 µl saf etanol eklendi (240 µl). Pipetaj yaparak iyice karıştırıldı. Bu süre içinde örnekteki aRNA’lar RNA bağlama boncuklarına tutundu.

- Tüpler magnetik *standa* yerleştirilip, 5 dakika RNA'ların boncuklara bağlanması için beklendi. Bağlanma tamamlandığında karışım şeffaf hale geldi.
- Tüpdeki sıvı tam olarak şeffaflaşınca boncuklara zarar vermeden süpernatant atıldı.
- Daha sonra 100 µl aRNA yıkama solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyondan sonra süpernatant atıldı ve tüpler vorteks yardımı ile karıştırıldı.
- 50 µl aRNA elüsyon tamponu eklenip karıştırıldı. Örnek magnetik standa geçirildi ve şeffaflaşmaya kadar ~ 5 dakika bekletildi.

aRNA Miktar Tayini

Saflaştırılmış aRNA'ların derişimi NanoDrop Spektrofotometre ile ölçüldü.

Fragmentasyon

Fragmentasyon Reaksiyonu:

aRNA	15 ug
5x Fragmentasyon tamponu	8 µl
RNaz'sız dH ₂ O	40 µl'ye tamamlayacak şekilde
Toplam:	40 µl

- Fragmentasyon reaksiyonu 94°C'de 35 dakika inkübe edildi ve % 2'lik agaroz jelde yürütülerek fragment boyutu kontrol edildi.

Hibridizasyon

Hibridizasyon karışımı:

Fragmente olmuş işaretli aRNA	12,5 µg
Kontrol oligonükleotid B2 (3 nM)	4,2 µl
20X Hybridization kontrol (bioB, bioC, bioD, cre)	12,5 µl

2X Hybridization karışımı	125 µl
DMSO	25 µl
RNaz'sız dH ₂ O	50 µl
Toplam:	250 µl

- Hibridizasyon karışımı 99°C'de, 5 dakika ve 45°C'de, 5 dakika inkübe edildi. Aynı anda çiplere pre-hibridizasyon karışımı yüklendi ve 45°C'de 60 rpm'e getirilmiş hibridizasyon fırınında 10 dakika inkübe edildi.
- Örnekler çiplere yüklendi ve 45°C'de, 16 saat, 60 rpm hızında çalkalama sağlayan hibridizasyon fırınında inkübe edildi.

Yıkama-Boyama-Tarama

Hibridizasyon sonrası çip boşaltıldı ve yerine *Array* yükleme tamponu dolduruldu. Yıkama ve boyama için kit içindeki boyama karışımı-1, boyama karışımı-2 ve *Array* yükleme tamponu sırasıyla 600µl-600µl-800µl miktarlarında tüplere alındı ve yıkama istasyonunda uygun yerlere yerleştirildi. Sistem bilgisayarı kontrolünde tüm aşamalar 90 dakikada tamamlandı.

Son aşamada çipler, yine sistem bilgisayarı ile kontrol edilen tarayıcıya yerleştirildi ve sonuçlar ham veri şeklinde elde edildi.

3.2.11. Verilerin Değerlendirilmesi

İmmünfloresan boyama yapılan örnekler değerlendirilirken, hazırlanan tüm preparatlarda 500'er sağlıklı hücre sayıldı.

Gerçek zamanlı PZR deneylerinin sonuçları *Rotor Gene Software* programı ile değerlendirildi. Bu deneylerin hepsi 3'lü biyolojik tekrarlar şeklinde yapıldı ve istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

Tez çalışmasındaki grafiklerin çizilmesi ve istatistiksel analizlerin yapılması için *GraphPad Prism* programı kullanıldı. Analiz sonucu elde edilen p değeri 0.05'den küçük olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Mikrodizin çalışmasının ham verileri *Affymetrix Expression Console* ile analiz edildikten sonra, ifade değişiklikleri PARTEK programı yardımı ile hesaplandı. Yolak analizi için ise, NIH-DAVID sunucuları kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Mikrotübül Organizasyonunu Bozmayan Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi

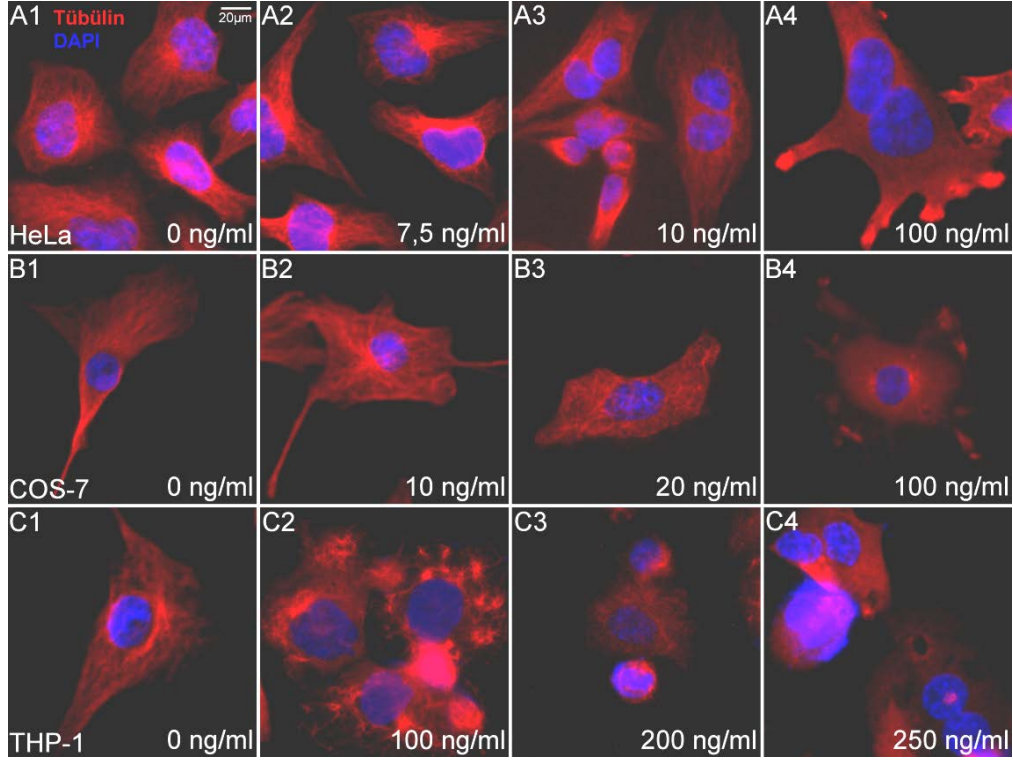
Kolşisinin mikrotübül polimerizasyonunu engelleyen bir ajan olduğu bilinmektedir (43). Tez çalışmasında, öncelikle kolşisinin mikrotübülleri bozmadan protein etkileşimlerine ve gen ifadesine olan etkisini inceleyebilmek için, kullanılacak hücre hatlarında (HeLa, COS7, THP-1) mikrotübül mimarisini bozmayan kolşisin derişimlerini belirlemek amaçlanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan her bir hücre hattı, yöntemler kısmında belirtilen derişimlerde kolşisin içeren besiyerlerinde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında fikse edilen hücrelere, anti-tübülin antikoru kullanılarak immünfloresan boyama yapıldı ve mikrotübül yapısı incelendi. Bu çalışmaların sonucuna göre, mikrotübül yapısını bozmayan en yüksek kolşisin derişimleri: HeLa hücreleri için 7,5 ng/ml, COS7 hücreleri için 10 ng/ml ve THP-1 hücreleri için 150 ng/ml olarak saptandı. Bu derişimlerin üzerinde kolşisinin mikrotübül yapısını bozduğu ve çok çekirdekli hücrelerin meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.1).

Hücre iskeletinin mikrotübüllere kıyasla daha dinamik yapıtaşları olan aktin filamentleri de kolşisin uygulaması sonrası görüntülendi. Aktin iskeletinin görüntülenmesi için hücreler falloidin-AF488 ile boyandı. HeLa ve COS7 hücrelerinde aktin iskeletinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. Buna karşın, kolşisinin THP-1 hücrelerinde aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesine sebep olduğu gösterildi.

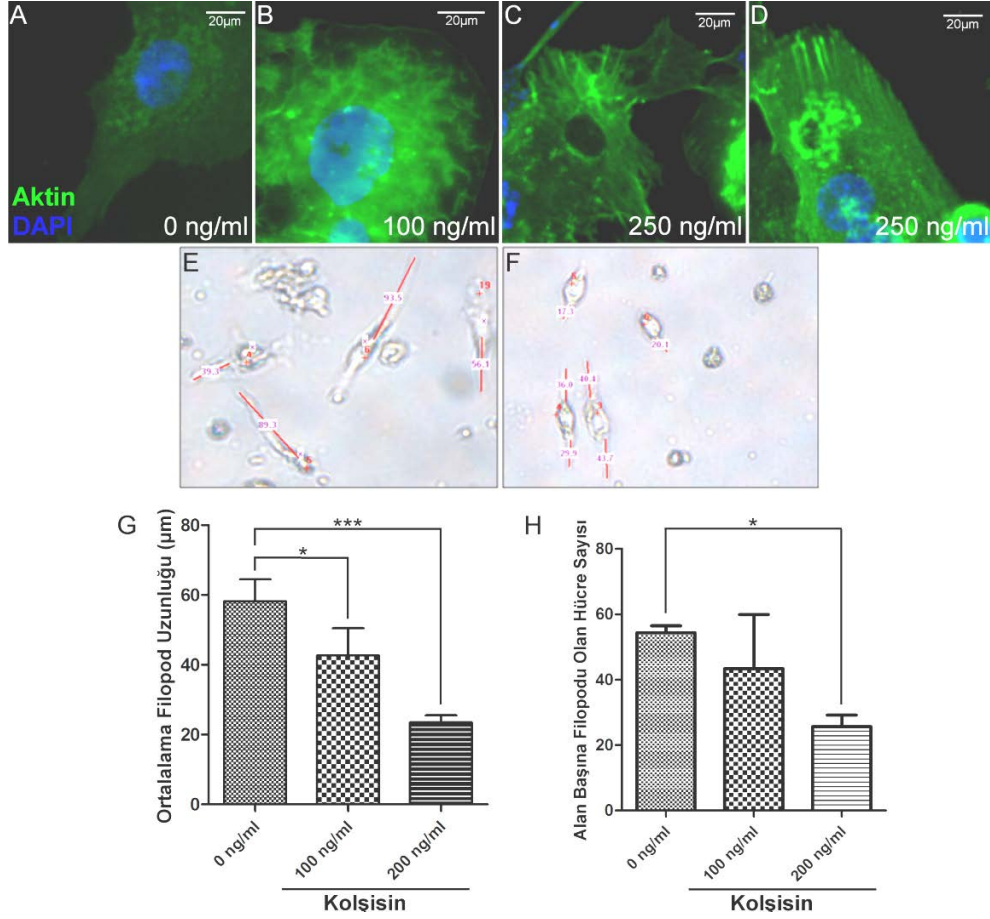
4.1.1. Kolşisin Uygulamasının THP-1 Hücrelerinde Aktin İskeletine Olan Etkisi

Yukarıda belirtildiği gibi, THP-1 hücreleri için mikrotübülleri bozmayan en yüksek kolşisin derişimi 150 ng/ml olarak belirlendi. Bu derişimin üzerinde kolşisin içeren besiyerinde 24 saat inkübe edilen THP-1 hücrelerinde aktin iskeleti elemanlarının stres fibril yapılarını oluşturduğu saptandı (Şekil 4.2 C ve D). Aktin iskeletindeki yeniden düzenlenmenin bir göstergesi olan stres fibril yapılarının kontrol grubundaki hücrelerde ve daha düşük derişimde (100 ng/ml) kolşisin uygulanan THP-1 hücrelerinde oluşmadığı belirlendi (Şekil 4.2 B).



Şekil 4.1. Farklı derişimlerdeki kolşisinin hücre hatlarına etkisi. A1: Kontrol, A2: 7,5 ng/ml, A3: 10 ng/ml, A4: 100 ng/ml kolşisin uygulanan HeLa hücreleri, B1: kontrol, B2: 10 ng/ml, B3: 20 ng/ml, B4: 100 ng/ml kolşisin uygulanan COS7 hücreleri. C1: Kontrol, C2: 100 ng/ml, C3: 200 ng/ml, C4: 250 ng/ml kolşisin uygulanan THP-1 hücreleri.

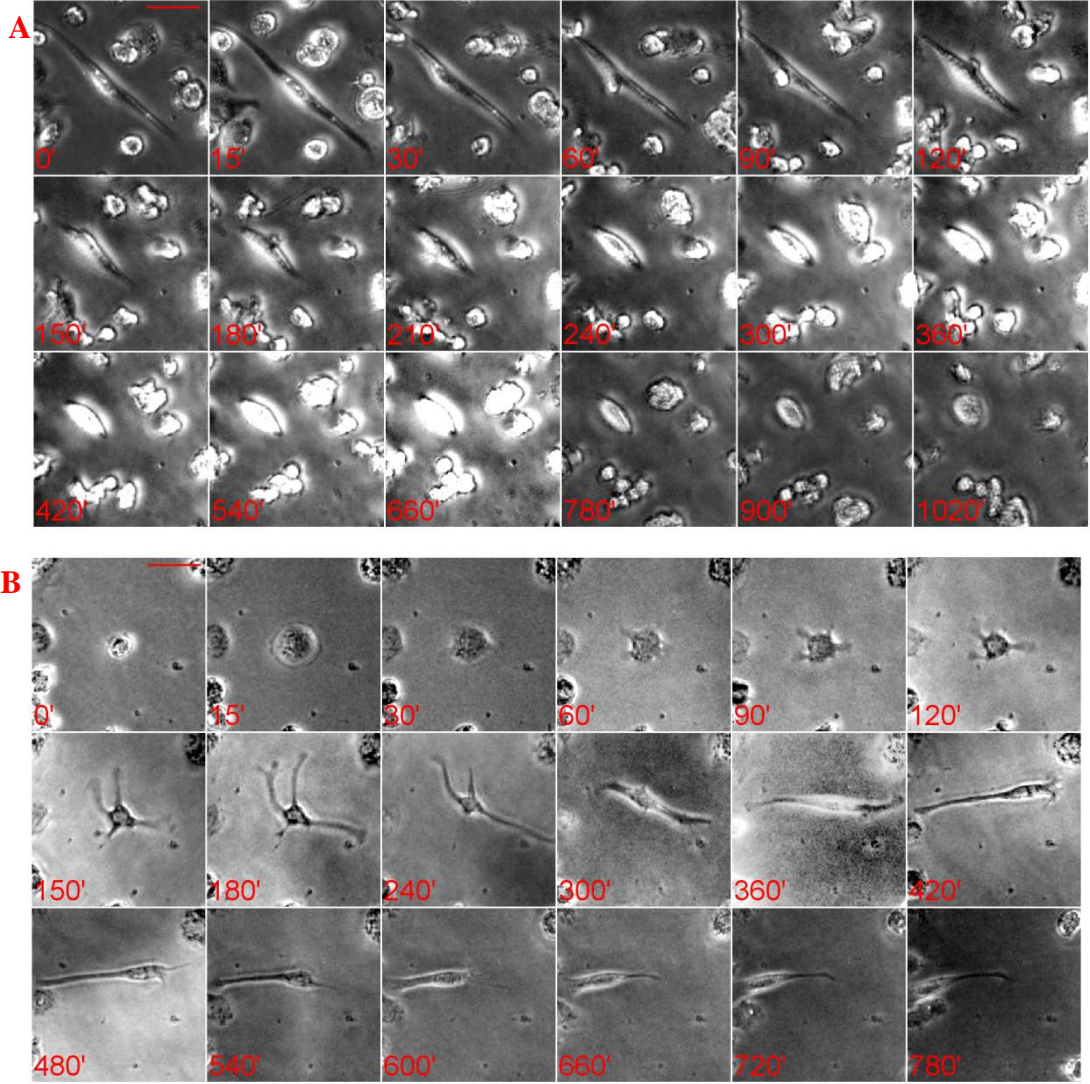
Ayrıca, kolşisin uygulaması sonrasında; makrofajların karakteristik uzantıları olan filopodların hem sayısında bir azalma hem de boylarında bir kısalma meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.2 E-H). Filopodların oluşumunda polimerize aktin filamentlerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu bulgu, kolşisin uygulamasının aktin iskeletini yeniden düzenlenmeye götürdüğü sonucunu desteklemektedir.



Şekil 4.2. Farklı derişimlerde kolşisin ile inkübe edilen THP-1 hücrelerindeki aktin iskeleti yapısı. A: kontrol, B: 100 ng/ml, C ve D: 250 ng/ml kolşisin uygulanan THP-1 hücreleri. Beyaz bar = 20 µm. Kolşisin uygulamasının filopod uzunluğu ve sayısına etkisi (E-H). E, kontrol, F: 100 ng/ml kolşisin uygulanan THP-1 hücrelerinin filopod boylarının ölçümü. Farklı derişimlerde kolşisin uygulamasının filopod boyuna (G) ve filopod sayısına (H) olan etkisi. *p=0.0007, **p=0.0054.

Canlı hücre görüntüleme sistemi kullanılarak yapılan deneylerde, kolşisin uygulaması sonrası filopodlardaki kısılma süreci takip edildi. 100 ng/ml kolşisin içeren besiyerinde inkübe edilen bir THP-1 hücresinin 4 saat sonunda hücre uzantılarını tamamen kaybettiği görüntülendi (Şekil 4.3. A). Kolşisin içeren besiyeri uzaklaştırılıp, kültür kabının PBS ile yıkanmasından sonra normal besiyeri ile inkübe

edildiğinde THP-1 hücrelerinde filopod yapılarının yeniden oluşmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.3 B).

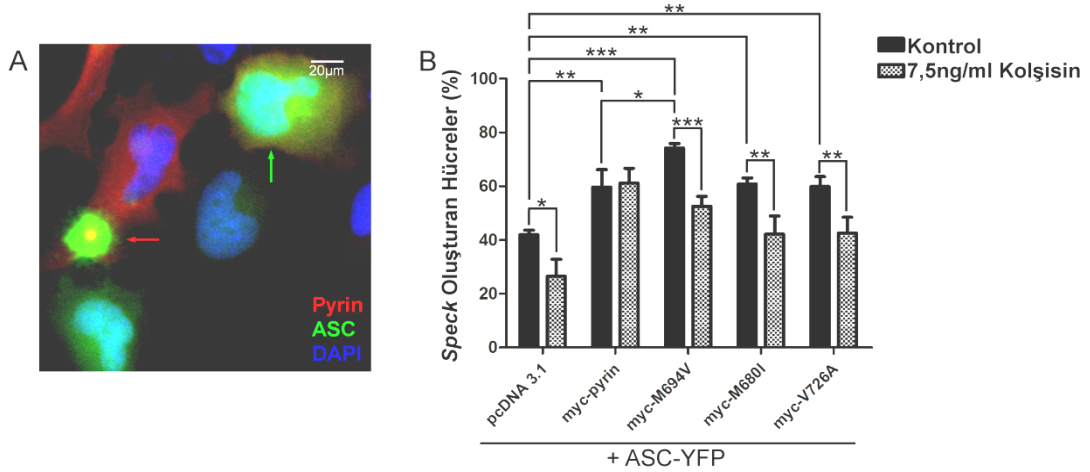


Şekil 4.3. Filopod yapısının kolşisinden geri dönüşümlü olarak etkilenmesi. A: 100 ng/ml kolşisin içeren besiyerindeki bir THP-1 hücresinin filopodlarında meydana gelen kısalma sürecinin canlı hücre görüntüleme tekniği ile gösterilmesi. B: Aynı kültür kabındaki bir hücrenin, kolşisin uzaklaştırıldıktan sonraki süreçte, filopod yapılarının yeniden oluştuğunun gösterilmesi (20X faz-kontrast mikroskopisi).

4.2. Kolşisinin *Speck* Oluşumuna Etkisi

ASC'nin *speck* adı verilen yapılar oluşturarak hücresele düzeyde inflamatuvar cevabın başlamasında önemli bir protein olduğu bilinmektedir. Tez çalışmasının bu bölümündeki amaç; AAA hastalarında yaygın görülen M694V, M680I ve V726A mutant Pyrin proteinlerinin *speck* oluşumu üzerine etkisinin kolşisin varlığında araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, HeLa hücreleri ASC-YFP füzyon proteinini kodlayan, bununla beraber *myc* sinyal dizisini içeren doğal Pyrin veya mutant formlarından birini kodlayan iki vektör ile transfekte edildi. Bu hücreler, kolşisin içeren veya içermeyen kültür ortamlarında 19 saat inkübe edildikten sonra anti-*myc* antikoru kullanılarak immünflorasan boyama yapıldı. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskopi ile incelendi.

Her iki vektör ile transfekte olmuş sağlıklı hücreler ASC proteininin yerleşimine göre “*speck* oluşturan” veya “yaygın sitoplazmik yerleşim gösteren” hücreler olarak iki grup altında değerlendirildi (Şekil 4.4 A). Bu çalışmanın sonucunda, Pyrin (hem normal hem de mutantlar için) ile transfekte edilen hücreler kontrol grubu (pc.DNA 3.1) ile karşılaştırıldığında *speck* oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği tespit edildi ($p < 0,001$). Bununla beraber, mutant Pyrin proteinlerinden sadece M694V mutant formu doğal Pyrin ile karşılaştırıldığında *speck* oluşumunda anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı ($p = 0,021$). Kolşisin tüm deney gruplarında *speck* oluşumunda azalmaya neden olurken ($p < 0,001$), doğal Pyrin varlığında ortamda kolşisin bulunmasının *speck* oluşumuna etki etmediği gösterildi ($p = 0,328$) (Şekil 4.4 B).



Şekil 4.4. Pyrin ve mutant Pyrin formlarının ASC ile *speck* oluşturma yüzdeleri ve kolşisinin bu oluşuma etkisi. A: myc-Pyrin ve ASC-YFP vektörleri ile birlikte transfekte edilmiş HeLa hücrelerinde *speck* oluşumları. Yeşil ok ile gösterilen hücrede hem ASC hem de Pyrin proteinleri sitoplazmik ifade gösterirken, kırmızı ok ile gösterilen hücrede ASC *speck* yapısı ve sitoplazmik myc-Pyrin ifadesi görülmektedir. B: myc-Pyrin/mutant myc-Pyrin ve ASC-YFP ile birlikte transfekte olmuş HeLa hücrelerine *speck* oluşumunun yüzdesi. Siyah bar çubukları kolşisin içermeyen hücrelerdeki *speck* oluşumunu, gri bar çubukları 7,5 ng/ml kolşisin içeren hücrelerdeki *speck* oluşumunu göstermektedir. Her bir preparatta transfeksiyona uğramış 500 hücre değerlendirmeye alınmıştır. Tüm deney setleri üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır (***) $p < 0.0001$, (***) $p < 0.001$, (*) $p < 0.01$).

4.3. Kolşisinin Retiküler Fibrillere Etkisi

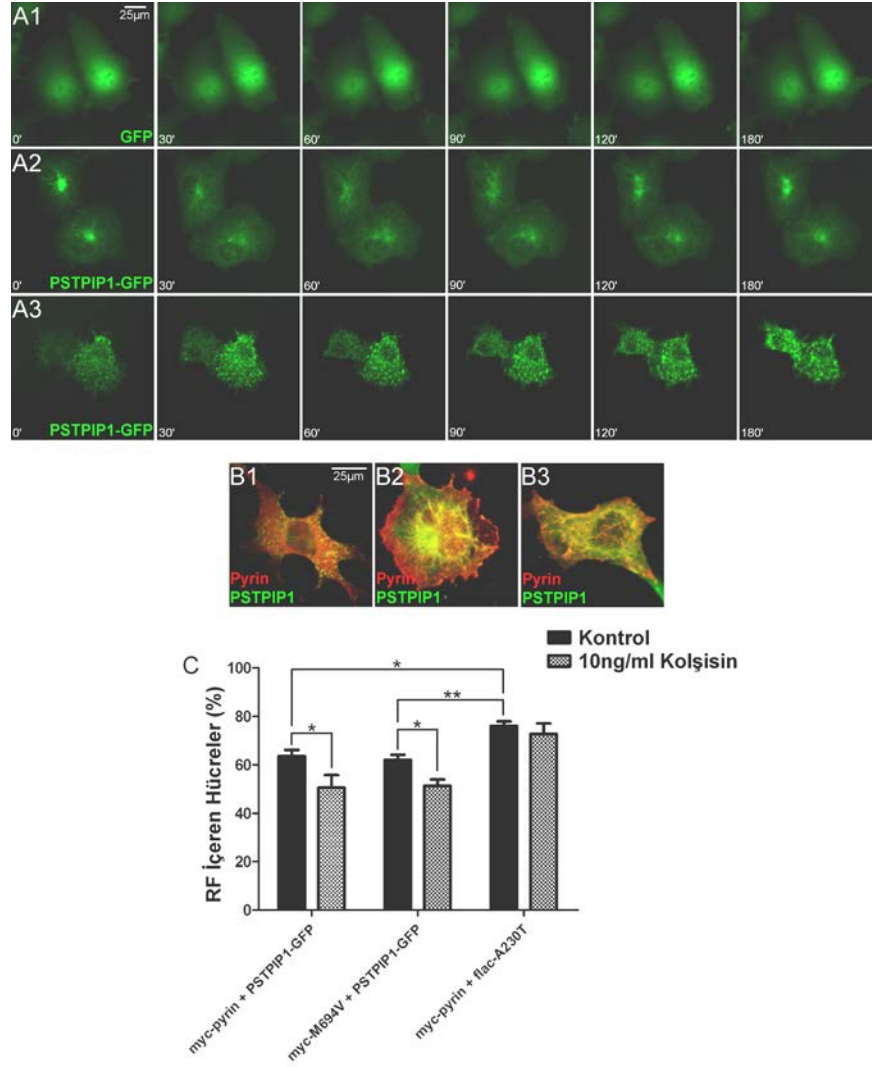
Tez çalışmasının bu bölümünde, mikrotübülleri bozmayan derişimde kolşisinin retiküler fibrillere olan etkisi COS7 hücrelerinde incelendi. İlk olarak, Pyrin ve PSTPIP1 proteinlerinin birlikte transfekte edildiğinde oluşturdukları bu yapının oluşum süreci canlı hücre görüntüleme tekniği ile belirlendi. myc-Pyrin ve PSTPIP1-GFP transfekte edilmiş COS7 hücreleri, 18 saat sonra floresan mikroskobu altında incelendi ve GFP kaynaklı yeşil renk görülen alanlar canlı hücre görüntülemesine alındı. Bu deney sonucunda, başlangıçta birikim şeklinde yerleşim

gösteren proteinlerin 4 saat içerisinde düzenli bir yapı kazanarak retiküler fibrilleri oluşturduğu tespit edildi (Şekil 4.5 A3).

PSTPIP1'in doğal ve transfekte hücrelerde filament şeklinde yerleşim gösterdiği bilinmektedir. Kolşisinin retiküler fibrillere olan etkisi incelenmeden önce, PSTPIP1 filamentlerine olan etkisi de incelenmelidir. Bu amaçla, PSTPIP1-GFP transfekte edilmiş COS7 hücrelerinin bir kısmına transfeksiyonun başlatılmasından sonra 6. saatte 10 ng/ml kolşisin içeren besiyeri verildi ve 18 saatlik inkübasyonun ardından hücreler değerlendirildiğinde, kolşisin uygulamasının PSTPIP1 filamenti oluşumuna herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü.

Kolşisinin retiküler fibrillere olan etkisini incelemek amacı ile COS7 hücreleri, myc-Pyrin ve flag-PSTPIP1 proteinleri ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 6. saatinde hücrelerin bir kısmı 10 ng/ml kolşisin içeren besiyeri ile inkübe edildi ve 18 saat sonra hücreler fikse edilerek immünfloresan boyama yapıldı. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu altında değerlendirildiğinde, Pyrin ve PSTPIP1 birlikte transfekte edilmiş ve kolşisin içermeyen besiyerindeki hücrelerin % 60'ında retiküler fibril yapısı olduğu saptandı (Şekil 4.5 C). Kolşisin içeren besiyerinde inkübe edilen hücrelerde bu oranın % 50'ye düştüğü gözlemlendi ($p < 0.001$).

Ayrıca, Pyrin ve PSTPIP1'in mutant olduğu durumlarda da aynı deney tekrar edilerek mutant proteinlerin retiküler fibril oluşumuna etki edip etmediği test edildi. Bu deneyin sonucunda, mutant Pyrin (M694V) ile normal Pyrin arasında retiküler fibril oluşum yüzdesi açısından bir fark tespit edilmezken, mutant PSTPIP1 (A230T) varlığında normal PSTPIP1'e göre retiküler fibril içeren hücre sayısında anlamlı bir artış olduğu görüldü (ortalama retiküler fibril yüzdesi % 77, ($p < 0.0001$)). Mutant Pyrin varlığında kolşisin uygulaması yapılan hücrelerde retiküler fibril oranında % 10 azalma meydana geldiği kaydedildi. Bunun yanı sıra, mutant PSTPIP1 varlığında kolşisinin retiküler fibril yapısı üzerinde bir etkisi olmadığı gösterildi (Şekil 4.5 C).



Şekil 4.5. A1, GFP; A2, PSTPIP1-GFP ve A3, myc-Pyrin ve PSTPIP1-GFP vektörleri ile transfekte edilmiş COS7 hücresinde canlı hücre görüntüleme. Retiküler fibril yapısının oluşumu A3'te görülmektedir. B'de ise Pyrin-PSTPIP1 transfeksiyonu sonrası oluşan yapılar: düzensiz agregat (B1), filamentler (B2) ve retiküler fibriller (B3). Kolşisin ve mutant proteinlerin varlığında retiküler fibril oluşturan hücre yüzdesi (C). Siyah bar çubukları kolşisin içermeyen, gri bar ise, 10 ng/ml kolşisin içeren besiyerindeki hücrelerde oluşan retiküler fibril yüzdelelerini göstermektedir. Her bir preparatta transfeksiyona uğramış 500 hücre değerlendirmeye alınmıştır. Tüm deney setleri üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır (**p < 0.001, *p < 0.01).

4.4. Kolşisinin Pysin-Siva2 Etkileşimine Etkisi

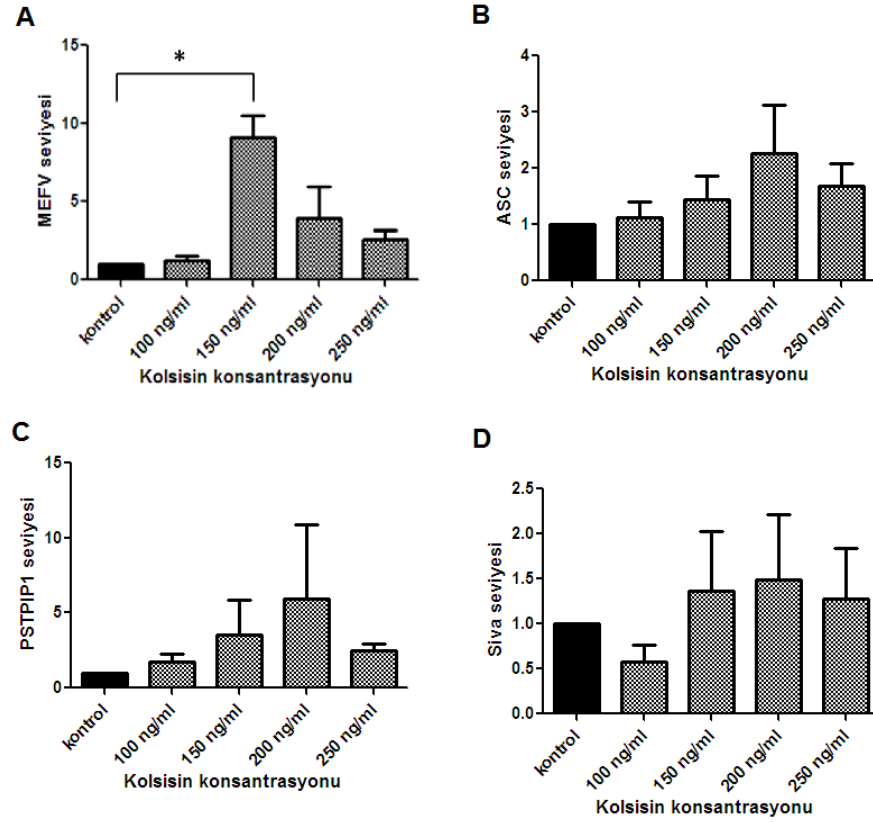
Pysin ile ilişkili proteinlerden bir tanesi de Siva'dır. Aynı genin alternatif kırılma mekanizması ile oluşan iki transkripsiyon ürününden birisi tarafından kodlanan Siva2, transfekte hücrelerde, hücre zarının hemen altında Pysin ile birlikte yerleşim göstermektedir (7).

Tez çalışmasının bu bölümünde, COS7 hücrelerine Pysin ve Siva2 transfeksiyonu yapıldıktan sonra, hücrelerin bir kısmı 10 ng/ml kolşisin içeren besi yerinde inkübe edilmiş ve kontrol grubu (kolşisin uygulaması yapılmayan) hücreler ile karşılaştırılmıştır. Bu deney sonucunda, kolşisin uygulamasının Pysin-Siva2 yerleşimi açısından herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir.

4.5. Kolşisinin Pysin ve İlişkili Proteinlerin Gen İfadesine Olan Etkisi

Kolşisinin Pysin ve ilişkili proteinleri kodlayan genlerin ifadesine olan etkisini incelemek amacıyla, bu genleri doğal olarak ifade eden THP-1 hücre hattı ile çalışıldı. *MEFV*, *PSTPIP1*, *ASC* ve *Siva* ifadesi kantitatif gerçek zamanlı PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile hem farklılaşmış hem de süspanse THP-1 hücrelerinde incelendi. Göreceli gen ifadesi analizinde ACTB (insan beta-aktin geni) normalizatör olarak kullanıldı.

Bu deneyler sonucunda, süspanse THP-1 hücrelerinde sadece bir derişimde kolşisin uygulamasının (150 ng/ml) *MEFV* ifadesini arttırdığı gözlemlendi. Pysin ile ilişkili proteinler *PSTPIP1*, *ASC* ve *Siva*'nın mRNA seviyelerinin ise kolşisin uygulamasından etkilenmediği saptandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Süspanse THP-1 hücrelerinde kolşisinin *MEFV* (a), *ASC* (b), *PSTPIP1* (c) ve *Siva* (d) ifadesi üzerine etkisi. Siyah bar, kontrol grubu, gri bar farklı derişimlerdeki kolşisin uygulanan hücrelerdeki gen ifadelerini göstermektedir. Tüm deney setleri üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır (* $p < 0.0001$).

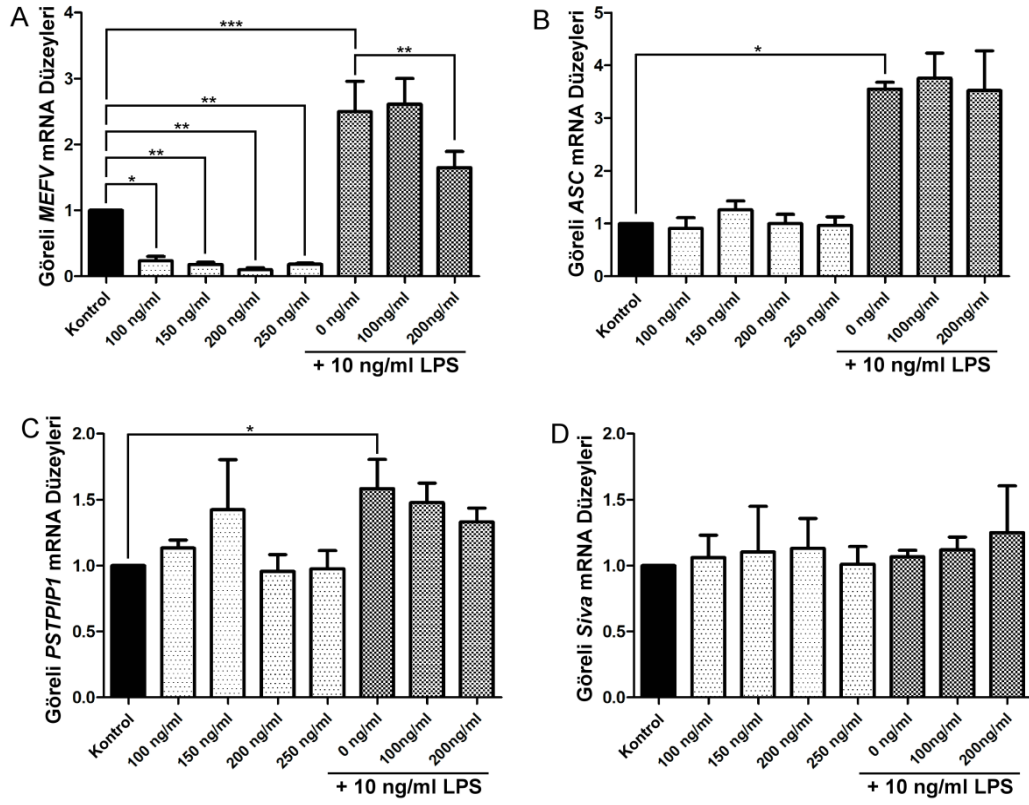
Farklılaşmış (makrofaj benzeri) THP-1 hücrelerinde ise; uygulanan tüm kolşisin (100, 150, 200 ve 250 ng/ml) derişimlerinde *MEFV* ifadesinin azaldığı görülürken, *PSTPIP1*, *ASC* ve *Siva* ifadesinde değişiklik saptanmadı (Şekil 4.7). Farklılaşmış hücrelerde kolşisin uygulamasına ek olarak, bir inflamasyon tetikleyicisi olan “bakteriyel lipopolisakkarit” (LPS) uygulaması da yapıldı. Bu deneyin amacı, hem LPS varlığında Pysin ve ilişkili proteinlerin gen ifadesini incelemek, hem de LPS ve kolşisin uygulamasının beraber yapıldığı durumdaki gen ifadesini ortaya çıkarmaktır. Bu sayede inflamasyonun tetiklendiği durumdaki gen ifadesinin kolşisin varlığında nasıl etkilendiği aydınlatılmaya çalışılmıştır.

10 ng/ml derişimde LPS içeren besiyerinde 2 saat inkübe edilen hücrelerde *MEFV*, *ASC* ve *PSTPIP1* ifadesinde artış gözlenirken, *Siva*'da herhangi bir değişiklik saptanmadı. LPS ve kolşisinin birlikte uygulandığı deney sisteminde ise, iki farklı kolşisin (100 ve 200 ng/ml) derişimi kullanıldı. Bu deneyde, 22 saat kolşisin içeren besiyerinde bulunan hücreler daha sonra 2 saat boyunca LPS içeren besiyeri içerisinde inkübe edildi ve gen ifadesi analiz edildi.

100 ng/ml kolşisin ve 10 ng/ml LPS'in birlikte uygulandığı durumda, *MEFV* ifadesinin, sadece LPS uygulaması yapılmış duruma benzer şekilde arttığı saptandı. Ancak 200 ng/ml kolşisin ve 10 ng/ml LPS birlikte uygulandığında ise, *MEFV* ifadesi, yalnızca LPS uygulanan gruba göre azalmış olduğu saptandı ($p < 0.001$). LPS ve kolşisinin birlikte uygulanmadığı durumda *ASC* ve *PSTPIP1* ifadesinde artış meydana geldiği gözlemlendi. *Siva* ifadesinin ise deneylerdeki hiçbir koşulda değişmediği saptandı (Şekil 4.7).

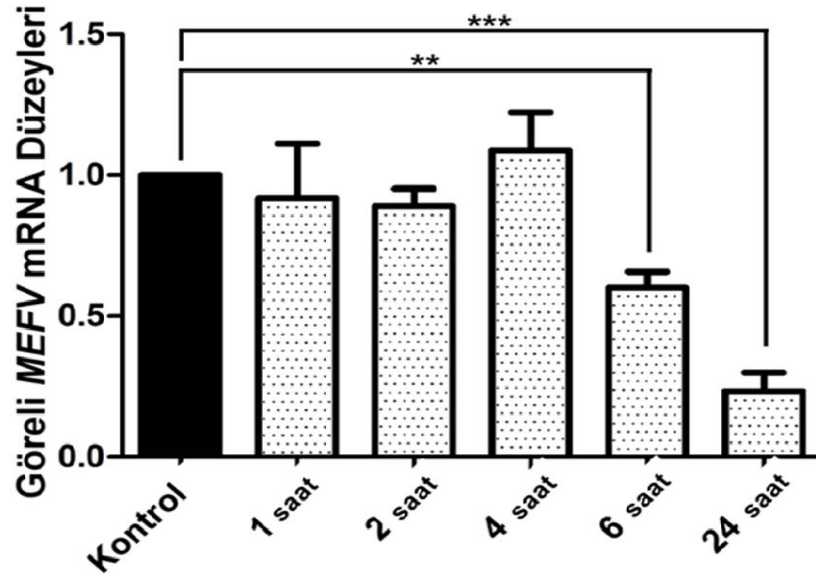
4.5.1 *MEFV* İfadesinin Düşük Kolşisin Derişimlerinde ve Farklı Zaman Aralıklarında İncelenmesi

Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde kolşisinin (100, 150, 200 ng/ml derişimlerinde) *MEFV* ifadesini azaltıyor olması, bu bulgunun ek deneylerle desteklenmesini gerektirmiştir. Özellikle kolşisinin *MEFV* ifadesini azaltan en düşük derişiminin tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, farklılaşmış THP-1 hücrelerine 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml ve 75 ng/ml derişimlerinde kolşisin uygulaması yapıldı ve *MEFV* ifadesi analiz edildi. Bu çalışmada 100 ng/ml'nin altındaki kolşisin derişimlerinin *MEFV* ifadesine etki etmediği saptandı.



Şekil 4.7. Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde kolşisinin ve LPS'in *MEFV* (a), *ASC* (b), *PSTPIP1* (c) ve *Siva* (d) ifadesi üzerine etkisi. Siyah bar, kontrol grubu hücrelerini temsil etmektedir. Tüm deney setleri üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır (** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, * $p < 0.01$).

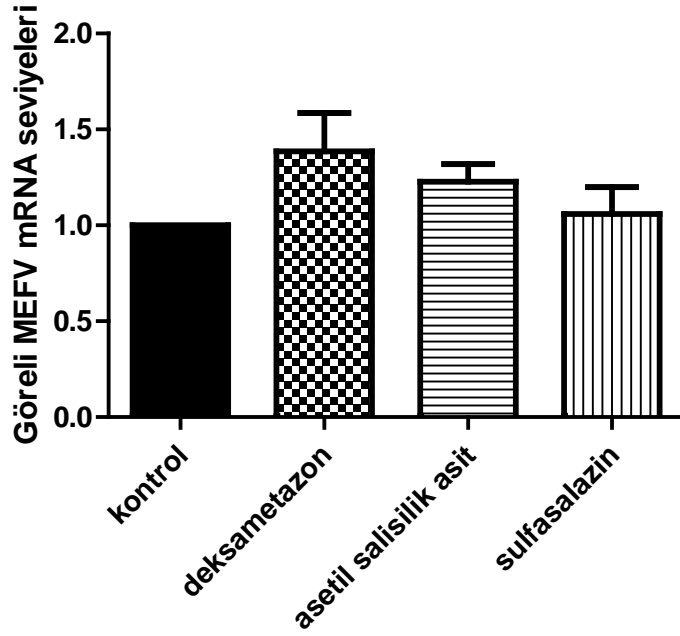
Kolşisin uygulamasının *MEFV* ifadesine hangi zaman aralığında etki ettiğini ortaya çıkarmak, hem biyolojik hem de klinik açıdan önem taşımaktadır. Bu amaçla 1, 2, 4 ve 6 saat süreyle 100 ng/ml kolşisin ile muamele edilen THP-1 hücrelerinde *MEFV* ifadesi incelendi. Bu deneyin sonucunda *MEFV* ifadesinin ilk olarak 6. saatte azalmaya başladığı saptandı. 1, 2 ve 4 saat süre ile kolşisin uygulaması yapılan hücrelerde *MEFV* ifadesinin değişmediği belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde farklı sürelerde kolşisinin uygulanması durumunda *MEFV* ifadesinin ölçümü. Tüm deney setleri üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

4.5.2. Steroidal ya da Steroidal Olmayan İlaçlar Varlığında *MEFV* İfadesinin Araştırılması

MEFV ifadesinin kolşisin uygulaması sonucu azalması, bu etkinin diğer anti-inflamatuvar ilaçlar tarafından sağlanıp sağlanmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. Tez çalışmasının bu bölümünde anti-inflamatuvar ilaçlardan yaygın olarak kullanılanları deksametazon (steroid), sulfasalazin ve asetil salisilik asit (steroidal olmayan) THP-1 hücrelerine uygulandı ve *MEFV* ifadesi incelendi (Şekil 4.9). İlaç uygulamalarında hangi derişimlerin kullanılacağı belirlenirken, literatürde THP-1 hücreleri ile yapılan çalışmalar incelendi. Bu doğrultuda, deksametazon için 100 nM, sulfasalazin ve asetil aslisilik asit için 600 μ M derişimde uygulama yapıldı (44, 45, 46). Sonuç olarak, 6 saat süren inkübasyon sonucunda, uygulanan ilaçların *MEFV* ifadesine istatistiksel olarak anlamlı bir değişime sebep olmadığı görüldü.



Şekil 4.9. Farklılaşmış THP-1 hücrelerinde bazı anti-inflamatuvar ilaçların *MEFV* ifadesine olan etkisi. Tüm deney setleri üçlü tekrarlar halinde yapılmıştır ($p > 0.05$).

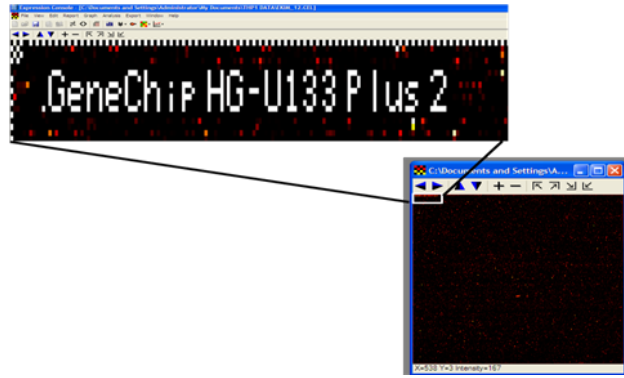
4.6. Kolşisinin Transkriptoma Olan Etkisi

Tez çalışmasının bu kısmında, kolşisinin transkriptoma olan etkisini araştırmak için *GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array* kullanılarak mikrodizin çalışması gerçekleştirildi. Çalışmada dört farklı deney grubu için üçlü tekrarlar halinde 12 adet çip kullanıldı.

Çalışma grupları:

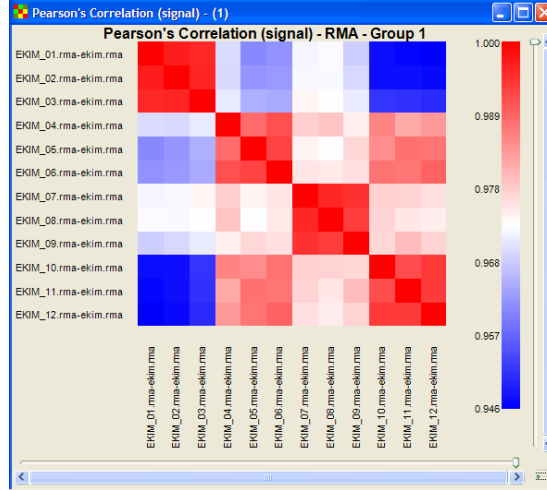
1. Süspanse THP-1
2. Süspanse THP-1 (100 ng/ml kolşisin ile 24 saat inkübe edilmiş)
3. Farklılaşmış THP-1
4. Farklılaşmış THP-1 (100 ng/ml kolşisin ile 24 saat inkübe edilmiş)

Bu çalışmada, THP-1 hücreleri mikrotübül mimarisini bozmayan 100 ng/ml kolşisin derişimi ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerden total RNA eldesi yapıldı ve 12 örnek mikrodizin metodu kullanılarak analiz edildi. Öncelikle çip üzerine yerleştirilmiş kontrol problemlerinin hibridizasyon sonrası verdiği karakteristik imza görüntülenerek, tarayıcıdan alınan ham verilerin ve uygulamanın kalite kontrolü yapıldı (Şekil 4.10). Tüm çipler için *call rate* yüzdeleri % 45-47 aralığında idi. Çalışmada kullanılan tüm çipler için benzer oranda *call rate* alınması çiplerden alınan ham verilerin değerlendirilebilir olduğunu gösterdi.



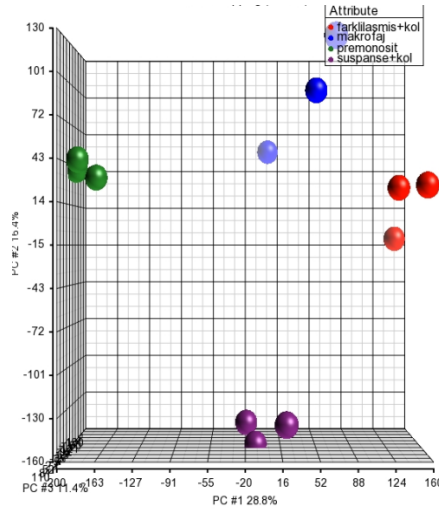
Şekil 4.10. *Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array* çipleri üzerinde kontrol problemlerinin hibridizasyon sonrası verdiği karakteristik imza.

Çiplerde iki adet bakıcı gen bulunmaktadır; *ACTB* ve *GAPDH*. *GAPDH* için örnekler arası varyasyonun *ACTB*'ye göre daha az olmasından ötürü normalizasyon için *GAPDH* ifadesi kullanıldı. Üçlü örneklerin kendi içindeki korelasyonlarının uyumu, deneysel hataların en düşük seviyede olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Çalışma grubundaki çiplerin korelasyon şeması. Kırmızı renk, üçlü grupların kendi içlerinde birbiri ile olan korelasyonlarını, kırmızıdan maviye doğru olan renk dağılımı ise, gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir.

Üçlü grupların birbirleri arasındaki değişiklikler ise, gruplar arasında biyolojik farklılıklar olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Çalışma gruplarının birbiri ile farklı olduğunu gösterilmesi. Mavi: farklılaşmış THP-1 grubu, Kırmızı: kolşisin uygulaması yapılmış farklılaşmış THP-1 kolşisin grubu, Yeşil: süspense THP-1 grubu, Mor: kolşisin uygulaması yapılmış süspense THP-1 grubu.

Verilerin analizi için PARTEK programı kullanıldı. Her bir çip içerisindeki ham veriler, *GAPDH* bakıcı geninden alınan sinyale göre normalize edilip diğer gruplar ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalar için gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

1. Süspanse THP-1 / Farklılaşmış THP-1
2. Süspanse THP-1 / Süspanse THP-1 (100 ng/ml kolşisin ile inkübe edilmiş)
3. Farklılaşmış THP-1 / Farklılaşmış THP-1 (100 ng/ml kolşisin ile inkübe edilmiş)

4.6.1. Süspanse ve Farklılaşmış THP-1 Hücrelerinden Alınan Verilerin Karşılaştırılması

Bu karşılaştırma ile THP-1 hücrelerinin farklılaşma öncesi ve sonrası gen ifade değişiklikleri tespit edildi. Bu kısımda elde edilen veriler, tez çalışmanın ana hedeflerinden biri olmasa da, THP-1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde işlevsel olan genlerin aydınlatılmasına olanak sağladı (ifadesi değişen genler liste halinde EK-Tablo-1'de verilmiştir).

PARTEK programı kullanılarak yapılan analizler sonucunda, farklılaşma sürecinde ifade değişikliklerinin görüldüğü gen grupları ve yolaklar 7 ana başlık altında toplandı:

1. Hematopoyetik farklılaşma belirteçleri,
2. Endositozis ile ilgili genler,
3. Antijen üretimi ve sunumu ile ilgili yolaklar,
4. Lizozomal enzimler,
5. *Spliceosome* bileşenleri,
6. Ubikitin proteozom sistemi bileşenleri,
7. Hücre adhezyon yolağı.

4.6.2. Kolşisin Uygulanmış ve Uygulanmamış Süspanse THP-1 Hücrelerinden Alınan Verilerin Karşılaştırılması

Süspanse THP-1 hücrelerinin 100 ng/ml kolşisin ile inkübasyonu sonucunda yaklaşık 3000 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişim saptandı (ifadesi değişen genler liste halinde EK-Tablo-2’de verilmiştir). Süspanse hücrelerde kolşisin uygulamasından en çok etkilenen yolaklar:

1. MAPK sinyal yolağı,
2. Kemokin sinyal yolağı,
3. TGF-beta sinyal yolağı, olarak belirlendi.

4.6.3. Kolşisin Uygulanmış ve Uygulanmamış Farklılaşmış THP-1 Hücrelerinden Alınan Verilerin Karşılaştırılması

Farklılaşmış makrofaj benzeri THP-1 hücrelerinin 100 ng/ml kolşisin ile inkübasyonu sonrasında yaklaşık 1000 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olduğu tespit edildi (ifadesi değişen genler liste halinde EK-Tablo-3’te verilmiştir). Bu gruptaki yolaklar 4 grup içinde toplandı.

1. Aktin iskeletinin düzenlenmesi,
2. Kemokin sinyal yolağı,
3. Fokal adhezyon,
4. TLR sinyal yolağı.

Farklılaşmış THP-1 hücreleri, süspanse hücrelerden farklı olarak, patojen-ilişkili moleküllere yönelme hareketi, fagositoz ve üretilen sitokinleri hücre dışına salgılama gibi özelliklere sahiptir. Bu sebepten ötürü, farklılaşmış THP-1 hücreleri ile yapılan mikrodizin deneyi inflamasyon mekanizması açısından büyük önem taşımaktadır. Mikrodizin çalışması sonucunda bu gruptaki değerlendirmede en çok göze çarpan gen kümesi aktin ile ilişkili proteinleri kodlayan genler olmuştur (ifadesi değişen genler liste haline EK-Tablo-4’te verilmiştir).

4.6.4. Mikrodizin Sonuçlarının Kantitatif PZR ile Doğrulanması

Mikrodizin analizleri sonucunda ifade değişikliklerinin doğruluğunu test etmek için, aynı RNA örneklerinde kantitatif PZR metodu ile bazı genlerin ifadesi incelendi (Tablo 4.1). Bu aşamada hangi genlerin seçileceğine karar verilirken, inflamasyon mekanizmasında oynadıkları roller dikkate alındı. PSTPIP2, TNS1, CTNNB1, DAAM1, FLNB, FMNL1, FMNL2, LPXN, PALLD, TLN1 ve RND3 proteinleri hücre göçünün baskılayıcı ya da uyarıcıları olarak işlev görürken, TLR1, TLR5, TLR7 ve TLR8 anti-viral cevabı düzenleyen patojen tanıma reseptörleridir.

Kantitatif PZR çalışması yapılan 15 genin 12 tanesinde (*PSTPIP2*, *TNS1*, *CTNNB1*, *FLNB*, *FMNL1*, *FMNL2*, *LPXN*, *PALLD*, *RND3*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR8*) mikrodizin deneyi sonucunda elde edilen sonuçlar teyit edilirken, 2 gen (*DAAM1* ve *TLR1*) için amplifikasyon elde edilemedi. *TLN1* için, mikrodizin çalışmasından elde edilen verilerin aksine, kolşisin uygulaması sonucunda herhangi bir ifade değişikliği saptanmadı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Mikrodizin çalışması sonucu elde edilen bazı gen ifadesi değişikliklerinin kantitatif PZR ile doğrulanması (eksi işareti ifade azalışını göstermektedir).

Gen adı	Transkript no	Mikrodizin sonucu	Kantitatif PZR sonucu
PSTPIP2	NM_024430.3	- 2.7	- 2.4
TNS1	NM_022648.4	1.97	1.69
CTNNB1	NM_001098209.1	1.8	2.9
DAAM1	NM_014992.1	2.0	*
FLNB	NM_001164317.1	3.0	9.9
FMNL1	NM_005892.3	2.3	3.3
FMNL2	NM_052905.3	3.0	5.5
LPXN	NM_001143995.1	1.6	2.0
PALLD	NM_001166108.1	4.9	7.8
TLN1	NM_006289.3	1.5	**
RND3	NM_005168.3	3.1	4.6
TLR1	NM_003263.3	1.8	*
TLR5	NM_003268.5	- 1.5	- 1.4
TLR7	NM_016562.3	- 3.8	- 9.1
TLR8	NM_138636.4	- 3.5	- 6.7

* mRNA amplifikasyonunun olmadığı genler

** İfade değişikliği saptanmayan genler

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında kolşisinin, Pyrin-ASC ve Pyrin-PSTPIP1 etkileşimleri ile oluşan yapıları azalttığı ve *MEFV* ifadesinde baskılamaya neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kolşisinin transkriptoma olan etkisi incelendiğinde, özellikle aktin iskeleti ile ilgili genlerin ifadesinde değişikliklerin olduğu ve hücre göçünü hızlandıran genlerin ifadesini baskımlarken, hücre göçünü engelleyen genlerin ifadesinde artış olduğu saptanmıştır.

Şimdiye kadar kolşisinin anti-inflamatuvar etkisini hangi mekanizma üzerinden gösterdiği aydınlatılamasa da, mikrotübüller üzerinden bir tedavi sağladığı düşünülmektedir. Özellikle hücre göçü ve sitokin salınımı gibi mekanizmalarda mikrotübüllerin rol oynaması bu fikri desteklemektedir (9). Bu tez çalışmasında ise: “Mikrotübülleri bozulan hücrelerin apoptotik sürece girmesinden ötürü, mikrotübül bozucu bir molekülün tedavi edici etkisini mikrotübül mimarisini bozmayan, yani hücrelere toksik gelmeyen bir derişimde ortaya koyması gerekmektedir.” düşüncesi doğrultusunda çalışmalar yapılmış, kullanılan hücre hatlarında mikrotübülleri bozmayan kolşisin derişimleri belirlenmiştir. Kolşisinin hangi hücreyi ne şekilde etkileyeceğini tahmin etmek mümkün değildir. Kolşisin, diğer ilaçlar gibi ‘çoklu ilaç direnci proteinleri’ tarafından hücre dışına pompalanmaktadır. Hücre zarında bulunan ve ilaç moleküllerini hücre dışına pompalayan çoklu ilaç direnci proteinlerinin farklı hücre tiplerinde değişik seviyelerde ifade edilmesi, kimyasal ajanlara veya ilaçlara verilen cevabı farklı kılan en önemli etkidir (47). Bu bilgi, çalışmada kullanılan hücre hatlarında farklı kolşisin derişimlerinin bulunmasının açıklamasıdır (HeLa, COS7 ve THP-1 hücreleri için sırasıyla 7.5, 10 ve 150 ng/ml).

Tez çalışmasının ikinci bölümünde kolşisinin Pyrin-ASC etkileşimine olan etkisi incelenmiştir. Genel bilgiler kısmında da bahsedildiği gibi, Pyrin ile ilişkili proteinlerden biri olan ASC oligomerize olarak *speck* adı verilen karakteristik yapıyı oluşturmaktadır (5). *Pyroptozom* olarak da adlandırılan bu yapı inflamasyonun temel başlatıcısı olan IL-1 β 'nın (interlökin-1 beta) enzimatik kesim ile olgunlaşmasını sağlayan moleküler platformdur (12, 32, 37). Bu nedenle inflamasyonun başlaması ve devamı açısından ASC oligomerizasyonu oldukça önemlidir. Tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalarda, kolşisinin ASC oligomerizasyonunu azalttığı

gösterilmiştir. Bu bulgu, yukarıda bahsedilen bilgiler ile birlikte değerlendirildiğinde, kolşisin uygulamasının ASC oligomerizasyonunu azaltarak, IL-1 β işlenmesinde azalmaya (ya da gecikmeye) neden olabileceği yönünde değerlendirilebilir. Bu durum, kolşisinin AAA'daki tedavi sağlayıcı etkisinin mikrotübüller dışında bir yoldan gerçekleşeceğine dair kanıttır. Ancak, mikrotübül yapısını bozmayan derişimde dahi kolşisinin, mikrotübül-protein etkileşimlerini etkileyebileceği olasılığı da unutulmamalıdır. Cheng ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ASC proteininin HeLa hücrelerinde *speck* oluşturma dinamiği, bilgisayar modellemeleri ve gerçek zamanlı veriler karşılaştırılarak incelendiğinde, *speck* oluşum sürecinin hücre iskeletinden bağımsız olduğu ve difüzyon hızı ile sınırlı olduğu öne sürülmüştür (48). Bu bilginin ışığında mikrotübülleri etkileyen herhangi bir molekülün, ASC proteininin *speck* oluşturma dinamiklerini etkilemesi beklenmemelidir. Kolşisinin doğrudan ASC proteinine bağlanarak etki gösterip göstermediği açıklandığı takdirde, *speck* oluşumunu hangi mekanizma ile azalttığı da aydınlatılabilir.

Tez çalışması sonucunda elde edilen bir başka bulgu da, M694V Pysin mutantının diğer mutant Pysin türevlerinden ve doğal Pysin'den belirgin olarak daha fazla *speck* oluşumuna neden olmasıdır. Bu durum homozigot M694V mutasyonu taşıyan AAA hastalarının ağır fenotipi ile uyum göstermektedir (49). Bu mutasyona sahip hastaların daha fazla IL-1 β üretimi sebebiyle daha ağır fenotipik bulgular gösterdiği söylenebilir. Sonuçta ASC proteininin AAA patogenezinde kilit rol oynayan bir protein olduğu ortaya çıkmaktadır.

ASC proteinini tek başına ifade eden hücrelerin, normal ve mutant Pysin içeren gruplardan daha düşük oranlarda *speck* oluşturmaları, Pysin'in *speck* oluşumunu artırdığını göstermektedir. Bu bulgu, Pysin'in proinflatuvar rolü olduğunu gösterir. Ayrıca mutant Pysin varyasyonlarının bu işlevi daha fazla yerine getirdiği de söylenebilir. Başka bir deyişle, Pysin mutantları genetik açıdan işlev kazanımı tipinde mutasyonlardır. Chae ve arkadaşları da yaptıkları fare modelinde bu bulgu ile örtüşen sonuçlar elde etmiştir (40).

Pysin ile ilişkili proteinlerden PSTPIP1'in, Pysin ile etkileşimi kolşisin varlığında COS7 hücrelerinde incelendiğinde, Pysin ve PSTPIP1'in birlikte oluşturduğu retiküler fibrillerin kolşisin varlığında % 10 azaldığı gösterilmiştir. PSTPIP1'in tek başına transfekte edilmesi sonucunda oluşan filament yapılarında ise

bir değişikliğin bulunmaması, kolşisinin doğrudan Pyrin-PSTPIP1 ilişkisine etki ettiğini göstermektedir. Bunların yanı sıra, Pyrin'in mutant, PSTPIP1'in normal olduğu çalışmalarda kolşisinin retiküler fibril oluşumunu azalttığı gözlenirken, PSTPIP1'in mutant, Pyrin'in normal olduğu durumda ise, kolşisinin retiküler fibril oluşumuna etki etmediği saptanmıştır. Ayrıca, retiküler fibril oluşturan hücre yüzdesi (tüm transfekte hücreler içerisinde) PSTPIP1 mutant iken yaklaşık % 20 artmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar ile PSTPIP1'in mutant olduğu durumda Pyrin'e daha yüksek afinite ile bağlandığının gösterilmesi, PSTPIP1 mutant iken retiküler fibril oranını yükseltmesini açıklar niteliktedir (34, 37). Kolşisinin mutant PSTPIP1 varlığında herhangi bir etkisinin olmaması ise farklı yollarla açıklanabilir: 1) yüksek retiküler fibril oranı sebebiyle kolşisin azaltıcı etkisini yeterince gösterememiş olabilir; 2) mutant PSTPIP1'in aldığı farklı üç boyutlu yapının, kolşisinin doğrudan yapacağı etkiyi engellemesi olabilir; 3) kolşisinin henüz tanımlanmayan başka bir Pyrin ilişkili protein ya da proteinler ile etkileşime girerek retiküler fibril oluşumunu azaltması olabilir. Tüm bu teorilerin, daha kapsamlı çalışmalar ile test edilmesi gerekmektedir.

PSTPIP1 hücre göçü ile doğrudan ilişkili bir proteindir (35). Dolayısıyla, Pyrin-PSTPIP1 ilişkisini ve bu ilişkide kolşisinin rolünü hücre göçü modellemelerinde incelemek, inflamasyon mekanizması açısından faydalı olacaktır. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, daha sonra yapılacak hücre göçü çalışmaları için önemli bir kaynak oluşturacaktır.

Tez çalışmasında kolşisinin Pyrin-Siva2 etkileşimine olan etkisi de incelenmiştir. Daha önce Balcı-Peynircioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu iki proteinin hücre zarının hemen altında yerleştiiği gösterilmiştir (7). Bu tez çalışmasında yapılan deneylerde kolşisinin Pyrin-Siva2 birlikteliğine ve yerleşimine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ancak tez çalışması kapsamında bu iki proteinin etkileşimi ile ilgili herhangi bir işlevsel deney yapılmamıştır. Siva proteininin apoptotik etkisi düşünüldeğünde, kolşisinin Pyrin-Siva etkileşimine olan etkisi hücre ölümü modellerinde incelenmelidir.

Kolşisinin etkisinin açıklığa kavuşturulması için kolşisin-protein etkileşimi konusunda daha detaylı araştırmalar ve/veya bilgisayar modellemeleri yapılmasına ihtiyaç vardır.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde kolşisinin, Pysin ve Pysin ile ilişkili proteinlere gen ifadesi düzeyinde nasıl etki ettiği araştırılmıştır. Kolşisinin AAA tedavisinde kullanılması, bu ilacın *MEFV* ifadesi üzerinde etkili olup olmadığının gösterilmesini gerektirmektedir. Bu tez çalışmasına kadar, farklı araştırma grupları kolşisinin *MEFV* ifadesine olan etkisini çeşitli hücre hatları ve kan hücrelerinde incelemiştir. Bu araştırmalardan birinde, kolşisin uygulaması yapılan monositlerde *MEFV* ifadesinin arttığı, nötrofillerde ise ifade değişimi olmadığı gösterilmiştir (22). Hastaların % 59'unun kolşisin kullandığı başka bir çalışmada, AAA hastalarından elde edilen total periferik kan örneklerinde *MEFV* ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (50). Aynı çalışmada, kolşisin alan ve almayan hastalar arasında *MEFV* ifadesi açısından herhangi bir fark bulunmamıştır.

Tez çalışmasında yapılan gerçek zamanlı PZR çalışmaları sonucunda süspans THP-1 hücrelerinde kolşisinin *MEFV* ifadesine etki etmediği söylenebilir. Sadece 150 ng/ml kolşisin uygulandığında *MEFV* ifadesinin arttığı saptanmıştır. Bu artışın sebebinin NF-kB yolağı olabileceği düşünülmektedir. Rosette ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolşisin uygulamasının NF-kB aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (51). Bu bilgiden yola çıkarak, NF-kB transkripsiyon faktörü ile düzenlendiği bilinen *MEFV* genindeki bu ifade artışının sebebi açıklanabilir. Buna karşın, farklılaşmış THP-1 hücrelerinde NF-kB aracılı transkripsiyon daha farklılaşma sürecinin başında gerçekleşmekte ve NF-kB'nin yeniden aktivasyonu söz konusu olmamaktadır.

Tez çalışmasında kolşisin uygulamasının farklılaşmış THP-1 hücrelerinde *MEFV* ifadesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Bu sonucun literatürdeki çalışmalardan farklı olmasının sebebi, PMA ile farklılaşmış THP-1 hücrelerinin primer monosit ve nötrofillere göre farklı biyolojik karakter göstermesi, bu nedenle çeşitli kimyasallara farklı cevaplar verebilmesi olabilir. Literatürde bulunan çalışmaların ortak noktası primer hücrelerde yapılan deneyler içermesidir. Biyolojik anlamda primer hücreler, hücre hatlarına göre daha doğal hücreler olarak kabul edilse de, kültüre edilmeleri sırasında biyolojik karakterlerinin değiştiği bilinmektedir. Farklılaşmış makrofajlar organizmada dokuların içerisine infiltre olduğundan izole edip kültüre edilmeleri mümkün değildir. Bu sebeple farklılaşmış THP-1 hücreleri inflamasyon mekanizmasını incelemek için uygun bir modeldir. Literatürdeki

çalışmalarla farklı bir sonuç elde edilmesinin diğer bir sebebi de tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde seçilen kolşisin derişiminin mikrotübül mimarisini bozmayacak derişimlerde olmasıdır. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda, kolşisin uygulaması sonrasında hücrel toksisite ve mikrotübül incelemesi uzun süreli takip edilmemiştir. En son ve en zayıf ihtimal olarak da, *MEFV* ifadesinin nötrofil, monosit ve makrofajlarda farklı şekilde düzenlenmesinden ötürü kolşisin tarafından farklı şekilde etkilenebileceğidir.

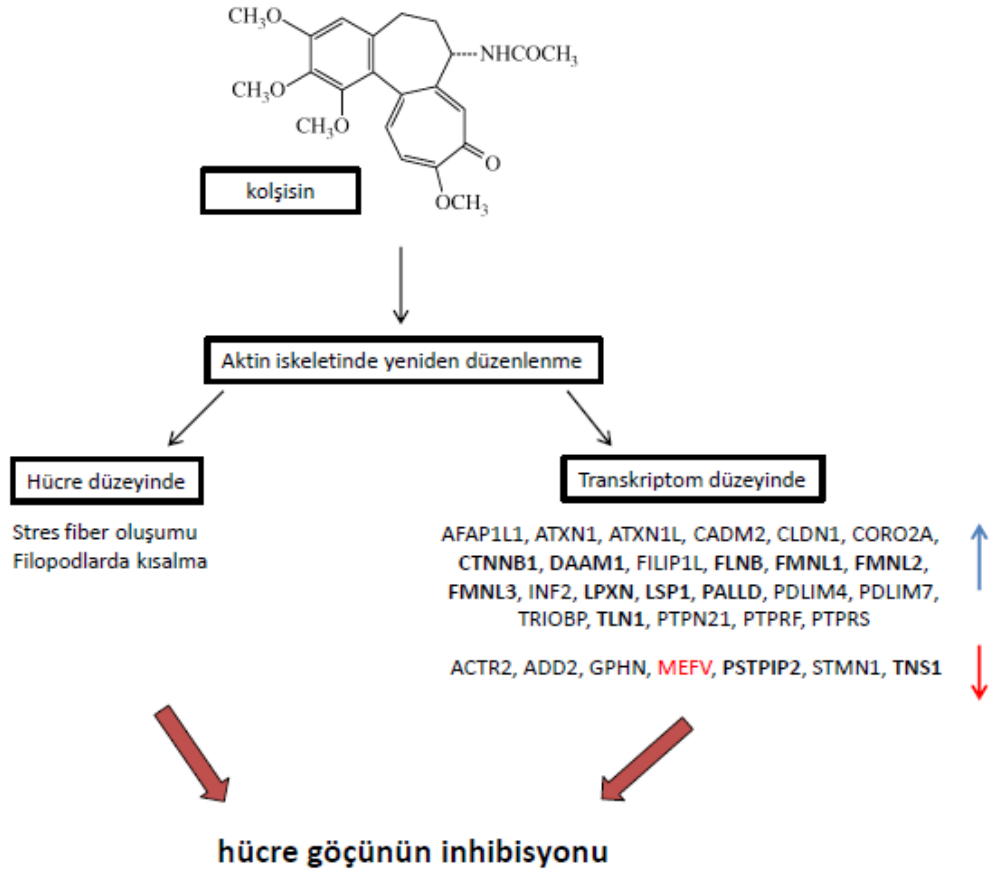
Süspanse ve farklılaşmış THP-1 hücrelerinde kantitatif PZR ile Pysin ve Pysin ile ilişkili proteinlerin gen ifadelerine bakıldığında, *PSTPIPI1*, *ASC* ve *Siva*'nin kolşisin uygulamasından etkilenmediği saptanmıştır. LPS uygulaması sonucunda *MEFV* ve *ASC* ifadesinde bir artışın olduğu daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (22, 52). Tez çalışmasında *PSTPIPI1*'in de LPS uygulaması sonucu arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, söz konusu 3 proteinin doğal immün sistemin düzenlenmesinde birlikte rol alabileceği fikrini destekleyen bir kanıt olmuştur.

Mikrodizin çalışmasında, hem farklılaşma öncesi (süspanse), hem de farklılaşma sonrası THP-1 hücrelerine mikrotübülleri bozmayan derişimde kolşisin uygulanmış ve kontrol grubu hücreler ile karşılaştırma yapılmıştır. Süspanse ve farklılaşmış THP-1 hücrelerinin arasındaki temel biyolojik farklılık, farklılaşmış hücrelerin inflamasyonun ana sitokini olan IL-1 β 'yı salabilme yeteneğinde olduğu unutulmamalıdır. Makrofaj benzeri hücreler halinde olan farklılaşmış THP-1 hücrelerinin inflamasyon mekanizması çalışmalarında tercih edilmelerinin en önemli sebebi de budur. Süspanse THP-1 hücreleri ile yapılan çalışmaların da hücre biyolojisi açısından katkısı olsa da, tez çalışmasında öncelikli olarak farklılaşmış THP-1 hücreleri üzerinden elde edilen bilgileri tartışmak önem arz etmektedir.

Farklılaşma öncesi pre-monosit gibi kabul edilen THP-1 hücrelerinin öncelikle kolşisinden nasıl etkilendiği incelenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada kolşisin uygulaması sonucu NF-kB transkripsiyon faktörünün hücre çekirdeğine yerleştiği ve immün sistem ile ilgili birçok genin transkripsiyonunu etkilediği gösterilmiştir (51). Dolayısıyla henüz farklılaşmamış ve NF-kB'nin çekirdeğe yerleşmemiş olduğu süspanse THP-1 hücrelerine kolşisin uygulaması yapıldığında, NF-kB bağımlı olarak gen ifadesinin değişmesi olasıdır.

Bu çalışmanın içerisinde, THP-1 hücrelerinin farklılaşması bir diaçilgliserol türevi olan PMA ile 3 gün inkübasyon ve ardından 4 gün normal kültür besiyerinde inkübasyon ile sağlanmıştır. PMA, 'diaçilgliserol' gibi davranarak PKC aktivasyonu yapıp NF-kB'nin çekirdeğe geçişini sağlamakta ve farklılaşma sürecini başlatmaktadır. Bu noktada NF-kB aktivasyonuna neden olduğundan kolşisin de farklılaşmaya sebep oluyor gibi düşünülebilir. Ancak hücrelerin farklılaşması için kolşisinden kaynaklanan NF-kB aktivasyonu yeterli olmamaktadır. Kolşisinin NF-kB aktivasyonuna etkisi transkripsiyon üzerindeki değişikliklerden tespit edildiği kadardır. Hücrelerin morfolojisi ya da farklılaşma belirteçleri açısından incelendiğinde, kolşisinin farklılaşmaya etki etmediği görülmektedir (Şekil 5.1).

Farklılaşmış THP-1 hücrelerine kolşisin uygulaması sonrası yapılan mikrodizin çalışmasında, kontrol grubu hücrelerle karşılaştırma sonrasında, özellikle hücre iskelet elemanları ile ilgili yollar dikkati çekmektedir. Giriş kısmında bahsedildiği gibi, tübülün dimerlerine bağlanan kolşisinin, dolaylı yoldan aktin iskeletini de etkilediği bilinmektedir (53). Bu çalışmada elde ettiğimiz hücre biyolojisi seviyesindeki bulgular (aktin iskeletinde stres fibril oluşumu ve filopodların kısalması) mikrodizin çalışmasından elde edilen verileri doğrular niteliktedir. Kolşisinin filopodlar üzerine etkisinin geri dönüşümlü olması ve mikrotübülleri bozmayan derişimlerde dahi aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesini tetiklemesi oldukça önemli bulgulardır. Bu sebeple elde edilen mikrodizin verilerinin analizinde öncelik hücre iskeleti ile ilgili olan genlere verilmiştir.



Şekil 5.1 Kolşisinin aktin iskeletini yeniden düzenleyerek hücre göçünü baskılaması. Mikrodizin ile elde edilen kolşisin uygulaması sonucu ifadesi anlamlı olarak değişmiş genler (yukarı mavi ok artan genler, aşağı yönlü kırmızı ok ise azalan genleri temsil etmektedir). Bu genler içerisinde koyu olarak yazılanlar ise hücre göçünde düzenleyici olan genler. Tez çalışmasında elde edilen bulgular sonucu ortaya çıkabilecek biyolojik olaylar tek bir şemada gösterilmiştir. Aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi hem transkriptom hem de hücre düzeyinde gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak hücre göçünün baskılanması söz konusudur. *MEFV* ifadesi de bu süreçte azalmış, AAA patogenezinde kolşisinin rolü hakkında fikir edinilmiştir.

Hücre biyolojisi çalışmalarında elde edilen bulguların mikrodizin çalışmasından elde edilenler ile örtüşmesi, şu yargıya varılmasını sağlamıştır:

Mikrotübül mimarisini bozmayan derişimde kolşisin, aktin iskeletinde bir yeniden düzenlenmeye sebep olur ve bu düzenlenme sürecinde birçok genin ifadesinde değişim meydana gelir. Bu genlerden bir tanesi de, polimerize aktin ile ilişkili bir protein olan Pysin'i kodlayan *MEFV* genidir (38). Tez çalışmasında yapılan kantitatif PZR deneyinde ortaya çıkarılan *MEFV* ifadesindeki düşüşün sebebi, kolşisin uygulaması sonucu aktin iskeletinde meydana gelen değişimlerden kaynaklanmaktadır. Stres fibril oluşumu ve filopodlardaki kısıalma ile gözlenen bu değişimler, polimerize aktin ile ilişkili bir protein olan Pysin'i kodlayan *MEFV* geninde, transkripsiyon düzeyinde bir baskılama olabileceğini düşündürür. *MEFV* ifadesinin zaman bağlı olarak kolşisinden nasıl etkilendiği incelendiğinde, uygulamanın 6. saatinde ifadenin azalmaya başladığı gözlenmiştir. Başka bir deyişle, aktin iskeletindeki yeniden düzenlenme sonrası *MEFV* ifadesi düşüşe geçmektedir. Ayrıca, bazı steroidal ve non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların aynı deney sisteminde *MEFV* ifadesine etki etmediğinin gösterilmesi, kolşisin-*MEFV* etkileşimindeki özgülüğü ortaya çıkarmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bu ilaçların hücre iskeleti üzerinden etki etmediği bilindiğinden, *MEFV* ifadesinin düzenlenmesinde aktin filamentlerin rol oynadığı fikri güçlenmiştir.

Mikrotübülleri bozmaksızın, aktin iskeletinde yeniden düzenlenmeye sebep olan kolşisinin, AAA hastalarında makrofajlardaki *MEFV* ifadesini azaltması tedavide oynadığı rol olabilir. Bu fikir doğrultusunda kolşisinin, AAA hastalarındaki mutant Pysin miktarını azaltarak tedavi edici etkisini gösterdiği söylenebilir. Kolşisinin aktin iskeleti üzerinden *MEFV* ifadesinde azalmaya sebep olduğunu ispatlamak için, yeni çalışmalar tasarlayarak ilgili yolakların analiz edilmesi gerekmektedir.

Mikrodizin verilerinden elde edilen en önemli bulgulardan biri de, kolşisin uygulaması sonucu ifadesi değişen aktin ilişkili proteinlerin önemli bir kısmının hücre göçünde düzenleyici olarak rol oynamasıdır. Mikrodizin verilerinin doğrulanması amacı ile yapılan gerçek zamanlı PZR deneylerinde bu proteinlerin mRNA seviyesindeki ifadelerinde kolşisin uygulaması sonucu meydana gelen değişiklikler bir kez daha ispatlanmıştır. Bu proteinlerden hücre göçü aktivatörü *PSTPIP2*'nin ifadesinde azalma, hücre göçü inhibitörleri *CTNNB1*, *FLNB*, *FMNL1*, *FMNL2*, *LPXN*, *PALLD*'nin ifadesinde ise artışın tespit edilmesi, kolşisinin dolaylı

yoldan hücre göçünü baskılayabileceğini göstermiştir. Yine de, bu ifade değişimlerinin işlevsel düzeyde anlamlı olup olmadığı araştırılmalıdır. Bunun için işlevsel hücre deneyleri tasarlanmalı ve söz konusu proteinlerin kolşisin varlığında ve yokluğunda hücre göçüne olan etkisi incelenmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlar

- Kolşisin, ASC oligomerizasyonunun azalmasına neden olmaktadır.
- M694V mutasyonu içeren Pyrin proteini, normal Pyrin proteinine göre daha çok *speck* oluşumuna sebep olmaktadır.
- Kolşisin uygulaması retiküler fibril oluşumunu azaltmaktadır.
- Mutant Pyrin proteini retiküler fibril sayısına etki etmezken, mutant PSTPIP1 proteini varlığında retiküler fibril oranı artmaktadır. Ayrıca mutant PSTPIP1 varlığında kolşisin uygulaması retiküler fibril oranında herhangi bir azalma sağlamamaktadır.
- Kolşisin makrofaj benzeri THP-1 hücrelerinde *MEFV* ifadesini azaltmaktadır.
- Bakteriyel LPS uygulaması *MEFV*, *ASC* ve *PSTPIP1*'in ifadesini arttırmaktadır.
- THP-1 hücrelerinde mikrotübülleri bozmayan derişimde kolşisin uygulaması, geri dönüşümlü olarak aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesine sebep olmaktadır.
- Kolşisin aktin iskeleti ile ilgili genlerin ifadesine etki etmektedir.
- Kolşisin hücre göçünü aktive eden proteinlerin ifadesini baskımlarken, hücre göçünü inhibe eden genlerin ifadesinin artmasına sebep olmaktadır.
- Tez çalışmasının ilk bölümünü oluşturan kolşisinin Pyrin ve Pyrin ile ilişkili proteinler üzerine olan etkisinin hücre düzeyindeki sonuçları *Journal of Cell Biochemistry* dergisinde yayınlanmıştır.

E.Z. Taskiran, A. Cetinkaya, B.Balci-Peynircioglu, Y.Z. Akkaya, E.Yilmaz
 The effect of colchicine on Pyrin and Pyrin interacting proteins.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22730186>

Öneriler

- Kolşisinin protein-protein etkileşimlerine olan etkisi bilgisayar modellemeleri ve sonrasında yapılacak “protein-ilaç etkileşimi” deneyleri ile incelenmelidir.
- Kolşisinin aktin iskeletini hangi proteinler/yolaklar üzerinden etkilediği aydınlatılmalı, aktin ilişkili bir protein olan Pysin’in ifadesinin hangi sinyal sonucu azaldığı ortaya çıkarılmalıdır.

Yukarıda bahsedilen çalışmalar tamamlandığında kolşisinin anti-inflamatuvar etkisi hakkında daha fazla bilgi edinilmiş olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. International FMF Consortium (1997). Ancient missense mutations in a new number of the Roret gene family cause familial Mediterranean fever. *Cell*, 90:797-807.
2. French FMF Consortium (1997). A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nature Genetics*, 17(1):25-31.
3. Gumucio, D.L., Diaz, A., Schaner, P., Richards, N., Babcock, C., Schaller, M. ve diğeri (2002). Fire and Ice: The role of pyrin domain- containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20:45-51.
4. Chae, J.J., Aksentijevich, I. ve Kastner, D.L. (2009). Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol*, 146(5):467-478.
5. Richards, N., Schaner, P., Diaz, A., Stuckey, J., Shelden, E., Wadhwa, A. ve diğeri (2001). Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (42):39320-39329.
6. Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull K.M., Wood G., Wise C.A. ve diğeri (2003). Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13501-13506.
7. Balci-Peynircioglu, B., Waite, A.L., Hu, C., Richards, N., Staubach-Grosse, A., Yilmaz, E. ve diğeri (2008). Pyrin, product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3): 595-602.
8. Gilles, G. (2000). The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Current Opinions in Rheumatology*, 12:61-64.
9. Niel, E. ve Scherrmann, J.M. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine*, 73:672-678.

10. Balci-Peynircioglu, B., Waite, A.L., Schaner, P., Taskiran, Z.E., Richards, N., Orhan, D. ve diğeri (2008). Expression of ASC in renal tissues of familial Mediterranean fever patients with amyloidosis: postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 233(11):1324-1333.
11. Ben-Chetrit, E., Bergmann, S. ve Sood, R. (2005). Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology (Oxford)*, 45 (3):274-282
12. Bortoluci, K.R. ve Medzhitov, R. (2010). Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:1643–1651.
13. Hull, K.M., Shoham, N., Chae, J.J., Aksentijevich, I., Kastner, D.L. (2003). The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Current Opinions in Rheumatology*, 15:61-69.
14. Aksentijevich, I. ve Kastner, D.L. (2011). Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: past successes, future challenges. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(8):469-478.
15. Rawashdeh, M.O., Majeed, H.A. (1996). Familial Mediterranean fever in Arab children: the high prevalence and gene frequency, *European Journal of Pediatrics*, 155:540-544.
16. Özen, S., Karaaslan, Y., Özdemir, O, Saatçi, U., Bakkaloğlu, A., Köroğlu, E. ve diğeri (1998). Prevalance of juvenile chronic arthritis and familial Mediterranean fever in Turkey: a field study, *Journal of Rheumatology*, 25:2445-2449.
17. Van der Hilst, J.C., Simon, A. ve Drenth, J.P. (2005). Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis. *Clinical and Experimental Medicine*, 5(3):87-98.
18. Seyahi, E., Ozdogan, H., Celik, S., Ugurlu, S. ve Yazici, H. (2006). Treatment options in colchicine resistant familial Mediterranean fever patients: thalidomide and etanercept as adjunctive agents. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 24:99-103.

19. Infevers veri tabanı, <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers/>
20. Turkish FMF Study Group (2005). Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, 84:1-11.
21. Yılmaz, E., Özen, S., Balcı, B., Duzova, A., Topaloglu, R., Besbas, N. ve diğerleri (2001). Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *European Journal of Human Genetics*, 9:553-555.
22. Centola, M., Wood, G., Frucht D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C. ve diğerleri (2000). The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95:3223-3231.
23. Diaz, A., Hu, C., Kastner, D.L., Schaner, P., Reginato, A.M., Richards, N ve diğerleri (2004). Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis and Rheumatology*, 50(11):3679-3689.
24. Papin, S., Duquesnoy, P., Cazeneuve, C., Pantel, J., Coppey-Moisan, M., Dargemont, C. ve diğerleri (2000). Alternative splicing at the MEFV locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostriin/pyrin protein to the nucleus. *Human Molecular Genetics*, 12;9(20):3001-3009.
25. Papin, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H.D., ve diğerleri (2007). The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death and Differentiation*, 14:1457–1466.
26. Seshadri, S., Duncan, M.D., Hart, J.M., Gavrillin, M.A. ve Wewers, M.D. (2007). Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1beta processing and release. *Journal of Immunology*, 179:1274–1281.

27. J eru, I., Papin, S., L'hoste, S., Duquesnoy, P., Cazeneuve, C., Camonis, J. ve diğerleri (2005). Interaction of pyrin with 14.3.3 in an isoform-specific and phosphorylation-dependent manner regulates its translocation to the nucleus. *Arthritis and Rheumatology*, 52(6):1848-1857.
28. Fortin, A., MacLaurin, J.G., Arbour, N., Cregan, S.P., Kushwaha, N., Callaghan, S.M. ve diğerleri (2004). The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27):28706-28714.
29. Prasad, K.V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M.X., Rizk, M., Jacquot, S. ve diğerleri (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10; 94(12):6346-6351.
30. Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N. ve diğerleri (1999). ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (48):33835-33838.
31. Yeretssian, G., Labb e, K. ve Saleh, M. (2008). Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine*, 43(3): 380-390.
32. Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W. ve diğerleri (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, 14(9): 1590-1604.
33. Waite, A.L., Schaner, P., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Masters, S.L., Brydges, S.D. ve diğerleri (2009). Pyrin Modulates the Intracellular Distribution of PSTPIP1. *PloS One*, 4 (7), e6147.

34. Shoham, N.G., Centola, M., Mansfield, E., Hull, K.M., Wood, G., Wise, C.A. ve diğerleri (2003). Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13501-13506.
35. Cooper, K.M., Bennin, D.A., Huttenlocher, A. (2008). The PCH Family Member Proline-Serine-Threonine Phosphatase-interacting Protein 1 Targets to the Leukocyte Uropod and Regulates Directed Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 3180–3191.
36. Wise, C.A., Gillum, J.D., Seidman, C.E., Lindor, N.M., Veile, R., Bashiardes, S. ve diğerleri (2002). Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTPPEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Human Molecular Genetics*, 11;8;961-969
37. Yu, J.W., Fernandes-Alnemri, T., Datta, P., Wu, J., Juliana, C., Solorzano, L. ve diğerleri (2007). Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Molecular Cell*. 28(2):214-227.
38. Waite, A.L., Schaner, P., Hu, C., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Hong, A. ve diğerleri (2009). Pyrin and ASC co-localize to cellular sites that are rich in polymerizing actin. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 234(1):40-52.
39. Chae, J.J., Komarow, H.D., Cheng, J., Wood, G., Raben, N., Liu, P.P. ve diğerleri (2003). Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular Cell*, 11(3):591-604.
40. Chae, J.J., Cho, Y.H., Lee, G.S., Cheng, J., Liu, P.P., Feigenbaum, L. ve diğerleri (2011). Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*, 34(5):755-768.

41. Petrilli V. ve Martinon F. (2007). The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint Bone Spine*, 74:571-576.
42. Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K. ve Dockrell, D.H. ve diğerleri (2010). The identification of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 5(1):e8668.
43. Stanton, R.A., Gernert, K.M., Nettles, J.H., Aneja, R. (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Medicinal Research Reviews*, (3):443-481.
44. Nehme, A. ve Edelman, J. (2008). Dexamethasone Inhibits High Glucose, TNF- α , and IL-1 β Induced Secretion of Inflammatory and Angiogenic Mediators from Retinal Microvascular Pericytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49(5):2030-38.
45. Oerlemans, R., Vink, J., Dijkmans, B.A., Assaraf, Y.G., van Miltenburg, M., van der Heijden, J. ve diğerleri (2007). Sulfasalazine sensitises human monocytic/macrophage cells for glucocorticoids by upregulation of glucocorticoid receptor alpha and glucocorticoid induced apoptosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(10):1289-95.
46. Lu, L., Liu, H., Peng, J., Gan, L., Shen, L., Zhang, Q. ve diğerleri (2010). Regulations of the key mediators in inflammation and atherosclerosis by aspirin in human macrophages. *Lipids in Health and Disease*, 6;9:16.
47. Gros, P., Ben Neriah, Y., Croop, J.M., Housman, D.E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 323:728-731.
48. Cheng, J., Waite, A.L., Tkaczyk, E.R., Ke, K., Richards, N., Hunt, A.J. ve diğerleri (2010). Kinetic properties of ASC protein aggregation in epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3):738-747.
49. Gershoni-Baruch, R., Brik, R., Shinawi, M., Livneh, A. (2002). The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever. *European Journal of Human Genetics*, 10(2):145-149.

50. Notarnicola, C., Didelot, M.N., Kone-Paut, I., Seguret, F., Demaille, J., Touitou I. (2002). Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis and Rheumatism*, 46(10):2785–2793.
51. Rosette, C. ve Karin, M. (1995). Cytoskeletal control of gene expression: Depolymerization of Microtubules Activates NF-kB. *The Journal of Cell Biology*, 128(6):1111-1119.
52. Masumoto, J., Kobayashi, H., Nakamura, T., Kaneko, Y., Ota, H., Hasegawa, M. ve diğerleri (2006). Regulation of the ASC expression in response to LPS stimulation is related to IL-8 secretion in the human intestinal mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4;346(3):968-973.
53. Danowski, B.A. (1989). Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *Journal of Cell Science*, 93:255-266.

The Effect of Colchicine on Pyrin and Pysin Interacting Proteins

Ekim Z. Taskiran, Arda Cetinkaya, Banu Balci-Peynircioglu,* Yeliz Z. Akkaya, and Engin Yilmaz

Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey

ABSTRACT

MEFV which encodes pyrin, cause familial Mediterranean fever (FMF), the most common auto-inflammatory disease. Pyrin is believed to be a regulator of inflammation, though the nature of this regulatory activity remains to be identified. Prophylactic treatment with colchicine, a microtubule toxin, has had a remarkable effect on disease progression and outcome. It has been thought that, inhibition of microtubule polymerization is the main mechanism of action of colchicine. But, the exact cellular mechanism explaining the efficacy of colchicine in suppressing FMF attacks is still unclear. Given the ability of colchicine treatment to be considered as a differential diagnosis criteria of FMF, we hypothesized that colchicine may have a specific effect on pyrin and pyrin interacting proteins. This study showed that colchicine prevents reticulated fibrils formed by PSTPIP1 filaments and reduces ASC speck rates in transfected cells. We further noted that, colchicine down-regulates *MEFV* expression in THP-1 cells. We also observed that colchicine causes re-organization of actin cytoskeleton in THP-1 cells. Pyrin is an actin-binding protein that specifically localizes with polymerizing actin filaments. Thus, *MEFV* expression might be affected by re-organization of actin cytoskeleton. The data presented here reveal an important connection between colchicine and pyrin which might explain the remarkable efficacy of colchicine in preventing FMF attacks. *J. Cell. Biochem.* 113: 3536–3546, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: COLCHICINE; PYRIN; ASC; PSTPIP1; INFLAMMATION; MEFV

Familial Mediterranean fever (FMF) (MIM 249100) is the most common of the auto-inflammatory disorders. It is characterized by recurrent attacks of fever and localized inflammation, usually involving the peritoneum, pleura, joints, and skin [Livneh et al., 1997]. A rapid acute phase response and a massive influx of polymorphonuclear leukocytes into the affected tissues cause the inflammation in FMF patients. Tissue deposition of serum amyloid A can lead to kidney failure and death [Livneh et al., 1999]. FMF is caused by mutations in the *MEFV* (MEditerranean FeVer) (OMIM: 608107) [The International FMF Consortium, 1997]. So far more than 74 FMF-associated mutations have been identified in the *MEFV* (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infervers/>). Pyrin (NP_000234.1), the product of *MEFV*, is expressed predominantly in neutrophils, monocytes, and dendritic cells, but not in lymphocytes [Centola et al., 2000; Diaz et al., 2004].

The pyrin protein appears to be a regulator of inflammation, but its exact role on inflammatory pathways is still controversial. Pyrin

is composed of five domains, each of which has a distinct role in interactions with several proteins that are related to inflammation through regulation of cell death, regulation of cytokine secretion, and cytoskeletal signaling [Chae et al., 2009].

Several pyrin-interacting proteins have been identified, including ASC (NP_037390.2) [Richards et al., 2001], PSTPIP1 (NP_003969) [Shoham et al., 2003], and Siva (NP_006418.2) [Balci-Peynircioglu et al., 2008a].

PSTPIP1 (Proline Serine Threonine Phosphatase-Interacting Protein 1) is a cytosolic adaptor protein that functions to link PEST phosphatases to their substrates [Cong et al., 2000]. PSTPIP1 is distributed in a filamentous network throughout the cytosol in both natively expressing and transfected cells [Waite et al., 2009a]. Mutations in the *PSTPIP1* result in PAPA Syndrome, (Pyogenic sterile Arthritis, Pyoderma gangrenosum, and Acne) (MIM 604416) [Wise et al., 2002]. PAPA-associated mutants of *PSTPIP1* are able to form filaments normally in human monocytes, neutrophils, and also

The authors have declared that no competing interests exist.

Grant sponsor: Technical and Scientific Research Council of Turkey and Hacettepe University; Grant numbers: 105S364 SBAG, 060 110 1025.

*Correspondence to: Banu Balci-Peynircioglu, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara, Turkey. E-mail: bbalci@hacettepe.edu.tr

Manuscript Received: 9 April 2012; Manuscript Accepted: 11 June 2012

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 21 June 2012

DOI 10.1002/jcb.24231 • © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

transfected cells. Our previous work demonstrated that pyrin reorganizes PSTPIP1 fibrils so that they become branched and reticulated in the presence of pyrin in transfected cells [Waite et al., 2009a]. This indicates that pyrin plays a role in remodeling the PSTPIP1 fibrils when it binds to them. The biological impact of reticulated fibrils is as yet unknown, but it is thought that this well-organized structure may play an important role in immune cells.

Pyrin also interacts with ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) via a PYD–PYD interaction. ASC is an adaptor protein that is an important component of both the apoptosome and the inflammasome [Bergsbaken and Cookson, 2009]. It forms large perinuclear structures called “specks” *in vitro* [Masumoto et al., 1999]. We previously demonstrated that speck formation is accelerated in the presence of pyrin, and we also found that nocodazole, which inhibits microtubule formation and decreases speck formation [Balci-Peynircioglu et al., 2008b].

The most effective treatment for FMF is the daily use of colchicine [Zemer et al., 1986], which reduces both the frequency and severity of FMF attacks, and reduces the incidence of multi-organ amyloidosis. Colchicine forms a tubulin–colchicine complex causing microtubule de-polymerization. This has been thought to be the main effect of colchicine in treating FMF, however how colchicine suppresses FMF attacks is still unclear [Niel and Scherrmann, 2006]. We hypothesized that colchicine may have some specific effects on pyrin and/or pyrin-interacting proteins. Indeed, the effect of colchicine on these proteins and on gene expression levels of these proteins was previously unknown.

In this study, we determined the effect of colchicine on distribution and expression of pyrin and its interacting proteins. We firstly investigated the effect of colchicine on a cellular level by examining possible differences in reticulated fibril structures in pyrin–PSTPIP1 co-transfected cells, speck formation in pyrin–ASC co-transfected cells. We then evaluated the results of transcription levels in the presence or absence of LPS. The results of this study provide a detailed outline of the effect of colchicine on the gene expression levels and cellular distribution of these proteins.

METHODS

CELL CULTURE, TRANSFECTION, AND COLCHICINE TREATMENT

COS-7 and HeLa cells were grown in DMEM (Gibco by Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) (vol/vol), and 1% L-glutamine (vol/vol), and then transfected using FUGENE-HD (Roche Applied Science, Indianapolis, IN).

For COS-7 and HeLa cells, 6 h after being transfected with the vectors, cells were treated with colchicine at microtubule non-disrupting concentrations which is determined according to experiments with different concentrations of colchicine (Biological Industries, Kibbutz, Israel). In these experiments, COS-7 and HeLa cells were treated with varying concentrations; 1–100 ng/ml and 1–50 ng/ml of colchicine containing mediums; respectively. Cells were fixed and stained 18 h after colchicine treatment. For analysis, 500 cells were counted in triplicates. THP-1 cells were grown in RPMI (Gibco by Invitrogen) supplemented with 10% FBS (vol/vol), and

1% glutamine (vol/vol). Cells were differentiated with PMA as previously described in [Daigneault et al., 2010]. In order to determine microtubule non-disrupting concentrations for THP-1 cells, they were treated 100–1,000 ng/ml of colchicine-containing medium for 24 h after starting with the 7th day of differentiation. THP-1 cells were also treated with 10 ng/ml LPS (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) where indicated. All experiments were performed in triplicate. All cell lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection).

PLASMIDS AND ANTIBODIES

All FLAG-tagged, myc-tagged, and GFP tagged constructs were provided by the laboratory of Dr. Deborah Gumucio (University of Michigan); these constructs were generated using pCMV-Tag2B, pCMV-Tag3A (from Staratagene, La Jolla, CA) and pEGFP-C2 (from Clontech, Mountain View, CA) vectors, respectively. Anti-myc (rabbit polyclonal), anti-FLAG (Cy3 conjugate mouse antibody), and anti-tubulin (mouse monoclonal) antibodies were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Actin filaments were visualized using AlexaFluor488 Phalloidin from Molecular Probes by Invitrogen (Eugene, OR). Fluorescent-labeled secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit) were also obtained from Molecular Probes by Invitrogen. Anti-Pyrin (Abnova Corporation, CA) polyclonal antibody and anti-GAPDH (Applied Biosystems/Ambion, Inc., Austin, TX) monoclonal antibody were used for Western Blot analysis. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated immunoglobulin-G was purchased from Invitrogen–Molecular Probes, Carlsbad, CA.

IMAGING ANALYSIS

COS-7 cells were co-transfected with PSTPIP1-GFP and myc-pyrin. A PSTPIP1-GFP positive region was found and followed for 24 h. GFP and PSTPIP1-GFP transfected COS-7 cells were used as control in the analysis. In the time-lapse imaging, cells were maintained at 37°C under the microscope and imaged every 15 min during the experiment.

THP-1 cells were followed for 24 h after treatment with 100 ng/ml colchicine and then another 24 h in fresh medium after removal of colchicine containing medium in order to determine the effect of colchicine on filopodia length.

Leica Application Suite was used to analyze the time-lapse image sequences. For imaging and measurement Leica QWin image analysis and processing software for quantitative microscopy was used.

IMMUNOFLUORESCENCE STAINING

Cells were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde solution in PBS at room temperature. After permeabilization in 0.2% Triton-X in PBS for 10 min, cells were exposed to blocking solution (10% goat serum, 2% BSA, and 0.1% Tween-20 in PBS) for 1 h. After antibody staining, 10 mM DAPI was applied to the cells for 1 min for nuclear visualization. Coverslips were mounted with ProLong Gold Anti-Fade Reagent (Molecular Probes by Invitrogen). Slides were visualized using a Leica IM 50 fluorescence microscope.

RNA ISOLATION AND cDNA SYNTHESIS

Total RNA was extracted by Qiagen (Valencia, CA) RNeasy Mini kit according to manufacturer's instructions. Once total RNA was obtained, its concentration and OD ratio was measured by NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). cDNA was generated by reverse transcription of 500 ng total RNA using Qiagen Quanti Tect Reverse Transcription kit according to manufacturer's recommendations.

QUANTITATIVE REAL TIME PCR

Real-time PCR was performed using SYBR Green JumpStart TaqReadyMix kit (Sigma) on Corbett Rotor Gene 6000 Light Cycler. The relative amount of mRNA, normalized to an internal control *ACTB* (NM_001101.3) (human beta-actin) and relative to a calibrator (normal), was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$. The sequences, amplicon lengths, and Tm degrees of gene specific primer pairs for *ACTB*, *MEFV*, *ASC* (NM_013258.4), *PSTPIP1* (NM_003978) and *Siva* (NM_006427.3) are shown in Table I. All reactions were performed in 95–100% efficiency.

WESTERN BLOT

THP-1 cells were lysed in Triton X-100 Lysis Buffer (10 mM Tris-Base at pH 7.4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100 in the presence of protease-inhibitor cocktail (Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Protein concentrations were determined using BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) according to manufacturer's instructions. Equal amounts of total protein (40 μ g/ml) were denatured in SDS sample buffer, subjected to 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (NC) membrane (Thermo Scientific) for detection with appropriate antibodies.

STATISTICAL METHOD

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism ver 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). *P* values were calculated by using one-way ANOVA test and Tukey's test was used as the post test where *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

TABLE I. Primer Sequences Used in Real-Time PCR Experiment

Gene	Primer sequences	Amplicon length (bp)
<i>ACTB</i>	5'-CGCAAAGACCTGTACGCCAAC-3' 5'-GAGCCCGCATCCACACG-3'	164
<i>MEFV</i> (Ex2-3)	5'-TGGA CTGGCAACAGAACC-3' 5'-CGTCAACTGGGTCTCTTCC-3'	162
<i>MEFV</i> (Ex4-5)	5'-GGGAGGAGAAGGCAGTGAG-3' 5'-AGCAGGGCGATGTCCTGGG-3'	192
<i>ASC</i>	5'-CTTCTACTGGAGACCTACG-3' 5'-CGGTGCTGGTCTATAAAGTG-3'	183–240 ^a
<i>PSTPIP1</i>	5'-GCAGCATAGACGCCGACATC-3' 5'-CTTCCGTGCAGCAGTCCAG-3'	178
<i>Siva</i>	5'-TGCGTGGAGCCGTGGATG-3' 5'-GCTTGACCCAGCTCAGGTCTC-3'	193

Ex, exon; bp, base pair.

^aAmplification products depend on alternative splicing.

RESULTS

DETERMINATION OF SUITABLE COLCHICINE CONCENTRATION

In order to determine the specific effects of colchicine besides microtubule depolymerization, we treated cells with levels of colchicine below microtubule-disrupting concentrations. In order to determine the appropriate concentration, cells were treated with different concentrations of colchicine and microtubule architecture was visualized by immunofluorescence with a tubulin-specific antibody. The intact microtubular architecture, characterized by filamentous microtubules spreading from a perinuclear tubulin-dense microtubule organizing center, was observed in colchicine-free medium. Microtubule disruption was observed at colchicine concentrations higher than 7.5, 10, and 100 ng/ml colchicine concentrations for COS-7, HeLa, and THP-1 cells, respectively (Fig. 1A–C). At lower colchicine concentrations microtubular architecture was similar to those of cells grown in colchicine-free medium. We also performed actin filament staining by chemifluorescence and observed that the actin cytoskeleton was intact at colchicine concentrations mentioned above. However, an increase in number of stress fibers were observed in THP-1 cells when treated with 250 ng/ml colchicine-containing medium (Fig. 2A–D). We further noted that filopodia were decreased in both the average length and number in differentiated THP-1 cells after colchicine treatment (Fig. 2E–H). We also performed time lapse live cell imaging in 100 ng/ml colchicine containing medium in THP-1 cells, and observed a decrease in filopodia upon colchicine treatment (Fig. 3A). In the 24th hour of colchicine treatment, cells were washed three times with fresh medium and treated with culture medium without colchicine (Fig. 3B). Following colchicine removal filopodia re-formed, indicating that filopodia formation was reversibly altered by colchicine. These observations indicate that colchicine, at low concentrations, causes actin re-organization while leaving microtubules intact.

THE FORMATION OF RETICULATED FIBRILS

In order to analyze the formation of reticulated fibrils in COS-7 cells after co-transfection with myc-pyrin and PSTPIP1-GFP, we selected a field containing GFP-positive cells and followed them by time lapse live cell-imaging. At the 18th hour after transfection, GFP expression was first observed as un-organized aggregates; however, these aggregates became branched and organized at 20th hour, as shown in Figure 4A3. However reticulated fibril formation was not observed when cells were transfected with either GFP only or PSTPIP1-GFP (Fig. 4A1–A2). This led us to conclude that reticulated fibrils form in a short period after the accumulation of transfected proteins in COS-7 cells.

COLCHICINE DECREASES THE NUMBER OF RETICULATED FIBRIL FORMING CELLS

It is known that PSTPIP1 forms filamentous structures in transfected and native human cells. First, we investigated the effect of colchicine on PSTPIP1 filaments in flag-PSTPIP1 transfected COS-7 cells. However, we did not observe any differences between control and colchicine treated cells (data not shown).

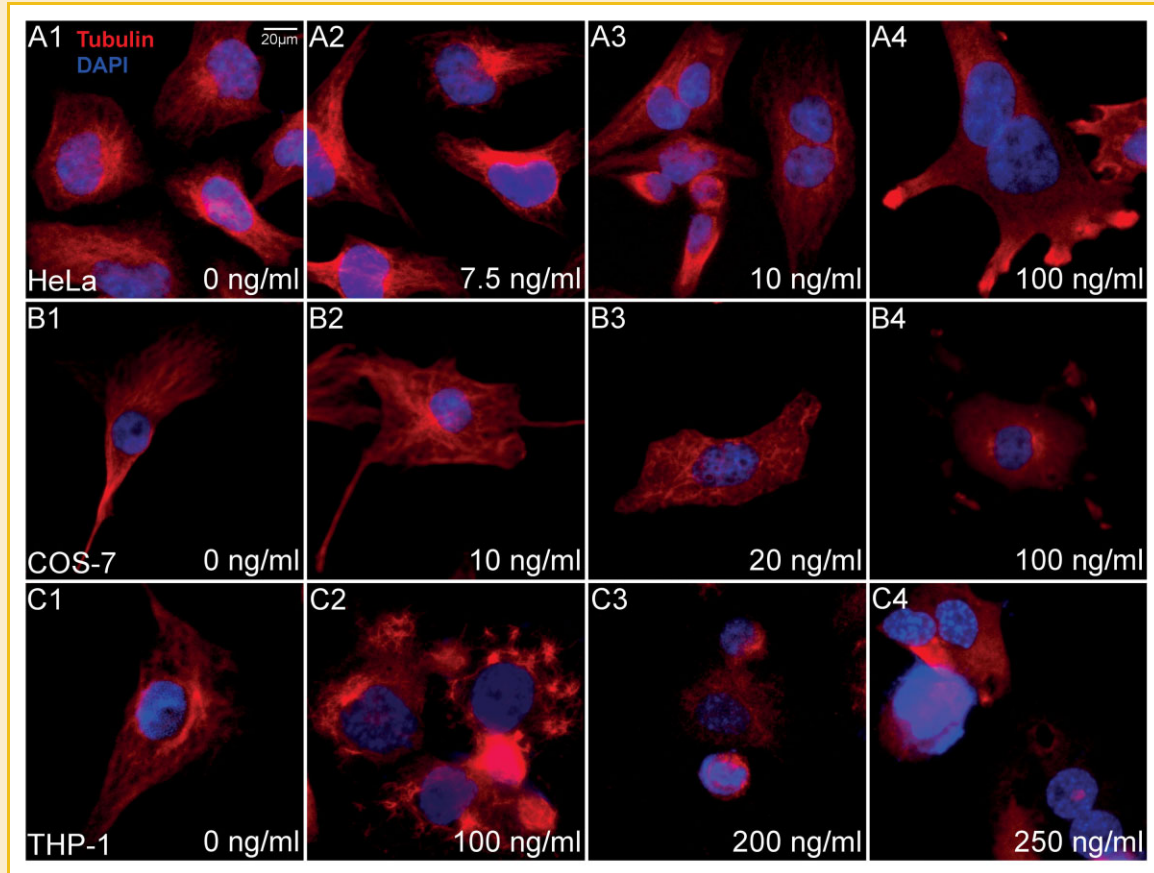


Fig. 1. Effects of colchicine on microtubule structure at various concentrations. Tubulin (red) and nucleus (blue) staining of HeLa cells (A1–A4) incubated for 24 h in mediums containing 0, 7.5, 10, and 100 ng/ml colchicine, COS-7 cells (B1–B4) incubated for 24 h in medium containing 0, 10, 20, and 100 ng/ml colchicine, and differentiated THP-1 cells (C1–C4) incubated for 24 h in medium containing 0, 100, 200, and 250 ng/ml colchicine. Microtubule disruption is observed at 10, 20, and 200 ng/ml colchicine concentrations for HeLa, COS-7, and THP-1 cells, respectively. Below these concentrations, microtubule architectures were similar with control cells incubated in medium containing no colchicine, with a proper microtubule organization center proximal to nucleus and individually distinctive microtubule filaments. Scale bar for figures A–C shown in A1 = 20 μ m.

To determine the effect of colchicine on reticulated fibrils, COS-7 cells were co-transfected with myc-Pyrin and flag-PSTPIP1. In this assay, co-transfected cells were classified as either having non-reticulated or reticulated PSTPIP1 architecture (Fig. 4B). As shown in Figure 4C, reticulated fibrils formed in 60% of co-transfected cells. In colchicine treated group, however, the proportion of cells that have reticulated fibrils was reduced by 10% ($P < 0.001$).

We also tested the effect of FMF-causing mutations on pyrin in the presence or absence of colchicine. The results were similar for COS-7 cells co-transfected with flag-PSTPIP1 (wild type) and myc-pyrin-M694V when compared with cells co-transfected with flag-PSTPIP1 and wild-type pyrin; colchicine treatment also caused a decrease in reticulated fibril ratio when mutant pyrin was transfected ($P < 0.001$).

We then set out an experiment to determine the effect of a PAPA-causing mutation on fibril formation. We co-transfected COS-7 cells with flag-tagged PSTPIP1 containing the A230T mutation, a known PAPA mutation, and myc-tagged pyrin. We found that a significantly higher proportion of cells (75%) contained reticulated fibrils with mutant PSTPIP1 ($P < 0.001$; Fig. 4C). However, when

these cells were treated with colchicine, no significant reduction in fibril formation was observed.

Therefore, our findings suggest that colchicine may prevent reticularization of PSTPIP1 because of the connection between PSTPIP1 filaments and the cellular cytoskeleton which results in a decrease in the number of reticulated fibril forming cells.

ASC SPECK FORMATION IS FACILITATED BY PYRIN AND DISRUPTED BY COLCHICINE

Next, we planned to determine the effects of different forms of pyrin on ASC speck formation, and how this rate is affected by colchicine. Co-transfection assays were carried out in HeLa cells instead of COS7 cells as ASC expressing COS7 cells quickly disappeared from culture medium due to probable apoptosis triggered by ASC oligomerization. For each assay, either wild type pyrin or one of three FMF-causing pyrin mutants (M694V, M680I, or V726A, all myc-tagged) was co-transfected with ASC-YFP. The assay was terminated in the 19th hour after transfection due to increased cell death as a result of the apoptotic effects of ASC. All the cells included in the analysis had a normal nuclear morphology.

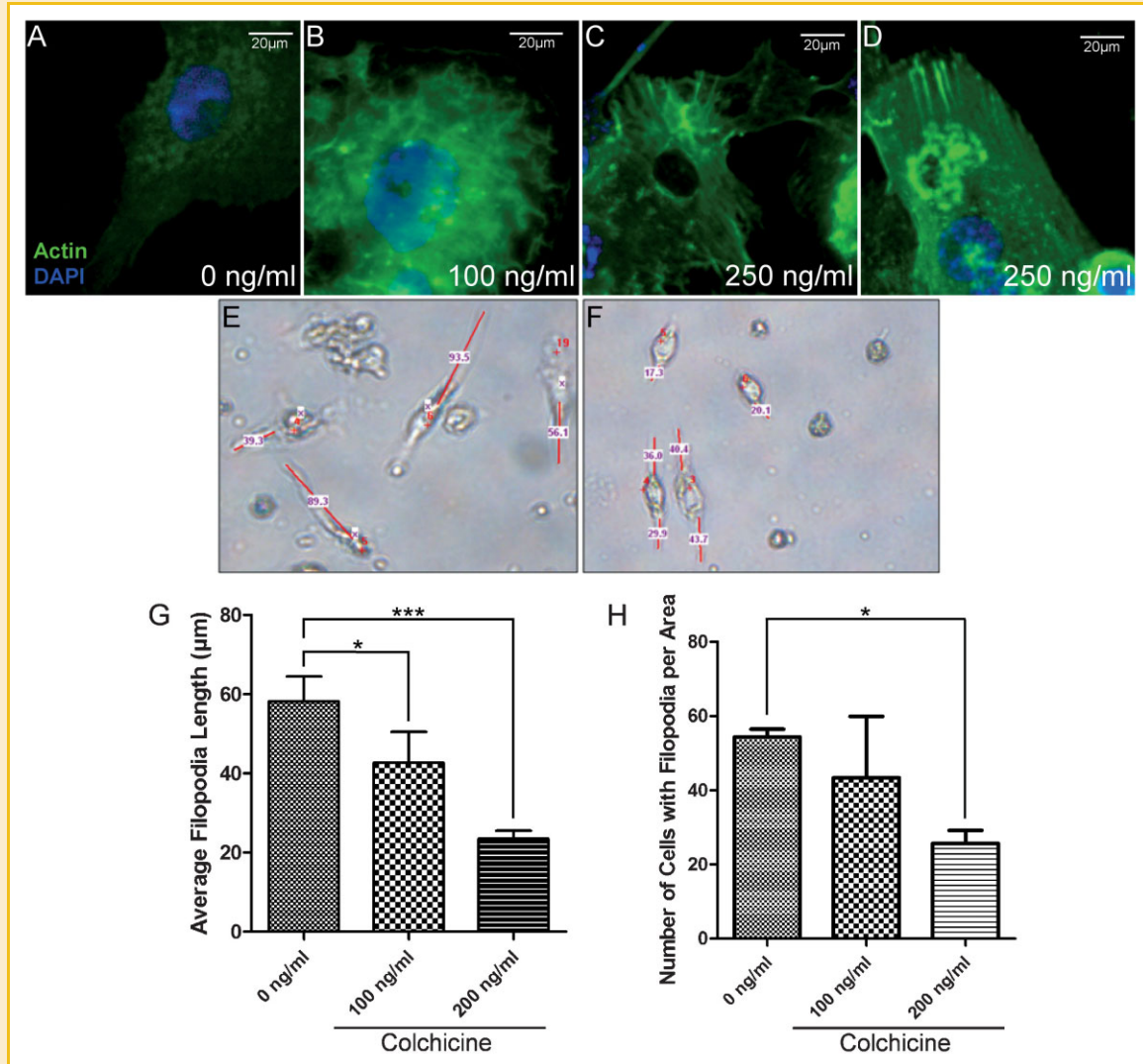


Fig. 2. Actin cytoskeleton and filopodia properties of differentiated THP-1 cells treated with colchicine. Following the treatment of differentiated THP-1 cells with various concentrations of colchicine containing medium, cells were stained for nucleus (blue), and actin (green) with Phalloidin-488 (A–D). Stress fibers were observed with 250 ng/ml colchicine administration (C–D) where this was not a common occurrence in lower colchicine concentration (100 ng/ml) (B), and no colchicine (A). Scale bars in A–D shows 20 µm. E–F: Show the measurement of filopodia length. Statistical analysis indicates that 100 and 200 ng/ml colchicine caused a contraction of filopodia in differentiated THP-1 cells (G) and cells with filopodia are significantly lower in number when treated with 200 ng/ml colchicine (H). Error bars indicate standard deviations. The statistically significant differences are indicated as * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

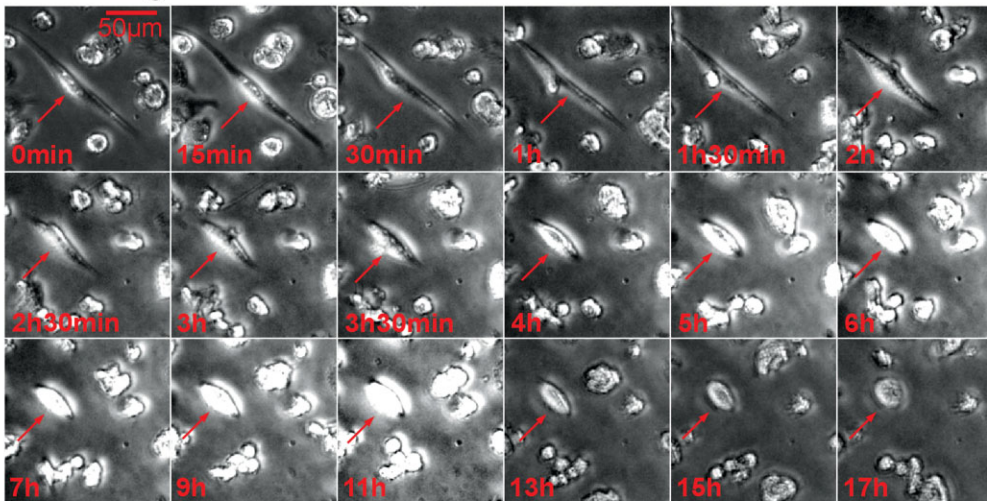
Co-transfected cells were classified according to their intracellular ASC expression patterns as either speck forming or having diffuse ASC localization (Fig. 5A). We determined that pyrin (both the wild type and all mutants) increased end-point speck formation rate of ASC, compared to ASC alone and the control (pcDNA3.1) group (Fig. 5B). Although pyrin-M680I and pyrin-V726A groups did not increase speck formation at a level of statistical significance ($P = 0.251$ and $P = 0.171$, respectively), pyrin-M694V caused a significant increase in the speck formation rate compared to the wild type pyrin ($P = 0.021$). When co-transfected cells were exposed to colchicine, speck formation decreased with all mutant forms of pyrin and with pcDNA 3.1 ($P < 0.0001$). However, the rate at which cells containing wild-type pyrin formed specks was not significantly affected by the presence of colchicine.

These data once more showed that ASC speck formation is facilitated by pyrin and reduced by colchicine in mutant pyrin expressing cells which is important given the known beneficial effects of colchicine in preventing FMF attacks.

COLCHICINE DECREASES PYRIN EXPRESSION IN DIFFERENTIATED THP-1 CELLS

We further analyzed whether colchicine influences the expression of pyrin and its interacting proteins in natively expressing cells. We used THP-1 cell line since COS7 and HeLa cells do not naturally express pyrin and its interacting proteins, PSTPIP1, ASC, and Siva. Different concentrations of colchicine; 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, and 250 ng/ml were used to treat differentiated (macrophage-like) THP-1 cells. Gene expression was measured

A - 100ng/ml Colchicine



B - After Colchicine Removal

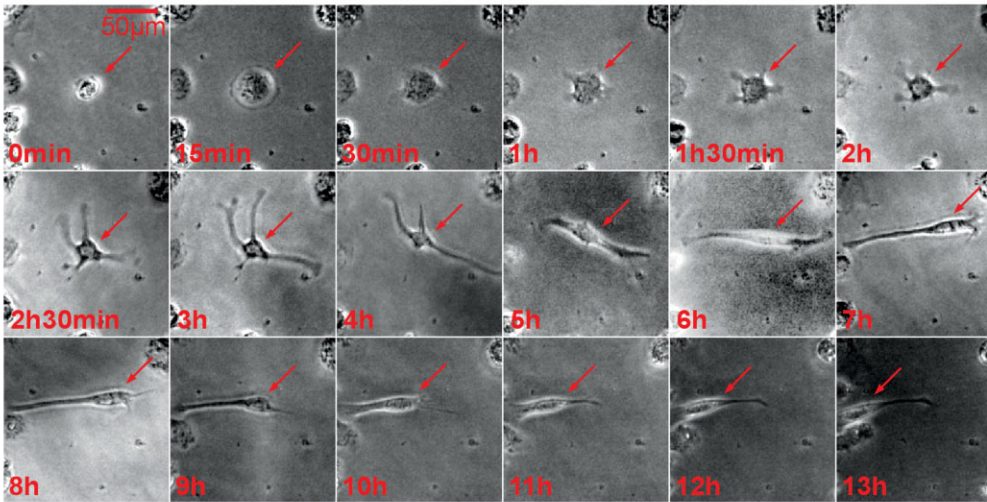


Fig. 3. Disruption and re-organization of filopodia in THP-1 cells. Phase contrast time-lapse imaging of differentiated THP-1 cells were performed and shown as pictures various time points as indicated. In medium containing 100 ng/ml colchicine (A), contraction of filopodia began immediately in the 1st hour. By the 4th hour of administration filopodia was totally contracted for this cell (indicated with arrow). In 17th hour of the experiment this cell totally lost its fusiform structure and assumed a round shape. B shows a round shaped differentiated THP-1 cell, priorly treated with 100 ng/ml colchicine, washed various times with fresh medium and now resting in medium with no colchicine. Several cell appendages begin to protrude from the main body by the end of the 1st hour. Around the 5th to 6th hour one of these appendages dominate and the cell assumes a spindle-like shape. At this time point the cell (indicated with arrow) also begins to migrate toward the left side of the area, with contraction of the filopodia that can be clearly seen from the 8th to 11th hour. This indicates a functional filopodia capable of promoting cell migration has developed for this cell after colchicine removal. Scale bars indicate 50 μ m.

using quantitative RT-PCR, and protein levels were measured using Western blot.

As shown in Figure 6A, a dramatic decrease in *MEFV* was observed compared to control cells at and above 100 ng/ml colchicine concentrations. Western blot analysis showed a decrease in protein expression similar to the decrease in transcription (Fig. 6B). A previous study has shown that LPS (bacterial lipopolisaccharide) treatment induces *MEFV* expression [Centola et al., 2000]. We confirmed that this is the case in our system. The addition of 100 ng/ml colchicine did not change the level of *MEFV*

up-regulation in response to LPS. However, exposure to 200 ng/ml of colchicine partially abrogated the LPS effect (Fig. 6A). We then quantified the *MEFV* expression at different treatment time points. *MEFV* were found to be down-regulated in the 6th hour of colchicine administration (Fig. 6C).

It is known that the protein product of an alternative splice variant of *MEFV* transcript lacking exon 2 locates in nucleus rather than cytoplasm [Papin et al., 2000]. In order to determine whether colchicine affects the production of this variant, we performed qRT-PCR on either control THP-1 cells, or those that had been treated

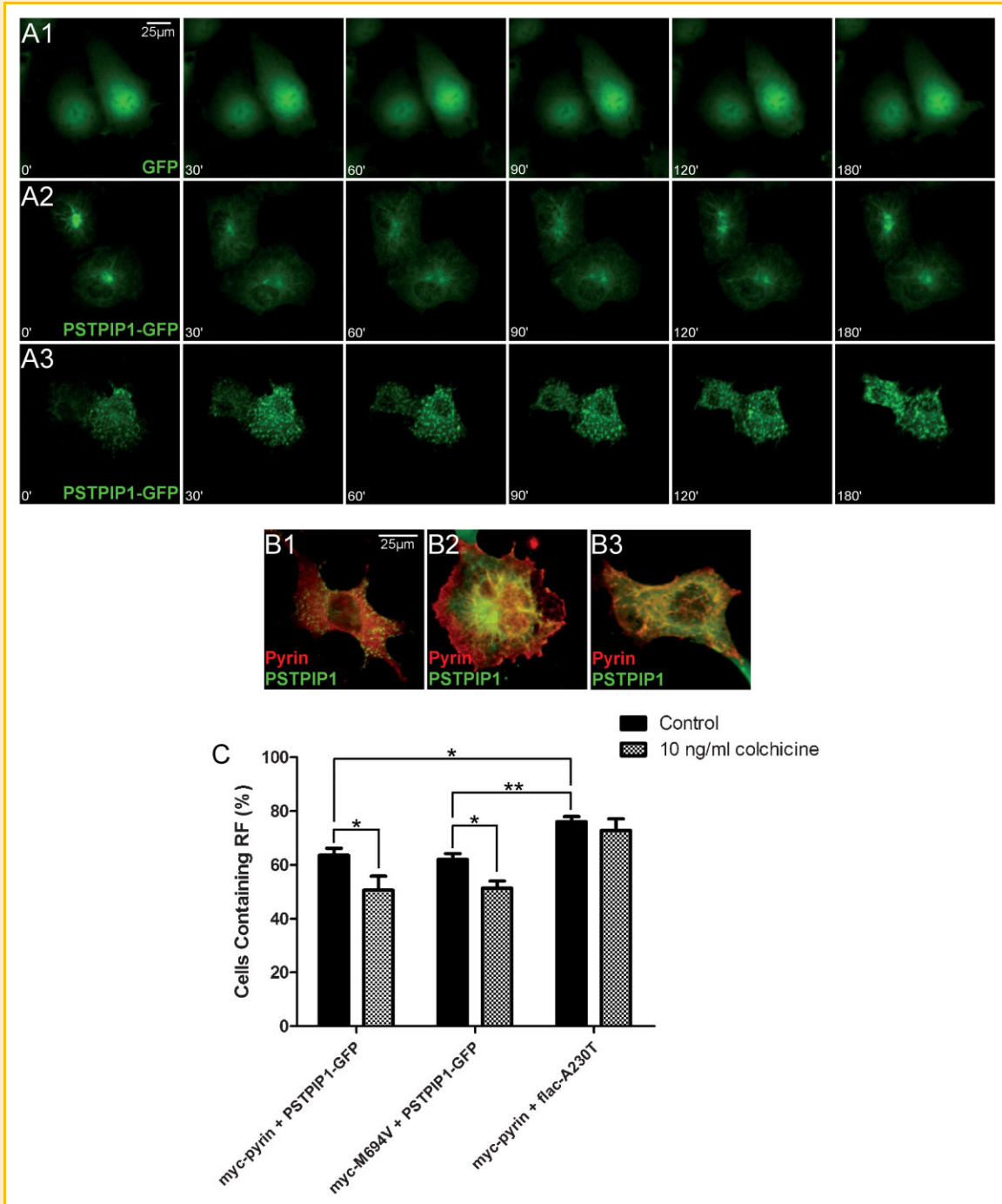


Fig. 4. PSTPIP1 reticulated fiber formation and effects of pyrin/PSTPIP1 mutants and colchicine in COS-7 cells. Time-lapse fluorescent images of COS-7 cells transfected with GFP (A1), PSTPIP1-GFP (A2), myc-pyrin, and PSTPIP1-GFP (A3) is shown in different time points as indicated. The 0' time point indicates the 18th hour of transfection. In A1 GFP is distributed in the cytoplasm as well as in the nuclei of the cells, without forming any organized structures. Unlike GFP, PSTPIP1-GFP gradually forms straight filaments in the cytoplasm originating from a single perinuclear region (A2). As a result of pyrin co-transfection, PSTPIP1-GFP gradually organizes within the cells by the 2nd hour of imaging and assumes a completely reticulated appearance by the 3rd hour (A3). Various intracellular structures in COS-7 cells co-expressing pyrin and PSTPIP1 are shown in (B); irregular PSTPIP1 aggregates (B1), PSTPIP1 fibers originating from a single perinuclear center (B2), reticulated PSTPIP1 fibrils co-localized with pyrin (B3). C: shows the percentage of reticulated PSTPIP1 fibril containing cells among transiently pyrin/PSTPIP1 co-transfected COS-7 cells. Error bars indicate standard deviations. The statistically significant differences are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bars indicate 25 μm .

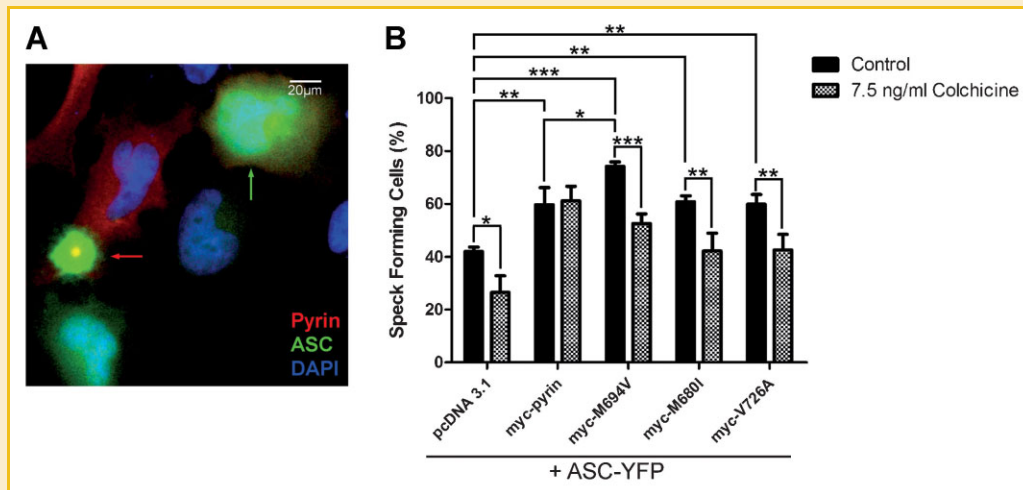


Fig. 5. Cellular localization of ASC and effects of pyrin mutants and colchicine on speck formation. In (A), two possible localization of ASC protein in myc-pyrin/ASC-YFP co-transfected HeLa cells is shown. The red arrow indicates a co-transfected HeLa cell with an ASC speck while the green arrow indicates a co-transfected cell showing a diffuse ASC distribution pattern both in the cytoplasm and nucleus. B shows the percentage of ASC speck forming cells among transiently pyrin/ASC co-transfected HeLa cells. ASC-YFP and wild-type (myc-pyrin) or mutant pyrin (myc-M694V, myc-M680I, and myc-V726A) transfected HeLa cells in the presence or absence of colchicine are indicated. Error bars indicate standard deviations. The statistically significant differences are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bars indicate 20 μm .

with colchicine using a primer pair that hybridizes to exon 2 and 3 (Table I). There was no difference between those two transcripts in terms of expression. Indeed, we did not quantify the amount of exon 2 skipped variant of *MEFV* since we just needed to check if a change in pyrin expression level is coming from a common variant or not, but our immunostaining study showed that pyrin is located only in the cytoplasm in both control and colchicine treated THP-1 cells (data not shown).

In contrast to pyrin, the transcription levels of *ASC*, *PSTPIP1*, and *Siva* were not affected by colchicine administration (Fig. 6D–F). However, like *MEFV*, *ASC*, and *PSTPIP1* were significantly up-regulated by LPS stimulation (4-fold and 1.5-fold, respectively). *Siva* transcription levels were not found to be changed by LPS.

Therefore, our findings showed that colchicine have a specific effect on *MEFV* expression as we expected since colchicine treatment is a criterion for the differential diagnosis of FMF.

DISCUSSION

In this study, we characterized the effect of colchicine on Pyrin and its interacting proteins on cellular level using transfection models in COS-7 and HeLa cells, and gene expression profiles in THP-1 cells. The unifying theme of all of the assays was the efficacy of colchicine for the treatment of FMF and the central question being: why is colchicine effective? The answer of this question may be summarized as follows according to our data: Colchicine may be working on several levels; (i) to reduce ASC speck formation as shown by other studies as well, using nocadazole, another microtubule depolymerizing agent, (ii) to alter intracellular distribution of *PSTPIP1* which is an important effect given the fact that there is a strong connection between *PSTPIP1* filaments and

the cytoskeleton, (iii) to alter actin on a cellular level, and (iv) to alter pyrin expression.

In this study, we first showed that reticulated fibril ratio was decreased by colchicine in Pyrin-PSTPIP1 co-transfected COS-7 cells. Although this decrease was by %10, the biological significance has to be investigated. Secondly we found that colchicine also decreases reticulated fibril formation when cells are transfected with Pyrin-M694V and wild type *PSTPIP1*. On the other hand, colchicine had no effect on reticulated fibril pattern when the cells were transfected with *PSTPIP1*-A230T and wild type Pyrin. However, the reticulated fibril ratio was dramatically increased in cells which were transfected with *PSTPIP1*-A230T and wild type pyrin, which corroborates earlier reports that mutant forms of *PSTPIP1* bind to Pyrin with higher affinity [Shoham et al., 2003; Yu et al., 2007].

There are several potential explanations for the increase in reticulated fibril formation in the presence of mutant *PSTPIP1*. The first possibility is that mutant *PSTPIP1* binds more tightly to Pyrin and they may form more reticulated fibrils together. For this reason, colchicine may not disrupt the pyrin-*PSTPIP1* interaction sufficiently to prevent or delay reticulated fibril formation. Secondly, *PSTPIP1*-A230T mutant protein may take a critically different conformation when compared to wild type *PSTPIP1* which would prevent a possible direct interaction between colchicine and *PSTPIP1*. Lastly and less possibly, colchicine may directly interact with other yet unidentified pyrin-interacting protein(s) which may facilitate reticulated fibril formation.

The effect of colchicine on the number of reticulated fibrils in the presence of mutant *PSTPIP1* is still unknown. It was demonstrated previously that *PSTPIP1* is involved in cell migration [Cortesio et al., 2010]. Certainly investigating the clinical significance and the biological impact of pyrin-*PSTPIP1* interaction on cell functions remains unanswered.

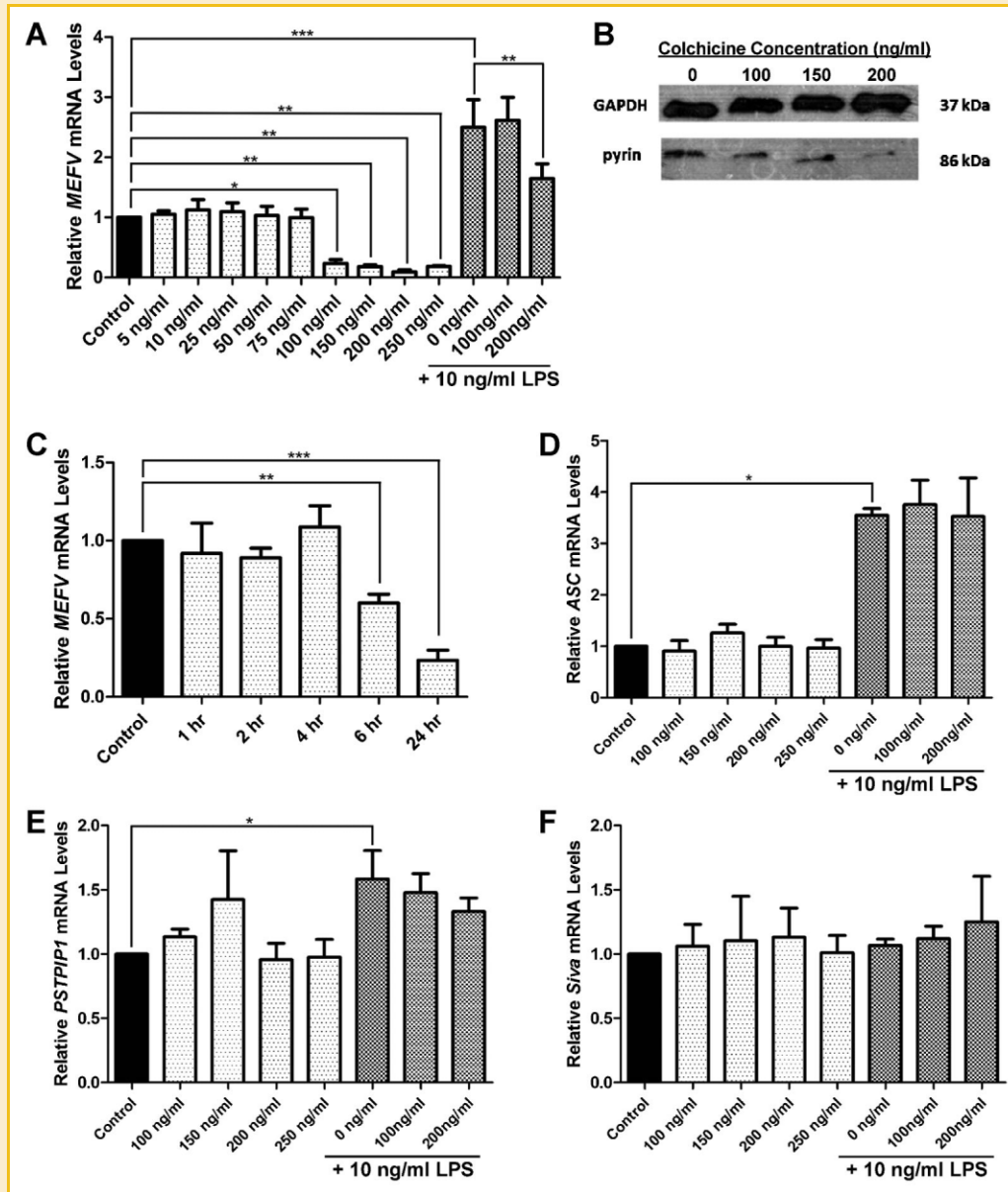


Fig. 6. The expression analysis of pyrin and its interacting proteins in colchicine treated THP-1 cells. A,D,E,F: Shows the quantitative real-time PCR results for *MEFV*, *ASC*, *PSTPIP1*, and *Siva* mRNA products after THP-1 cells are cultured for 24 h exposed to different colchicine concentrations, normalized to the housekeeping *ACTB*, respectively. Western Blot analysis for pyrin in THP-1 cells treated with different concentrations of colchicine for 24 h is shown in (B). C: Shows *MEFV* expression levels in THP-1 cells exposed to 100 ng/ml colchicine at different time points. Error bars indicate standard deviations. The statistically significant differences are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Another important structure is the ASC speck, which resembles the pyroptosome. Colchicine decreases ASC speck formation in the absence of pyrin in a concentration that does not affect the gross microtubular architecture. This implies that the effect of colchicine may be through some other mechanism that does not involve microtubules. It has been previously shown that in transfected HeLa cells, ASC speck formation is likely due to its diffusion rather than its interaction with other proteins according to computational models drawn through real time kinetic analysis of speck formation [Cheng et al., 2010]. This leads to the speculation that the decrease in ASC speck formation may be the direct result of an interference of

colchicine on ASC polymerization. On the other hand, even if ASC speck formation occurs via microtubules, in order to disrupt the interaction of ASC and microtubules, microtubule depolymerization is not necessary.

Another important element to consider is that the colchicine's speck-disrupting effect is not seen in cells expressing wild-type pyrin, but only in M694V, M680I, and V726A pyrin-expressing cells. However, these three mutations promote speck formation further compared to wild type Pyrin in the absence of colchicine. So, colchicine acts as to bring down the speck formation rates to those of wild type pyrin in these mutants. This may be the main mechanism

how FMF patients benefit from colchicine. The increased tendency of pyroptosis initiation and inflammasome activation through ASC speck formation with disease-causing pyrin variants could be countered by non-microtubule depolymerizing concentrations of colchicine, and this would decrease the rate, severity, and consequences of inflammatory attacks in FMF patients. In particular, the increased tendency of HeLa and COS7 cells to undergo cell death while over-expressing ASC for long periods of time is important in the sense that ASC is the only known initiator of pyroptosis [Yu et al., 2007]. The severe FMF phenotype associated with M694V homozygotes and the increase in speck formation in M694V-expressing HeLa cells observed in our experiments also support this idea. Although the mechanism of action of colchicine proposed here requires further validation by *in vivo* experiments, these findings are very promising for elucidating FMF pathogenesis and colchicine action.

Regulation of *MEFV* expression in response to colchicine treatment has been investigated previously. One study demonstrated that *MEFV* is up-regulated in response to colchicine in monocytes [Centola et al., 2000]. On the other hand, it is repressed in monocytes by the anti-inflammatory cytokines. In neutrophils, colchicine and LPS had no effect while IFN- γ causes an increase in *MEFV* expression. Furthermore, another group showed reduced *MEFV* levels in FMF patients (59% of these patients received colchicine) [Notarnicola et al., 2002]. Also, in the same study, there were no differences between colchicine treated and non-treated patients in terms of *MEFV* levels.

Based on the hypothesis that colchicine may have a specific effect on *MEFV* expression, differentiated THP-1 cells were exposed to different concentrations of colchicine. qRT-PCR and western blot studies revealed that colchicine reduces *MEFV* expression compared to control cells. These results stand in contrast to previous studies in terms of *MEFV* expression [Centola et al., 2000; Notarnicola et al., 2002]. This is likely due to the fact that firstly, we have determined colchicine concentration after careful titration by observing microtubule architecture, and could be seeing more specific effects of colchicine on cellular level. Secondly, we used PMA-differentiated THP-1 cells instead of primary monocytes/neutrophils or whole blood cells of FMF patients. In patients, the isolated cells are (a) exposed chronically rather than acutely to colchicine and (b) the isolated cell population that is tested is often a mixed population of mature and immature cells whereas the differentiated cell line is expected to respond more uniformly. *MEFV* and ASC were up-regulated by LPS in our experiments, similar to previous studies [Centola et al., 2000; Masumoto et al., 2006]. We also found that *PSTPIP1* expression was increased by LPS. This finding lends additional support to the idea of co-action of these three proteins in regulating innate immunity.

How colchicine down-regulates *MEFV* expression in THP-1 cells and what clinical significance this finding holds remains to be answered. Since, in our experiments stress fibers and shorter filopodia were observed in colchicine treated THP-1 cells, we suggest that colchicine-induced effects on actin re-organization may reduce *MEFV* levels. Colchicine seems to cause actin re-organization while microtubule structure is intact. As previously demonstrated, pyrin is an actin binding protein that is found

specifically in polymerizing actin filaments [Waite et al., 2009b]. Pyrin, or *MEFV* transcription, may also be affected by this re-organization of the actin cytoskeleton, which may explain why reduced *MEFV* levels were observed after colchicine administration. The data presented here reveal an important connection between colchicine and *MEFV* transcription, which has potential to explain the remarkable efficacy of colchicine in preventing FMF attacks by reducing the mutant protein level in FMF patients. Therefore, our data provide evidence for a pro-inflammatory role of pyrin, suggesting that FMF may result from gain of function mutations.

Here, we have clarified the effect of colchicine on pyrin and its interacting partners on both a cell biology and expression level. It has been thought that inhibition of microtubule polymerization is the main mechanism of action of colchicine. However, our results indicate that further exploration into the exact cellular mechanism explaining the efficacy of colchicine in suppressing FMF attacks is warranted.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Deborah Gumucio (University of Michigan) for kindly providing all constructs and for valuable advice; Dr. Andrea Waite for helpful discussions in the process of preparing the manuscript.

REFERENCES

- Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Hu C, Richards N, Staubach-Grosse A, Yilmaz E, Gumucio DL. 2008a. Pyrin, product of the *MEFV* locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *J Cell Physiol* 216(3):595–602.
- Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Schaner P, Taskiran ZE, Richards N, Orhan D, Gucer S, Ozen S, Gumucio D, Yilmaz E. 2008b. Expression of ASC in renal tissues of familial mediterranean fever patients with amyloidosis: Postulating a role for ASC in AA type amyloid deposition. *Exp Biol Med* (Maywood) 233(11):1324–1333.
- Bergsbaken T, Cookson BT. 2009. Innate immune response during *Yersinia* infection: Critical modulation of cell death mechanisms through phagocyte activation. *J Leukoc Biol* 86(5):1153–1158.
- Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O’Shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. 2000. The gene for familial Mediterranean fever, *MEFV* is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 95:3223–3231.
- Chae JJ, Aksentjevich I, Kastner DL. 2009. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol* 146(5):467–478.
- Cheng J, Waite AL, Tkaczyk ER, Ke K, Richards N, Hunt AJ, Gumucio DL. 2010. Kinetic properties of ASC protein aggregation in epithelial cells. *J Cell Physiol* 222(3):738–747.
- Cong F, Spencer S, Cote JF, Wu Y, Tremblay ML, Lasky LA, Goff SP. 2000. Cytoskeletal protein *PSTPIP1* directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation. *Mol Cell* 6:1413–1423.
- Cortese CL, Wernimont SA, Kastner DL, Cooper KM, Huttenlocher A. 2010. Impaired podosome formation and invasive migration of macrophages from patients with a *PSTPIP1* mutation and PAPA syndrome. *Arthritis Rheum* 62(8):2556–2558.
- Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5(1):e8668.

- Diaz A, Hu C, Kastner DL, Schaner P, Reginato AM, Richards N, Gumucio DL. 2004. Lipopolysaccharide-induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: A prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 50:3679–3689.
- Livneh A, Lengevitz P, Zewer D. 1997. Criteria for the diagnosis of FMF. *Arthritis Rheum* 40:1879–1885.
- Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, Pras E. 1999. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 6:1–6.
- Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, Hidaka E, Katsuyama T, Higuchi T, Sagara J. 1999. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 274(48):33835–33838.
- Masumoto J, Kobayashi H, Nakamura T, Kaneko Y, Ota H, Hasegawa M, Kobayashi Y, Suzuki T, Matsuda K, Sano K, Katsuyama T, Inohara N. 2006. Regulation of the ASC expression in response to LPS stimulation is related to IL-8 secretion in the human intestinal mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 346(3):968–973.
- Niel E, Scherrmann JM. 2006. Colchicine today. *Joint Bone Spine* 73:672–678.
- Notarnicola C, Didelot MN, Kone-Paut I, Seguret F, Demaille J, Touitou I. 2002. Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 46(10):2785–2793.
- Papin S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey-Moisan M, Dargemont C, Amselem S. 2000. Alternative splicing at the MEFV locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostin/pyrin protein to the nucleus. *Hum Mol Genet* 9:3001–3009.
- Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. 2001. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276(42):39320–39329.
- Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull KM, Wood G, Wise CA, Kastner DL. 2003. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23):13501–13506.
- The International FMF Consortium. 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90:797–807.
- Waite AL, Schaner P, Richards N, Balci-Peynircioglu B, Masters SL, Brydges SD, Fox M, Hong A, Yilmaz E, Kastner DL, Reinherz EL, Gumucio DL. 2009a. Pyrin modulates the intracellular distribution of PSTPIP1. *PLoS One* 4(7):e6147.
- Waite AL, Schaner P, Hu C, Richards N, Balci-Peynircioglu B, Hong A, Fox M, Gumucio DL. 2009b. Pyrin and ASC co-localize to cellular sites that are rich in polymerizing actin. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(1):40–52.
- Wise CA, Gillum JD, Seidman CE, Lindor NM, Veile R, Bashiardes S, Lovett M. 2002. Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTPPEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Hum Mol Genet* 11(8):961–969.
- Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P, Wu J, Juliana C, Solorzano L, McCormick M, Zhang Z, Alnemri ES. 2007. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell* 28:214–227.
- Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. 1986. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 314:1001–1005.