

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (AAA) HASTALARINDA İNFLAMATUVAR
HÜCRE GÖÇÜNÜN İNCELENMESİ

Edibe AVCI

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2016

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ (AAA) HASTALARINDA İNFLAMATUVAR
HÜCRE GÖÇÜNÜN İNCELENMESİ

Edibe AVCI

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU

ANKARA

2016

Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji
Program :Tıbbi Biyoloji
Tez Başlığı :Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında İnflamatuvar Hücre Göçünün
İncelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı :Edibe Avcı
Savunma Sınavı Tarihi :10.02.2016

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

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Serap Dökmeci
Hacettepe Üniversitesi
Tez danışmanı: Doç. Dr. Banu Peynircioğlu
Hacettepe Üniversitesi
Üye: Doç. Dr. Yunus Kasım Terzi
Başkent Üniversitesi
Üye: Yrd. Doç. Dr. Burcu Hayta
Hacettepe Üniversitesi
Üye: Yrd. Doç. Dr. Ekim Taşkiran
Hacettepe Üniversitesi

ONAY

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


Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisiyle bana yol gösteren ve değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Banu Peynircioğlu'na,

Tez çalışmama değerli yorumları ile katkıda bulunan tez jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Serap Dökmeci, Doç. Dr. Yunus Kasım TERZİ, Yrd. Doç. Dr. Burcu BALCI HAYTA ve Yrd. Doç. Dr. Ekim TAŞKIRAN'a,

Tez çalışmam süresince klinik bilgilerinden ve imkanlarından yararlanmamı sağlayan Pediatrik Romatoloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Seza ÖZEN'e ve çalışmalarım süresince katkı sağlayan ve büyük özveri göstererek en yoğun zamanlarında bile bilgisini, desteğini benden esirgemeyen sayın Uzm. Dr. Ezgi Deniz BATU'ya,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve eğitimim süresince bana katkıda bulunan tüm değerli hocalarıma,

Çalışma sürecinde yardımlarına, fikirlerine, bilgi birikimine ve deneyimlerine başvurduğum çalışma arkadaşım Uzm. Bio. Yeliz Z. AKKAYA ULUM'a,

Her daim yanımda olan, bu yolda birlikte yürüdüğümüz ve her zaman desteklerini hissettiğim, motivasyon kaynağım sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü fedakarlığı gösteren ve ilerlemem için elinden geleni yapan en büyük destekçim canım babama, sevgili anneme ve kıymetlim olan kardeşime,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Avacı E. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalarında İnflamatuvar Hücre Göçünün İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016. Ailevi Akdeniz ateşi (AAA), Pyrin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonlar sonucu oluşan otoinflamatuvar bir hastalıktır. AAA patogenezinden sorumlu Pyrin proteininin işlevi halen bilinmemekle beraber, ilişkide olduğu proteinler aracılığıyla inflamatuvar yollarda görev aldığı düşünülmektedir. Literatürde Pyrin'in proinflamatuvar bir düzenleyici olabileceği fikrini destekleyen çalışmalar mevcuttur. Tez çalışması kapsamında, klinik değerlendirmeler sonucu AAA tanısı almış ve genetik analizler ile her iki alleli de M694V mutasyonu için homozigot olduğu gösterilmiş 12 hasta ve 11 kontrol bireyden alınan kan örneklerinden izole edilen nötrofil hücrelerinde inflamatuvar hücre göçü araştırılmıştır. Hücreler, inflamatuvar göçü tetiklemek amacıyla fMLP (*N-formyl-Met-Leu-Phe*) ile uyarılmıştır. Filtre deneyleri ile kemoatraktan gradiyenti boyunca göç eden sağlıklı ve hasta bireylerin hücreleri sayı bakımından karşılaştırılmıştır. fMLP uygulanmış ve fMLP uygulanmamış koşulda hasta nötrofillerinde kontrol nötrofillerine kıyasla hücre göçü oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0.05$). Floresan boyama yöntemi ile polarizasyon oranları çıkarılmıştır. Bu boyamaların sonucuna göre, uyarılan hasta nötrofillerinde %52 oranında, kontrol bireylerde ise %40 oranında polarizasyon gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Ek olarak, hasta ve kontrol nötrofillerinde Pyrin proteininin aktin ile beraber polarize uçtaki eş yerleşimi gösterilmiştir. Elde edilen bu bulgular, Pyrin'in inflamatuvar süreçte pro-inflamatuvar bir molekül olarak işlev gördüğü ve AAA hastalarında artan hücre göçü nedeniyle ağır bir klinik fenotipe yol açabileceği hipotezini desteklemektedir. Sonuç olarak, bu çalışmanın Pyrin proteininin inflamatuvar hücre göçündeki olası rolünü aydınlatmaya yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: AAA, inflamasyon, nötrofil, hücre göçü, Pyrin, aktin

ABSTRACT

Avcı E. Investigation of inflammatory cell migration in familial Mediterranean fever (FMF) patients. Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2016. Familial Mediterranean fever (FMF) is an autoinflammatory disease caused by mutations in MEFV gene encoding Pyrin protein. Although the function of Pyrin responsible for FMF pathogenesis is unknown, it is considered to regulate inflammatory pathway via interactions with its protein partners. There is a growing data supporting the view that Pyrin may be a proinflammatory regulator. In this study, inflammatory migration was investigated in primary neutrophils isolated from blood samples of 11 healthy individuals and 12 FMF patients that are homozygous for M694V mutation. fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) was used to stimulate cells in order to trigger inflammatory migration. Neutrophil migration rate of FMF patients and healthy individuals were quantified by filter assays. Both non-fMLP and fMLP-mediated chemotaxis in patient cells were increased significantly compared to healthy individuals ($p<0.05$). The polarization rates between individuals were detected by fluorescence staining. The polarization rate of neutrophils, for fMLP-mediated condition was over 52% in FMF patients while it was 40% in healthy controls ($p<0.05$). In addition, Pyrin-actin co-localization was shown in neutrophils of FMF patients and healthy controls. These results suggest that Pyrin may play a crucial role as a pro-inflammatory regulator in inflammation and increase neutrophil migration in FMF patients. Consequently, this study may hopefully contribute to enhance our understanding of potential role of Pyrin in inflammatory cells during inflammation.

Key words: FMF, inflammation, neutrophil, cell migration, Pyrin, actin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi	3
2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Klinik Özellikleri	3
2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi'nde Tanı ve Tedavi	4
2.4. MEFV Geni	6
2.5. Pyrin Proteini	7
2.6. İnflamatuvar Hücre Göçü Ve Nötrofiller	13
2.7. Amaç	17
3. Gereçler Ve Yöntemler	18
3.1. Gereçler	18
3.1.1. Nötrofil İzolasyonu	18

	Sayfa
3.1.2. Hücre Kültürü	18
3.1.3. Floresan Boyama	18
3.1.4. Filtre Deneyi	19
3.2. Çalışmaya Katılan Bireyler	20
3.3. Deney Planı	23
3.4. Yöntemler	24
3.4.1. Nötrofil İzolasyonu	24
3.4.2. Hücre Kültürü	25
3.4.3. Floresan Boyama	26
3.4.4. İmmünfloresan Boyama	28
3.4.5. Verilerin Değerlendirilmesi Ve İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Klinik Durumları İle İlgili Özellikleri	31
4.2. Filtre Deneyi İle Hücre Göçü Oranının Karşılaştırılması	34
4.3. Hücrelerde Polarizasyon Oranının Karşılaştırılması	36
4.4. Pysin Proteininin Hücre İçi Yerleşiminin Belirlenmesi	43
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
6.1. Sonuçlar	56
6.2. Öneriler	57
KAYNAKLAR	58

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı



SİMGELER VE KISALTMALAR

AAA	Ailevi Akdeniz Ateşi
AF488	Alexa Flour 488
AF568	<i>Alexa Flour 568</i>
ASC	<i>Apoptosis associated Speck like with a Caspase-recruitment domain</i>
BB-ZF	B-box zinc finger
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bZIP	<i>basic leucine ZIPper</i>
CAPS	<i>cryopyrin-associated periodic syndromes</i>
CC	<i>Coiled-coil</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
ChIP-Seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>
COS-7	<i>CV-7 in Origin from kidney cells, carrying the SV40</i>
DAPI	<i>4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole</i>
DAAM1	<i>Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1</i>
ESR	<i>Erythrocyte Sedimentation Rate</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionine- leucine-phenylalanine</i>
FPR1	<i>N-formyl peptide receptor 1</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptors</i>

HL-60	<i>Human Leucemia 60</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
ICAM-2	<i>Intercellular Adhesion Molecule-2</i>
IF	<i>Immunofluorescence</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
kDa	<i>KiloDalton</i>
KI	<i>Knockin</i>
L	<i>Litre</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LPXN	<i>Leupaxin</i>
LSP-1	<i>Leukocyte-specific protein 1</i>
M	<i>Molar</i>
MEFV	<i>MEditerranean FeVer</i>
mm	<i>Milimetre</i>
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
PAPA	<i>Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1</i>

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS(T)	<i>PBS with Tween-20</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PSTPIP1	<i>Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1</i>
PSTPIP2	<i>Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 2</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rho	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RA	<i>Rheumatoid Arthritis</i>
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAA	<i>Serum Amyloid A</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLE	<i>Systemic lupus erythematosus</i>
TRAPS	<i>Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1-associated periodic syndrome</i>
TRIM20	<i>Tripartite motif 20</i>
THP-1	<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>

U937

Human leukemic monocytic lymphoma cell line

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Pyrin proteininin yapısı.	7
2.2. Pyrin-GFP ile transfekte edilen HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sistemindeki göç hareketi.	11
2.3. Nötrofile farklılaştırılmış ve göçe uyarılmış HL-60 hücresinin polarize ucunda aktif aktin ve Pyrin birlikte yerleşimi.	11
2.4. Nötrofile farklılaştırılmış ve göçe uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN ve Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin birlikte yerleşim konfokal görüntüleri ve profil ile korelasyon eğrileri.	12
2.5. Nötrofile farklılaştırılmış ve göçe uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin'in siRNA teknolojisi ile ifadesinin susturulması sonrası elde edilen konfokal görüntüsü ve profil ile korelasyon eğrileri.	12
2.6. Kan dolaşımında bulunan nötrofillerin inflamatuvar bölgeye göç etmesi.	15
2.7. Nötrofil hücresinin bir kemokin gradiyent boyunca polarite kazanmasını sağlayan sinyal yolları.	16
3.1. AAA hastalarının ve kontrol bireylerin klinik değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler.	22
3.2. Total kandan nötrofil izolasyonu.	24

Şekil	Sayfa
3.3. Hücre kültürü petrisinin kuyusuna yerleştirilen filtre ve kompartmanları.	25
4.1. Kontrol bireyler ile iyi gidişli ve ataklı AAA hastalarına ait CRP ve ESH değerlerinin dağılımını gösteren grafik.	33
4.2. İyi gidişli ile ataklı hasta ve kontrol nötrofillerinin, fMLP uygulanmamış ve 100 nM fMLP uygulanmış koşul için Kalsein-AM boyama görüntüleri.	34
4.3. Hasta ve kontrol nötrofillerinin filtrenin fMLP içermeyen (besiyeri) ve fMLP içeren alt kompartmanlara gerçekleştirdiği hücre göçü oranının karşılaştırıldığı grafik (* Mann-Whitney test, $p<0.05$).	35
4.4. fMLP ile uyarılmış nötrofil hücrelerinde aktin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyaması görüntüleri (orijinal büyütme: 63X). (a) Aktin polarizasyonu gerçekleşmemiş hücreler. Hücrede aktin iskeleti boyanmıştır ancak polarizasyon gözlenmemektedir. Hücre yuvarlak morfolojisini korumaktadır. (b) Aktin polarizasyonu gerçekleşmiş hücreler. Hücrenin ön kısmında bulunan polarize bölgede yoğun bir aktin boyanması gözlenmektedir. Hücre uzantı atarak yuvarlak morfolojisini kaybetmiştir.	36
4.5. Kontrol nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri.	38

Şekil	Sayfa
4.6. İyi gidişli AAA hastası nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri.	39
4.7. Ataklı AAA hastası nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri.	40
4.8. Ataklı ile iyi gidişli hasta ve kontrol nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri (Orijinal Büyütme: 63X-Zoom).	41
4.9. Hasta ve kontrol nötrofillerinin fMLP uygulanmamış (besiyeri) ve fMLP uygulanmış koşuldaki polarizasyon oranı (* *Mann-Whitney test, $p<0.05$).	42
4.10. fMLP ile uyarılmamış koşulda kontrol bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.	44
4.11. fMLP ile uyarılmamış koşulda yeni tanı almış hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.	45
4.12. fMLP ile uyarılmamış koşulda iyi gidişli hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.	46
4.13. fMLP ile uyarılmış koşulda kontrol bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.	47

Şekil	Sayfa
4.14. fMLP ile uyarılmış koşulda yeni tanı almış hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.	48
4.15. fMLP ile uyarılmış koşulda iyi gidişli hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.	49



TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Set 1ve 2’deki bireylere ait klinik bilgiler.	20
3.2. Floresan ile immünfloresan boyama ve filtre deneyleri için oluşturulmuş setler (*H: kolşisine iyi cevap veren ve atak geçiren AAA hastaları, **K: sağlıklı kontrol bireyler).	23
4.1. Tez çalışmasına katılan hastaların ve kontrol bireylerin klinik durumları ile ilgili özellikleri ve gruplandırma.	31

1. GİRİŞ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) (MIM 249100), en sık görülen ve otozomal resesif olarak kalıtılan monogenik bir otoinflamatuvar hastalıktır. Otoinflamatuvar hastalıklar, doğal bağışıklık sistemi hastalıklarının oldukça geniş bir grubunu oluşturmaktadır. Klinik inflamasyona ve yüksek miktarda akut-faz reaktan salınımına neden olan doğal bağışıklık sisteminin anormal aktivasyonu ile karakterize bir hastalık grubu olan otoinflamatuvar hastalıklar arasında *TNF receptor-associated periodic syndrome* (TRAPS), *cryopyrin-associated periodic syndromes* (CAPS), *mevalonate kinase deficiency/hyperimmunoglobulin D syndrome* (MKD/HIDS) ve Crohn hastalığı bulunmaktadır. Tekrarlayan ateş ataklarının görüldüğü bu hastalıklar arasında, AAA en iyi anlaşılmış ve sorumlu geni ilk tanımlanmış olan hastalıktır (1-3).

İnflamatuvar bölgeye yoğun bir hücre göçünün gözlemlendiği AAA, MEFV (Mediterranean FeVer) (MIM 608107) geninde meydana gelen pek çoğu yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (4). MEFV geninin kodladığı Pyrin proteininin doğal bağışıklık sistemi elemanlarından biri olan nötrofillerde esas olarak ifade olduğu bilinmektedir. Nötrofiller, hasarlı dokuya ilk ulaşan hücreler olup diğer bağışıklık sistemi hücrelerini de aynı bölgeye çeken güçlü bir immün cevap oluştururlar. Bu özellikleri nedeniyle, hastalık patogenezinin anlaşılması açısından önemli bir hücre grubu olarak kabul edilirler (5).

Literatürde, AAA patogenezinin sorumlu Pyrin'in işlevi halen tartışmalı olmakla beraber inflamasyonda anti-inflamatuvar ya da pro-inflamatuvar bir düzenleyici olarak rol oynadığına dair çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Pyrin'in *domainleri* aracılığıyla interaksiyona girdiği proteinler ile birlikte inflamasyon ve inflamasyonla ilişkili süreçlerin düzenlenmesinde çeşitli yollar üzerinden etkili olduğu düşünülmektedir (4, 6). Pyrin'in aktin başta olmak üzere hücre iskeleti elemanları ile yakın ilişki içinde olması inflamatuvar hücre göçünde önemli bir rolünün olduğuna işaret etmektedir (7).

Hücre hatları ya da hayvan modellerinin kullanıldığı pek çok çalışmada, Pyrin proteininin kaspaz-1 ve NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) aktivasyonunu düzenlediği

ve pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β sentezinin gerçekleşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (8, 9). Bu bilgiler doğrultusunda, Pyrin'in pro-inflamatuvar bir molekül olarak işlev grdğu ve AAA hastalarında hücre göçünü arttırarak ağır bir klinik fenotipe yol açtığı hipotezi kurulmuştur.

AAA tanısı almış ve her iki allelinde de M694V mutasyonu taşıdığı saptanmış kolşisine iyi cevap veren 8 AAA hastası, atak geçiren 2 AAA hastası, yeni tanı almış ve atak geçiren 2 AAA hastası ve 11 kontrol bireyden alınan kan örneklerinden nötrofil hücreleri izole edilmiştir. Sağlıklı ve hasta bireylerin hücre göçü özelliklerini karşılaştırmak için immünfloresan boyama tekniği ile polarizasyon yüzdeleri belirlenmiş ve Pyrin-aktin birlikte yerleşimi gösterilmiştir. Filtre deneyleri ile kemoatraktan gradiyenti boyunca göçü eden hücrelerin kantitasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan alışmalar ile sağlıklı bireylerden ve AAA hastalarından elde edilen nötrofil hücrelerinde, Pyrin proteininin inflamatuvar hücre göçündeki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

AAA, etnik dağılım gösteren bir hastalık olup yaygın olarak Akdeniz kökenli insanlarda, özellikle Ermeni, Arap, Yahudi, Kuzey Afrika ve Türk toplumlarında görülmektedir. Hafif fenotiple ilişkili mutasyonların daha sık olduğu Avrupa toplumlarında da hastalığın görüldüğünü bildiren çalışmalar mevcuttur (10). AAA prevalansının Ermenilerde 1/500, Yahudilerde 1/250-1000, Aşkenazi Yahudilerinde 1/73000, Araplarda 1/2600 ve Türklerde 1/1000 olduğu gösterilmiştir. AAA prevalansı, erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (E/K oranı: 1.5–2:1). Taşıyıcı frekanslarının ise Ermenilerde 1/3, Sefarad Yahudilerinde 1/5-10, Aşkenazi Yahudilerinde ve Türklerde 1/5 olduğu bilinmektedir (10, 11, 12).

AAA hastalığı, 16. kromozomun kısa koluna (16p13.3) yerleşmiş olan MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (13). Türk toplumunda en sık görülen mutasyonlar sırasıyla M694V (%51.4), M680I (%14.4) ve V726A (%8.6)'dır (14, 15). Şu ana kadar, AAA hastalığı ile ilişkili 310 varyant tanımlanmıştır (16).

2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi'nin Klinik Özellikleri

AAA, tekrarlayan spontan ateş atakları ile karakterize, sistemik otoinflamatuvar bir Mendel kalıtımı hastalığıdır. Serozal boşlukları tutan inflamasyon cevabı, yoğun nötrofil göçü ve ona eşlik eden akut-faz inflamatuvar belirteçler (lökositosis, eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein, fibrinojen, serum amiloid A) ile sitokin (IL-6, IL-8) miktarlarının yükselmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastaların %85'inden fazlasında, ilk atak 20 yaşından önce gerçekleşmektedir. Akut inflamasyon atakları genellikle kısa sürelidir (1-3 gün). Nadir olsa da, bazı hastalarda 1 hafta ile 1 ay arasında değişen uzunlukta atakların görüldüğü bildirilmiştir. Çoğu hasta ataklar arasında asemptomatik kalmaktadır (10, 17,18).

AAA hastalığının en ağır komplikasyonu sistemik reaktif amiloidozdur. Amiloidoz, bir akut-faz reaktanı olan serum amiloid A (SAA) proteininin fibril yapısında dokuda birikmesi sonucu oluşur. Amiloid birikimi böbrek, böbrek üstü bezleri, kalp, karaciğer, ince bağırsaklar ve tiroid bezlerinde görülmektedir. AAA hastalarında ise, en sık böbrek amiloidozu gelişmekte ve amiloid birikimine bağlı olarak böbrek yetmezliği ortaya çıkmaktadır (19).

2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi'nde Tanı ve Tedavi

AAA tanısında, hastalığa özgül olmayan ancak klinik şüpheyi destekleyici şekilde kullanılan inflamasyon belirteçleri bulunmaktadır. Akut-faz reaktanlar, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve lökosit sayısı en sık başvurulanan inflamasyon belirteçleridir. Akut-faz reaktanlar, akut ya da kronik inflamasyon sonucunda dokuda artış gösteren sitokinlerin etkisi ile karaciğerden salınan proteinlerdir. Bu proteinler arasında C-reaktif protein, fibrinojen, serum amiloid A, kompleman proteinleri ve ferritin bulunmaktadır. Klinikte akut-faz cevabın değerlendirilebilmesi için en sık kullanılan değerler eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve C-reaktif protein (CRP) testleridir. Bu değerlerin enfeksiyon, vaskülit, artrit, travma ve malign hastalıklarda artış gösterdiği bilinmektedir (20).

Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), kullanılan en eski laboratuvar testlerinden birisi olup bir santrifüj yardımıyla eritrositlerin dik konuma getirilmiş bir tüp içerisinde saatteki çökme hızının milimetre (mm) olarak değeridir. 1926'da bulunan klasik *Westergren* metodunun geliştirilmesi ile ortaya çıkan bu yöntem, inflamatuvar hastalıklar açısından klinik şüpheyi destekleyici bir test olarak kullanılmaktadır. ESH'nin kandaki artışı sadece enfeksiyona bağlı inflamasyonla değil, romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematozus (SLE), doku nekrozu ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi steril inflamasyon koşulları ile de ilişkilendirilmektedir. Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç kullanımı, ESH değerini düşürebilmektedir (21). Kronik hastalıklarda, ESH yükselmesi ile bir plazma proteini olan fibrinojenin kandaki artışı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Buna göre, eritrositlerin hücre membranları negatif yüklüdür. Eritrositler arasındaki itme

kuvvetini arttıran negatif yükler sebebiyle kümeleşme gerçekleşmez. Ancak pozitif yüklü akut-faz reaktan proteini olan fibrinojenin karaciğerden salınımının artışı ile eritrositler arasındaki itme kuvveti azalır ve plazma içerisindeki çökme hızları artar. Dolayısıyla, fibrinojen düzeyini arttıran inflamatuvar koşullar, ESH değerini de yükseltir (22,23).

C-reaktif protein ise, *Streptococcus pneumoniae*'nin C-polisakkaridini çöktürmesi sebebiyle bu ismi almıştır. Sistemik inflamasyonun yüksek duyarlılıktaki serum belirtecidir. CRP, inflamasyon belirteci olarak kullanılmasının yanı sıra, klasik kompleman yolağını aktive ederek konak savunmasına katkı sağlayan pro-inflamatuvar bir düzenleyici olarak da işlev görmektedir. Atak geçirmeyen AAA hastalarının %30-90'ında kolşisin tedavisine rağmen, CRP düzeyi artabilmektedir (17, 24).

CRP sentezi, inflamasyon esnasında dokudan salınan IL-6 uyarımı sonucu hepatositlerden gerçekleşmektedir. Diğer inflamatuvar belirteçler ile kıyaslandığında, mevsimsel veya sirkadyan varyasyon olmayışı, açlık ve tokluk durumunda değişim gözlenmemesi, inflamasyonu takip edebilmek için CRP'yi en güvenilir değerlerden biri yapmaktadır (25, 26). Sağlıklı bireyler arasındaki CRP varyasyonlarının genom farklılığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, CRP genindeki GT tekrarlarının ve IL-6 genindeki polimorfizmin, sağlıklı bireyler ve SLE hastaları arasındaki CRP düzeyi farklılıklarına neden olduğu ileri sürülmüştür (27).

AAA hastalığının tedavisinde kullanılan en etkili yöntem günlük kolşisin kullanımıdır. Bir bitki alkaloidi olan kolşisin kullanımı ile AAA hastalarında akut inflamatuvar atakların yoğunluğu ve sayısı azaltılabilir ya da önlenabilir. Kolşisinin AAA ataklarını kontrol edebilmesinin yanı sıra amiloid birikimini önleyebildiği de bilinmektedir. Asemptomatik AAA hastalarında kolşisin tedavisi ile subklinik inflamasyon belirteçlerinin kandaki seviyesinin azaldığına dair çalışmalar mevcuttur (28). Kolşisin temel etkisi mikrotübülleri depolimerize ederek lökosit kemotaksisini önlemek üzerinedir. Fakat Taşkiran ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada,

kolşisinin mikrotübüllerin yanı sıra aktin iskeletini de etkileyebildiği ve MEFV ifadesini azalttığına yönelik bulgular elde edilmiştir (29).

2.4. MEFV Geni

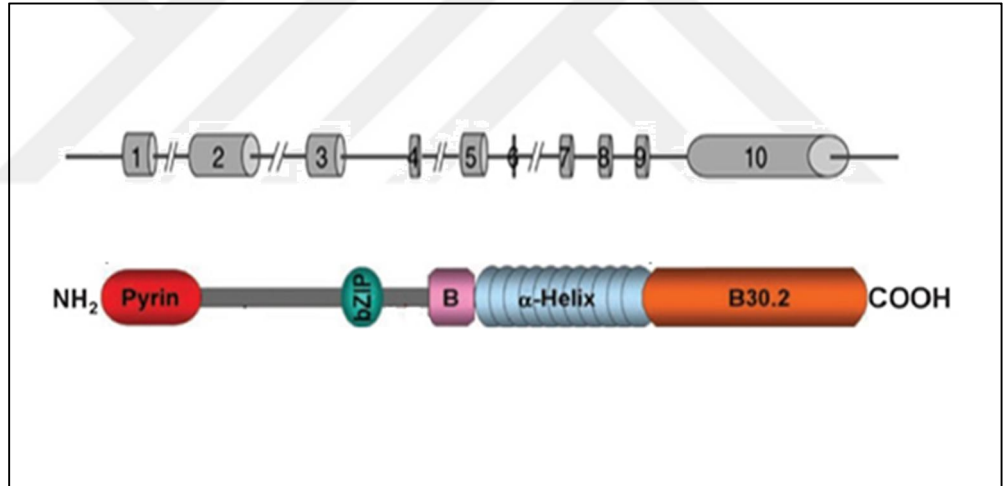
1997’de iki ayrı grup tarafından gerçekleştirilen çalışmalar ile AAA patogenezinin sorumlu MEFV geni keşfedilmiştir. MEFV, 10 ekzondan oluşmaktadır ve Pyrin adı verilen 781 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlamaktadır (4).

MEFV, polimorfonükleer hücrelerde (nötrofil, bazofil, eozinofil) ve makrofajlarda ifade olmaktadır. Ayrıca, dendritik hücrelerde, serozal ve sinoviyal fibroblastlarda, kolon ile prostat kanser hücrelerinde MEFV ifadesi olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur. Lökosit infiltrasyonunun meydana gelmesiyle dalak, akciğer ve kaslarda da MEFV ifadesi olduğu gösterilmiştir (30). Bunlardan başka, monositik hücre hatlarında (THP-1, U937) ya da monositik/granülositik farklılaşma sonucu HL-60 hücre hattında ve granülosit farklılaşması süresince CD34⁺ hematopoetik kök hücrelerde de MEFV ifadesi görülmektedir (4). Yapılan çalışmalar, MEFV ifadesinin hücre tipine özgül olduğunu göstermiştir. Bu hücrelerde MEFV geninin bazal ifade düzeyi düşüktür ancak LPS (lipopolisakkarit), pro-inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar sitokinler gibi çok sayıdaki farklı tetikleyici karşısında MEFV geninin mRNA ifadesi değişebilmektedir. Lenfositlerde ise, MEFV gen ifadesi görülmemektedir (3, 13, 30).

AAA hastalığına neden olan mutasyonların büyük bir kısmı, Pyrin’in B30.2 domainine karşılık gelen ekzon 10 mutasyonlarıdır. MEFV geninde en yaygın görülen mutasyonlar, M694V, V726A ve E148Q mutasyonlarıdır. M694V, Türk toplumunda en sık rastlanılan ve homozigotluk durumunda en ağır klinik fenotipe yol açan mutasyondur (31).

2.5. Pyrin Proteini

Pyrin, 781 aminoasit uzunluğunda ve 86 kDa ağırlığında bir proteindir. N-terminalden C-terminale doğru sırasıyla PYD (*Pyrin domaini*), bZIP (*Basic leucine zipper*) transkripsiyon faktör *domaini*, BB-ZF (*B-box-zinc finger domaini*), CC (*Coiled-coil domaini*) ve B30.2/PRYSPRY *domaini* olarak adlandırılan 5 *domainden* meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Pyrin, virüslerin immün sistem tarafından tanınmasında görev alan proteinlerin de yapısında bulunan ve BB-ZF, CC, rfp/B30.2/PRYSPRY *domainlerinden* oluşan 3-parçalı motife sahip olması nedeniyle TRIM20 (*Tripartite motif 20*) olarak da adlandırılmaktadır (3, 32). Her bir *domainin*, protein-protein interaksiyonları oluşturarak; apoptoz, sitokin salınımı, transkripsiyonel regülasyon, hücre iskeleti sinyal yolları gibi inflamasyonla ilişkili olaylarda farklı rolleri olduğu düşünülmektedir (16).



Şekil 2.1. Pyrin proteininin yapısı.

İfade olduğu hücre tipine bağlı olarak Pyrin'in hücre içindeki yerleşimi farklılık göstermektedir. Doğal Pyrin esas olarak granülositlerde, dendritik hücrelerde ve sinoviyal fibroblastlarda çekirdekte yerleşim göstermektedir. Monositlerde ise, sitoplazmik yerleşim gösterdiği bilinmektedir. Transfekte hücrelerde ifade ettirilmiş Pyrin'in nükleer formu, alternatif *splicing* sonucu olmuş

ekzon 2'nin atlandığı izoformudur. Bu çalışmalar, Pyrin'in hem sitoplazmik hem de nükleer kompartmanları tutabildiğini ve yerleşiminin hücreye özgül olduğunu düşündürmektedir (3, 9, 32).

Pyrin'in interaksiyona girdiği proteinler ile beraber doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde çeşitli yollar üzerinden etkili olduğu düşünülmektedir (4, 13). Literatürde, Pyrin'in işlevi halen tartışmalı olmakla birlikte transkripsiyon faktörü olabileceğine ve inflamasyonda anti-inflamatuvar ya da pro-inflamatuvar bir düzenleyici olarak rol oynadığına dair çeşitli hipotezler yer almaktadır.

Pyrin'in yapısal düzenine dair bilgisayar ortamındaki ilk analizler sonucunda, bu proteinin nükleer bağlanma motifi içerdiği ve B30/2 rfp transkripsiyon faktörü ailesine yüksek homoloji gösterdiği bulunmuştur (3). Bu keşif, Pyrin'in transkripsiyon faktörü olabileceği hipotezini gündeme getirmiştir. Wood ve arkadaşları tarafından THP-1 hücre hattında kromatin immünopresipitasyon dizileme (*ChIP-Seq*) yöntemi kullanılarak Pyrin'in DNA'ya bağlandığı gösterilmiştir (33). Bu çalışma, Pyrin'in transkripsiyon faktörü gibi davranabileceğini gösteren önemli bir ön çalışmadır. Nükleer lokalizasyon dizileri keşfedildikten sonra yapılan çeşitli transfeksiyon deneyleri sonucunda sitoplazmada bulunan tam uzunluktaki Pyrin'in (*full-length Pyrin*) hücre iskeleti ile yakın ilişki içinde olduğu gösterilmiştir. Pyrin'in işlevine dair en önemli bulgu, N-terminal ucundaki 100 aminoasitlik PYD (*Pyrin domaininin* keşfidir. *Death domain fold* süperailisi üyesi olan PYD, NLRP3 (*NLR family, PYD containing 3*) gibi inflamasyon ve apoptozla ilişkili 20'den fazla proteinde bulunduğu bilinen bir *domaindir*. İnflamasyonun kontrolünü sağlayan çok sayıda protein, PYD *domainini* taşımaktadır. PYD *domainini* taşıyan proteinler aktif IL-1 β üretimi için gerekli olan inflamazom yapısında önemli görevlere sahiptir (3). İnflamazom, kaspaz-1'in proteolitik aktivasyonunu düzenleyen sitoplazmik bir multiprotein kompleksidir. Pyrin, amino ucunda bulunan PYD *domaini* aracılığıyla, bir adaptör protein olan *Apoptosis-associated speck-like protein with caspase recruitment (CARD) domain* (ASC) ile interaksiyona girer. ASC, oligomerler halinde inflamazomda bulunan kaspaz-1'in proteolitik aktivasyonuna aracılık eden bir proteindir. Pyrin'in

ASC'den başka, C-terminalindeki B30.2 *domaini* aracılığıyla pro-apoptotik bir protein olan Siva ile de interaksyona girdiği gösterilmiştir (3,34, 35).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Pyrin'in pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β üretimini farklı yollar üzerinden düzenlediği gösterilmiştir. Bu etkinin özellikle, Pyrin'in ASC ile interaksyona girmesi sonucu *nuclear factor kappa B* (NF-kB) aktivasyonunun gerçekleşmesi ile kaspaz-1/IL-1 β aktivasyonunun düzenlenmesi üzerinden olabileceği düşünülmektedir (9, 36). Chae ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, karboksi ucunda bulunan B30.2 *domaininin* kaspaz-1'e direkt olarak bağlanabildiği gösterilmiştir (9).

Kaspaz-1'in, patojenik enfeksiyonlara karşı konak savunmasının bir parçası olan doğal bağışıklık sisteminde çok önemli bir rolü vardır. Çeşitli patojenlere ya da hücre kaynaklı strese cevap olarak inflamazom tarafından aktive edilir. Aktif kaspaz-1, inaktif formda olan pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i proteolitik olarak keser ve bu pro-inflamatuvar sitokinlerin aktive olmasını sağlar. Kaspaz-1 aracılı IL-1 β aktivasyonunda meydana gelen aksaklıklar, insanda periyodik ateş hastalıkları, Crohn hastalığı, gut ve Alzheimer gibi çok sayıda farklı hastalıklara yol açar (37, 38).

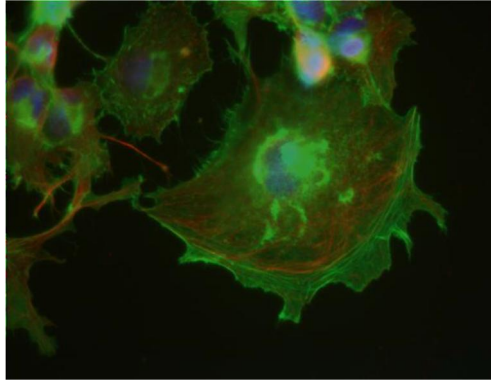
Uzun bir süre, doğal Pyrin'in anti-inflamatuvar bir molekül olduğu ve pro-IL-1 β 'nın kesimini inhibe ettiği düşünülmüştür. MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan mutant Pyrin'in işlev kaybına (*loss of function*) uğrayarak inhibitör görevini gerçekleştiremediği ve inflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımına neden olduğu kabul edilmiştir. Mutant Pyrin sebebiyle nötrofil kemotaksisi inhibisyonunun eksikliği, AAA hastalığı patogenezi için asıl mekanizma olarak önerilmiştir (10). Fakat grubumuzun da içinde olduğu son dönem çalışmalardan elde edilen bulgular, Pyrin'in pro-inflamatuvar bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

Yu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Pyrin'in ASC'ye bağlanarak ASC oligomerizasyonunu, kaspaz-1 aktivasyonunu ve IL-1 β üretimini tetiklediği gösterilmiştir (8). AAA ile ilişkili mutasyonların artan inflamasyona neden olduğu düşünüldüğünde bu çalışma, AAA mutasyonlarının Pyrin'in aktivitesini

değiştirerek hastalarda ASC oligomerizasyonu ile kaspaz-1 aktivasyonunu arttırdığı, bu nedenle Pyrin'in pro-inflamatuvar bir düzenleyici olabileceğini desteklemektedir.

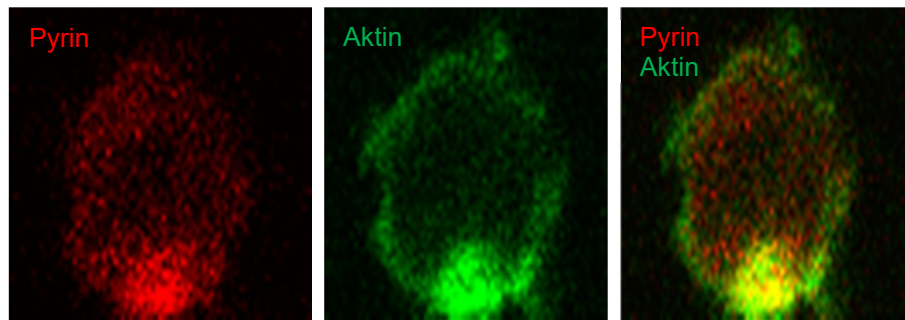
Aynı grubun yaptığı başka bir çalışmada, Pyrin'in PAPA sendromunda pro-inflamatuvar bir molekül olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Otoinflamatuvar bir hastalık olan PAPA sendromu, *Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1* (PSTPIP1) proteininde meydana gelen yanlış anlamli mutasyonlar sonucunda oluşur. PSTPIP1 proteininin Pyrin'le interaksiyona girdiği ve aktin ile de yakın ilişki içerisinde olup hücre iskeleti organizasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. PAPA sendromu ile ilişkili belli mutasyonlar, PSTPIP1 ile Pyrin interaksiyonunu arttırmaktadır. Bu gözleme dayanarak, ilk başta PSTPIP1 mutantlarının Pyrin üzerinde dominant negatif bir etki gösterdiği ve Pyrin'in anti-inflamatuvar etkisinin inhibe olması ile PAPA sendromlu hastalarda IL-1 β salınımının artmasına neden olduğu düşünülmüştür. Fakat Yu ve arkadaşları, PSTPIP1 mutantlarını ifade eden THP-1 hücrelerinde retroviral enfeksiyon sonucu Pyrin ifadesinin arttığını ve Pyrin'in tetiklenmesi ile kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β sentezinin gerçekleştiğini göstermişlerdir. Aynı THP-1 hücrelerinde *small interfering RNA* (siRNA) teknolojisi kullanarak Pyrin ifadesini susturduklarında IL-1 β salınımının azaldığı görülmüştür. Bunun yanı sıra, Pyrin ifadesinin olmadığı ama ASC, kaspaz-1 ve mutant PSTPIP1 ifadesinin olduğu 293 hücrelerinde kaspaz-1 aktivasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür. AAA'nın tedavisinde etkili bir şekilde kullanılan kolşisinin, kaspaz-1 aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (39). Anabilim Dalımızda yapılan bir çalışmada ise, kolşisinin THP-1 hücrelerinde MEFV ifadesini azalttığı mRNA ve protein çalışmaları ile desteklenmiştir (29).

Bu çalışmanın ardından, laboratuvarımızda yapılan bir diğer projede doğal Pyrin ile transfeksiyonu yapılan COS-7 ve HeLa hücre hatlarında inflamatuvar hücre göçünün arttığına yönelik bulgular elde edilmiştir. Hücre göçünü modelleyen yara iyileşmesi deneyleri ile doğal Pyrin'in HeLa hücrelerinde hücre göçünü arttırdığı görülmüştür. Filtre deneylerinde ise, doğal Pyrin'in kemoatraktan gradiyenti varlığında COS-7 hücrelerini hücre göçüne ittiği gösterilmiştir (40) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Pyrin-GFP ile transfeke edilen HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sistemindeki göç hareketi.

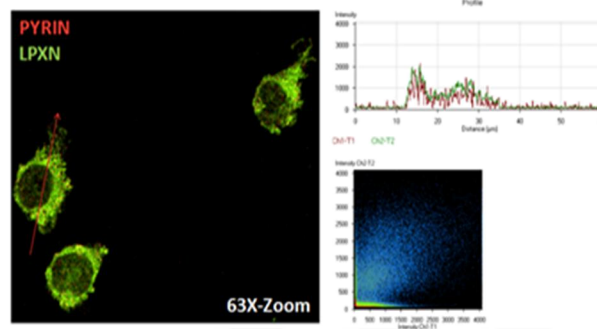
Laboratuvarımızda yapılan başka bir çalışmada ise, nötrofil benzeri bir hücre hattı olan HL-60 hücreleri kullanılarak aktif aktin, PSTPIP1 ve Pyrin'in hücre göçü esnasında hücrenin polarize bölgesinde birlikte yerleşim gösterdiği saptanmıştır (41) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nötrofile farklılaştırılmış ve göçe uyarılmış HL-60 hücresinin polarize ucunda aktif aktin ve Pyrin birlikte yerleşimi.

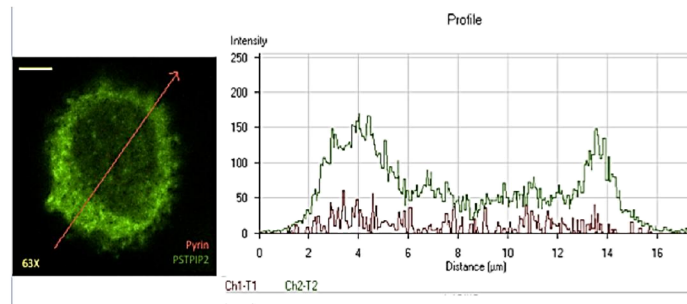
Bu çalışmanın ardından, *in vitro* hücre göçü modeli kullanılarak HL-60 hücrelerinde Pyrin ve aktin iskeleti elemanlarının ilişkisi moleküler düzeyde incelenmiştir. Hücre göçünde görev aldığı bilinen *leukocyte-specific protein 1* (LSP-1), *leupaxin* (LPXN), *dishevelled-associated activator of morphogenesis 1* (DAAM1),

proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2) proteinleri ve Pyrin'in hücre göçü sırasında birlikte yerleşim gösterdiği bulunmuştur (42) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nötrofile farklılaştırılmış ve göçe uyarılmış HL-60 hücrelerinde Pyrin-LPXN ve Pyrin-PSTPIP2 proteinlerinin birlikte yerleşim konfokal görüntüleri ve profil ile korelasyon eğrileri.

Yapılan başka bir çalışmada ise, MEFV genini hedefleyen siRNA'lar kullanılarak Pyrin proteininin ifadesinin baskılandığı HL-60 hücre hattında, fMLP (*N-formyl-MET-Leu-Phe*) ile göçe itilmiş hücrelerde hücre göçünün azaldığı ve polarizasyon oranının düştüğü gösterilmiştir (TÜBİTAK 1001-SBAG-111S507) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Nötrofile farklılaştırılmış ve göçe uyarılmış HL-60 hücresinde Pyrin'in siRNA teknolojisi ile ifadesinin susturulması sonrası elde edilen konfokal görüntüsü ve profil ile korelasyon eğrileri.

Tüm bu bulgular beraber değerlendirildiğinde, Pyrin'in hücre göçünde yer aldığı ve pro-inflamatuvar bir molekül olabileceği fikri kuvvetlenmektedir.

Chae ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, karboksi ucu hedeflenerek *knock-in* fare modeli yaratılmıştır. Farede B30.2 *domaininin* ortoloğu bulunmamaktadır. Bu sebeple, bu grup tarafından insan Pyrin'inine ait ve üzerinde 3 mutasyon yaratılmış (M694V, M680I, V726A) B30.2 *domaini* fare Pyrin'ine *insert* edilmiştir. Bu işlev kazanımı (*gain of function*) fare modelinde, AAA hastalarındakine benzer biçimde ağır bir inflamatuvar fenotip gözlenmiştir (43). AAA fenotipine neden olan mutasyonların daha çok Pyrin'in B30.2 *domaininde* bulunduğu düşünüldüğünde, bu *domainin* hastalığın patogenezi anılabilmek açısından son derece önemli olduğu görülmektedir. Araştırmacıların yarattığı bu fare modeli ve grubumuzun da içinde olduğu daha önceki çalışmalar beraber değerlendirildiğinde, Pyrin'in pro-inflamatuvar bir molekül olarak işlev gördüğü ve AAA hastalarında işlev kazanımına (*gain of function*) sebep olan mutasyonlarla şiddetli bir fenotipe yol açtığı düşünülmektedir.

2.6. İnflamatuvar Hücre Göçü ve Nötrofiller

Doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olan inflamasyon, geniş bir mikrobiyal organizma spektrumuna ve çeşitli zararlı uyarılara karşı konak organizmanın verdiği ilk savunma cevabıdır. Organizmanın endojen veya ekzojen uyarılara karşı başlattığı bu biyolojik cevapta, bağışıklık sistemi hücreleri hasarın olduğu inflamatuvar bölgeye doğru göç eder. İnflamasyon yaşamın devamı için gerekli olan ve zararlı uyarıların organizma üzerindeki etkilerini azaltan önemli bir süreçtir (44).

Otoinflamatuvar hastalıklar, yüksek miktarda otoantikor ya da antijene özgül T ve B hücrelerinin görülmediği veya az miktarda görüldüğü kronik inflamasyon ve tekrarlayan ateş atakları ile karakterize bir hastalık grubudur. Kontrolsüz inflamatuvar cevabın olduğu AAA hastalığının patogenezi hücre göçünün önemli olduğu düşünülmektedir (45).

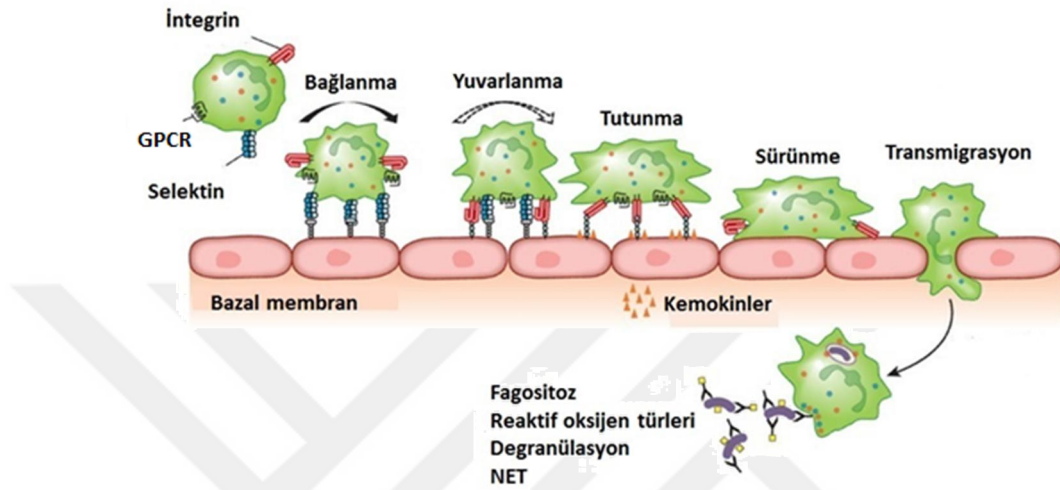
İnflamatuvar hücre göçü, lökositler aracılığıyla gerçekleşen bir süreçtir. Hasarlı bölgeye ilk olarak nötrofiller ulaşır. Nötrofilleri takiben monositler,

lenfositler ve bağışıklık sisteminin diğer elemanları inflamatuvar bölgeye göç eder (46).

Nötrofiller, hücre savunmasının ilk hattı olup inflamatuvar yolağın en önemli elemanlarıdır. İnsanlarda, kanda dolaşan lökositlerin %70'ini nötrofiller oluşturmaktadır. Bazofil ve eozinofillerle beraber polimorfonükleer hücreleri oluştururlar. Kemik iliğinden köken alan nötrofiller, kan dolaşımında serbest halde ortalama 5 gün yaşarken, inflamatuvar cevap süresince yalnızca 8-12 saat, dokuda ise 1-2 güne kadar yaşayabilmektedir. Fonksiyonlarının temelinde, enfeksiyon bölgesine toplanma, mikropları tanıyıp fagosite etme ve *Reaktif Oksijen Türleri* (ROS), *Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları* (NET) ya da antimikrobiyal peptidler gibi sitotoksik mekanizmalar aracılığıyla patojenleri öldürme yetenekleri yer almaktadır. Sağlıklı bireylerin dolaşım sistemlerinde inaktif şekilde bulunurlar. Bunun temel amacı, toksik intraselüler içeriklerini salarak organizmanın dokularına zarar vermelerini önlemektir. İnaktif formda bulunan nötrofiller , (i) fMLP (*N-formyl-MET-Leu-Phe*) ve LPS (*lipopolisakkarit*) gibi bakteriyel pattern içeren ajanlar ya da (ii) INF- γ (*interferon γ*), IL-8 (*interlökin-8*), TNF- α (*tümör nekrozis faktör- α*) gibi sitokin ve kemokinler aracılığıyla iki şekilde aktive olurlar (47, 48).

Nötrofillerin hasarlı bölgeye göç edebilmeleri için kandan dokuya invaze olmaları gerekir. Bu süreç kapiller damarların yardımıyla gerçekleşir. Endotelyum yüzeyinde bulunan E ve P selektin ligandları ile nötrofil yüzeyinde bulunan reseptörler düşük affiniteli bağlanma gösterir. Böylelikle, endotel yüzeyinde yuvarlanan nötrofillerin hızı azalmış olur. Yavaşlayan nötrofillerin yüzeyinde bulunan integrinler ile endotel yüzeyinde bulunan *Hücre İçi Adezyon Molekül-1 /2* (ICAM-1 / 2) arasında ikinci bir bağlanma gerçekleşir. Bu basamak, nötrofillerin endotel yüzeyine sıkıca yapışmaları için gereklidir. ICAM-1 ifadesinin yüksek olduğu bölgede kemokinlerin de katkısıyla nötrofil diapedezi başlar. İnflamasyon bölgesine ulaşan nötrofiller, *Patern Tanıma Reseptörleri* (PRR) ve *G-Protein Bağlı Reseptörleri* (GPCR) aracılığıyla fMLP, LPS, peptidoglikan, çift zincirli viral RNA ve bakteri DNA'sı gibi *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP)'ları tanır. Nötrofil aktivasyonu gerçekleştikten sonra patojenleri ortadan kaldırmak için dört ayrı mekanizma

devreye girer. Bunlar sırasıyla; (i) fagositoz, (ii) ROS oluşumu, (iii) degranülasyon, (iv) NET oluşumudur. Görevlerini tamamlayan nötrofiller apoptoza girerler. Mikro çevredeki nötrofil hücre kalıntıları ise, makrofajlar tarafından fagositozla temizlenir (47, 49, 50) (Şekil 2.6).

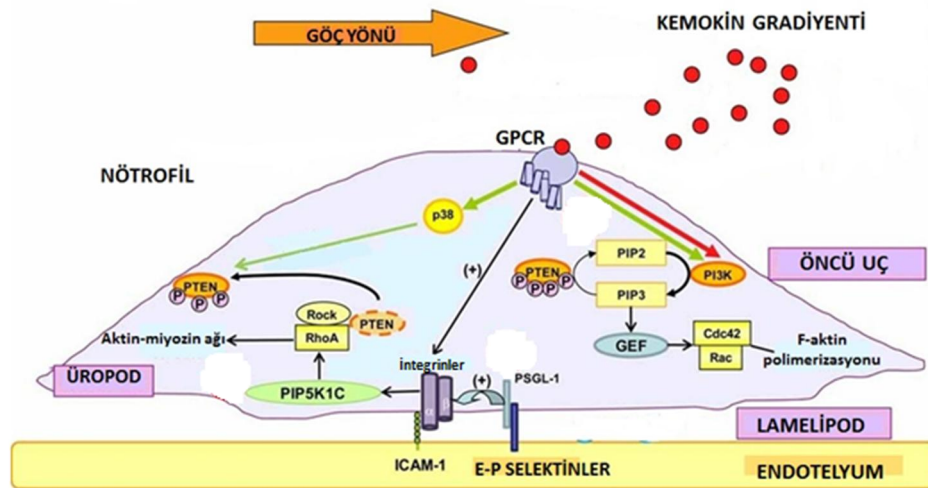


Şekil 2.6. Kan dolaşımında bulunan nötrofillerin inflamatuvar bölgeye göç etmesi.

Dolaşımda inaktif halde bulunan nötrofiller küre şeklinde bir morfolojiye sahiptir ancak bir kemoatraktanla karşılaştıkları anda, ön kısımlarında psödopod ve arka kısımlarında üropodlarla karakterize bir polarite geliştirirler (51). Nötrofillerin bu bölgelerinde yoğun bir aktin filament organizasyonu yer alır. Aktin, evrimsel süreç boyunca türler arasında sıkı korunmuş, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan önemli bir proteindir. α , β ve γ -aktin gibi çeşitli izoformları bulunan aktin, hücre göçü ile ilişkili süreçlerde hayati rol oynamaktadır. Kalp kası ve iskelet kasında esas olarak α -aktin ifade olurken, diğer dokularda sitoplazmik β ve γ -aktin ifadesi görülmektedir (52). Aktin, hücre içerisinde G-aktin (globüler) ve F-aktin (filamentöz) olarak iki şekilde bulunmaktadır. Globüler monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan F-aktin ve ona bağlanan proteinler aktin filament ağını meydana getirir (51, 53). Bu aktin ağı, hücre iskeletinin yeniden organize olmasını, kısa ve küçük çıkıntılar olan psödopodların ön kısımda oluşmasını ve hücrenin yüzeye tutunmasını sağlar.

Aktin/miyozin II ağı da arka kısımda üropod oluşumunu ve hücrenin ileri doğru hareket etmesini sağlar. Mikrotübül organizasyon merkezi (MTOC) ise, mikrotübüllerin hareket yönünde sıralanmasına ve hücre polaritesinin stabil kalmasına yardımcı olur. Polarize hücrelerin arka ve ön kısımlarında meydana gelen bu olaylar, membran fosfolipidleri, protein fosforilasyonu ve Rho, Rac, Cdc42 proteinlerinden oluşan küçük GTPaz süper ailesi aracılığıyla kontrol edilir (49, 54) (Şekil 2.7).

Hücre içinde bir kemokin gradiyentinin oluşması ile GPCR'ler, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ile fosfotaz ve tensin homolog (PTEN) yolağı üzerinden aktive olurlar. Bu yolak ile PI(4,5)P₂, ikincil mesajcı PI(3,4,5)P₃'e dönüşür ve nötrofiller kemoatraktan gradiyentine yönelirler. PI(3,4,5)P₃, Rac-GEF'i uyarıp Cdc42 ile Rac'ın aktive olmasını ve F-aktin polimerizasyonunu uyararak hücrenin ön ucunda lamelipod oluşmasını sağlar. Hücrenin arka kısmında ise, PTEN ve Aktin/miyozin II ağı aracılığıyla RhoA/ROCK1 yolağının aktive olması sonucu üropod oluşur. β 2 integrinler ve ICAM-1 molekülleri de kemoatraktan yönünde hareket etmeye başlayan nötrofillerin polarizasyonunu destekler (49, 54).



Şekil 2.7. Nötrofil hücresinin bir kemokin gradiyent boyunca polarite kazanmasını sağlayan sinyal yolları.

2.7. Amaç

Literatüre bakıldığında, Pyrin'in işlevini anlamak amacıyla çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. AAA patogenezi ile Pyrin işlevi arasındaki ilişki henüz tamamen aydınlatılamamıştır. Pyrin'in işlevi tartışmalı olmakla beraber, *domainleri* aracılığıyla interaksyona girdiği proteinlerle birlikte doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olan inflamasyonun düzenlenmesinde çeşitli yollar üzerinden etkili olduğu düşünülmektedir. Pyrin'i ifade eden hücre hatları ya da hayvan modelleri kullanılarak, bu proteinin kaspaz-1 aktivasyonunu düzenlediği ve pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β sentezinin gerçekleşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, MEFV gen mutasyonlarının inflamatuvar süreci etkileyerek AAA hastalığında, hücre göçünün artmasına neden olduğunu gösteren bulgular elde edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, Pyrin'in inflamatuvar hücre göçünde pro-inflamatuvar bir molekül olarak işlev gördüğü ve AAA hastalarında işlev kazanımına (*gain of function*) sebep olan mutasyonlarla şiddetli bir fenotipe yol açtığı hipotezi kurulmuştur.

Tez çalışması kapsamında, klinik değerlendirmeler sonucu AAA tanısı almış ve genetik analizler ile her iki alleli de M694V mutasyonu için homozigot olduğu gösterilmiş 12 hasta ve 11 kontrol bireyden alınan kan örneklerinden izole edilen nötrofil hücrelerinde inflamatuvar hücre göçü araştırılmıştır. Hücre göçü özelliklerini karşılaştırmak için Pyrin proteinini esas olarak ifade eden nötrofil hücrelerinde;

- Filtre deneyleri ile bir kemoatraktan gradiyenti boyunca göç eden sağlıklı ve hasta bireylerin hücrelerinin sayı bakımından karşılaştırılması,
- Floresan boyama yöntemi ile polarizasyon oranlarının belirlenmesi,
- Pyrin-aktin birlikte yerleşiminin floresan boyama tekniği ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Nötrofil İzolasyonu

- Lympholyte-poly Çözeltisi (Cederlane Laboratories)
- Red Blood Cell Liziz Tamponu pH: 7.2 – 7.4
 - 2,07 g NH_4
 - 0,25 g KHCO_3
 - 0,05 ml 0,5 M EDTA, pH: 8.0
 - 250 ml distile su

3.1.2. Hücre Kültürü

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Biochrom)
- L-Glutamin (Biochrome)
- Fetal Dana Serum (FBS) (Biochrome)
- Streptomisin/Penisilin (Biochrome)
- fMLP(N-Formyl-Met-Leu-Phe) (Sigma)
- LabTek II Chamber Slide (Nunc)

3.1.3. Floresan Boyama

- Paraformaldehit (PFA) (Sigma)
- 1X PBS (Phosphate buffered saline) (pH 7,4) (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma) : %0,2 / PBS(h/h)
- Tween 20 (Sigma) : %0,1 / PBS (h/h)
- Keçi Serum (Sigma) : %10 / PBS (h/h)
- Dana Serum Albumini (Sigma) : %10 / PBS (a/h)
- Fc Reseptörü Bloklama Solüsyonu (Innovex Biosciences)
- Primer Antikor: Fare poliklonal Anti-İnsan Pyrin (Abnova)
- Floresan İşaretli İkincil Antikor: Keçi Anti-Fare AF568 (Molecular Probes)
- Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen)
- DAPI (4', 6 –diamidino-2-phenylindole) (Sigma)

- Prolong Antifade Kaplama Solüsyonu (Invitrogen)

3.1.4. Filtre Deneyi

- Asetometoksi Kalsein (Kalsein AM) (Sigma)
- 3,0 μm por içeren ThinCert Pet-membran (Greiner)



3.2. Çalışmaya Katılan Bireyler

Tez çalışması kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Romatoloji Bilim Dalı'nda klinik değerlendirmeler sonucu AAA tanısı almış ve genetik analizler ile her iki alleli de M694V mutasyonu için homozigot olduğu gösterilmiş 12 hasta ve 11 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan bireyler, Set 1 ve Set 2 olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Set 1, kolşisin tedavisine rağmen atak geçiren 2 AAA hastası, yeni tanı konulmuş kolşisin tedavisi almayan ve atak geçiren 1 AAA hastası, kolşisin tedavisi alan ve tedaviye iyi cevap veren 7 AAA hastası ve 10 sağlıklı kontrol bireyden oluşmaktadır. Set 2 ise, yeni tanı konulmuş kolşisin tedavisi almayan ve atak geçiren 1 AAA hastası, kolşisin tedavisi alan ve tedaviye iyi cevap veren 1 AAA hastası ve 1 sağlıklı kontrol bireyden oluşmaktadır. Set 1 ve 2'deki bireylere ait klinik bilgiler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Set 1 ve 2'deki bireylere ait klinik bilgiler.

SET 1				
Çalışmaya Katılan Bireyler	Cinsiyet	**Vücut Ağırlığı (kg)	Mutasyon	Kolşisin Konsantrasyonu (mg/gün)
Hasta 1	Kadın	31	M694V/M694V	1
Kontrol 1	Kadın	-	-	-
Hasta 2	Kadın	24	M694V/M694V	1
Kontrol 2	Kadın	-	-	-
Hasta 3	Erkek	50	M694V/M694V	1,5
Kontrol 3	Erkek	-	-	-
Hasta 4	Kadın	40	M694V/M694V	1,5
Kontrol 4	Kadın	-	-	-

SET 1				
Çalışmaya Katılan Bireyler	Cinsiyet	**Vücut Ağırlığı (kg)	Mutasyon	Kolşisin Konsantrasyonu (mg/gün)
Hasta 5	Kadın	55	M694V/M694V	1,5
Kontrol 5	Erkek	-	-	-
*Hasta 6	Erkek	-	M694V/M694V	-
Kontrol 6	Erkek	-	-	-
Hasta 7	Erkek	15	M694V/M694V	0,5
Kontrol 7	Kadın	-	-	-
Hasta 8	Kadın	50	M694V/M694V	2
Kontrol 8	Kadın	-	-	-
Hasta 9	Kadın	43	M694V/M694V	1,5
Kontrol 9	Kadın	-	-	-
Hasta 10	Kadın	16	M694V/M694V	1
Kontrol 10	Kadın	-	-	-

SET 2				
Çalışmaya Katılan Bireyler	Cinsiyet	**Vücut Ağırlığı (kg)	Mutasyon	Kolşisin Konsantrasyonu (mg/gün)
*Hasta 11	Kadın	-	M694V/M694V	-
Kontrol 11	Kadın	-	-	-
Hasta 12	Kadın	37	M694V/M694V	1

* Hasta 6 ve 11 yeni tanı almış ve henüz tedaviye başlamamış hastalardır.

**Hastaların vücut ağırlıkları kolşisin dozunun belirlenmesinde önemli olduğu için belirtilmiştir.

AAA tanısı almamış ve ESH ile CRP değerleri referans aralığı içinde olan bireyler sağlıklı kontrol olarak kabul edildi. Enfeksiyon geçiren, tedavi gerektiren herhangi bir kronik hastalığı olan ya da kan verdiği gün ağrı kesici gibi anti-inflamatuvar ilaçlar alan bireyler sağlıklı kontrol grubundan çıkarıldı. AAA tanısı almış, ESH ve CRP değerleri referans aralığı içinde olan bireyler kolşisine iyi cevap veren AAA hastaları grubuna dahil edilirken, ESH ile CRP değerleri referans aralığın dışında kalan bireyler klinik öyküleri de değerlendirilerek atak geçiren AAA hastaları olarak kabul edildi. Bu tez kapsamında EDTA'lı tüp içerisine alınan kan örneklerinden izole edilen nötrofil hücreleri ile çalışıldı. Klinik değerlendirmede kullanılan ESH ve CRP testlerinin referans değerleri şekil 3.1'de gösterilmiştir.

	Eritrosit Sedimentasyon Hızı (ESH)	C-Reaktif Protein (CRP)
Referans Değerler	0 – 20 mm/saat	0 -0.8 mg/dL

Şekil 3.1. AAA hastalarının ve kontrol bireylerin klinik değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.02.2015 tarih ve GO15/90 karar numaralı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK 1).

3.3. Deney Planı

Bu tez çalışması kapsamında, iki farklı deney seti kurulmuştur. Set 1’de, 10 sağlıklı birey ve 10 AAA hastasından elde edilen nötrofil hücreleri kullanılmıştır. Bu set için yapılan floresan boyama ve filtre deneyleri, fMLP uygulanmış ve fMLP uygulanmamış olmak üzere 2 deney koşulunda gerçekleştirilmiştir. Set 2’de ise, Pysin proteininin yerleşimini belirlemek amacıyla 1 sağlıklı birey ve 2 AAA hastasından elde edilen nötrofil hücreleri kullanılmıştır. Bu set için ise yapılan immünfloresan boyama deneyleri, fMLP uygulanmış ve fMLP uygulanmamış olmak üzere 2 deney koşulunda gerçekleştirilmiştir. Floresan ile immünfloresan boyama ve filtre deneyleri için planlanan setler ile sağlıklı ve hasta bireyler tablo 3.1’de verilmiştir.

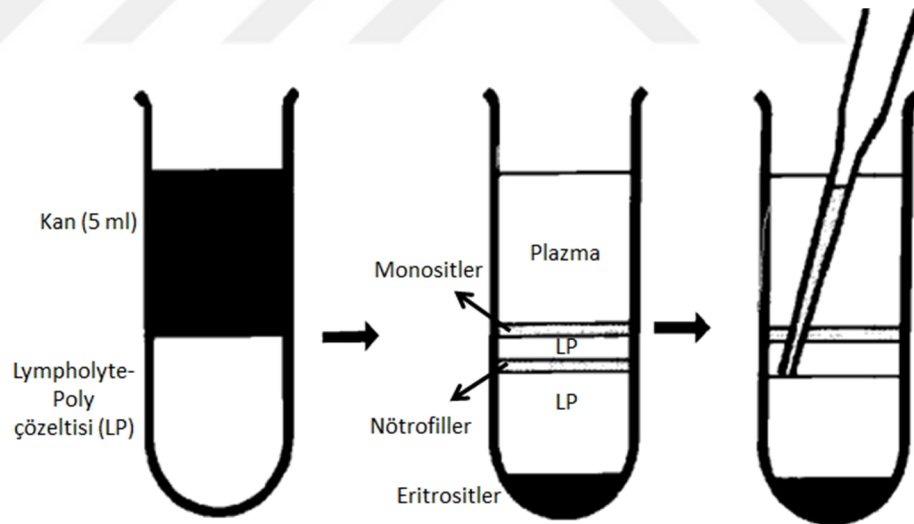
Tablo 3.2. Floresan ile immünfloresan boyama ve filtre deneyleri için oluşturulmuş setler (*H: kolşisine iyi cevap veren ve atak geçiren AAA hastaları, **K: sağlıklı kontrol bireyler).

Deney Koşulu	Floresan, İmmünfloresan Boyama Ve Filtre Deneyi Setleri
1 saat 50 uM fMLP Uygulanmış Koşul	Alexa Fluor 488 Phalloidin (Set 1) : H* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve K** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 İmmünfloresan Boyama (Set 2) : H 11, 12 ve K 11
fMLP Uygulanmamış Koşul	Alexa Fluor 488 Phalloidin (Set 1) : H 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve K 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 İmmünfloresan Boyama (Set 2): H 11, 12 ve K 11
24 saat 100 nM fMLP Uygulanmış Koşul	Filtre Deneyi (Set 1): H 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve K 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
fMLP Uygulanmamış Koşul	Filtre Deneyi (Set 1): H 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve K 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

3.4. Yöntemler

3.4.1. Nötrofil İzolasyonu

- AAA tanısı konmuş hastalardan ve sağlıklı bireylerden, 10 ml olacak şekilde EDTA'lı tüp içerisine alınan kan örnekleri oda sıcaklığında laboratuvara ulaştırıldı.
- Kan örneği 5 ml/ 5ml olacak şekilde iki falkon tüpe bölündü ve kanlar, eşit hacimdeki Lympholyte-Poly çözeltisi üzerine eklendi.
- Örnekler 500 rcf'de 35 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Fazlarına ayrılan örneğin nötrofil tabakası (Şekil 3.2) toplandı ve 350 rcf'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj gerçekleştirildi.
- Peletin üzerine 5 ml liziz tamponu eklendi ve 250 rcf'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem, eritrositler ortamdan uzaklaştırılana kadar tekrarlandı.



Şekil 3.2. Total kandan nötrofil izolasyonu.

3.4.2. Hücre Kültürü

- Nötrofil peleti üzerine %10 Fetal Dana Serumu, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren RPMI besiyerinden 100 ul eklendi ve hücre sayımı yapıldı.

Filtre Deneyi

Filtre deneyi, ilk olarak 1962 yılında Stephen Boyden tarafından keşfedilen ve hücre göçü çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir sistemdir. Bu sistemin özelliği, kemoatraktan bir ajana karşı diapedez hareketi geliştiren hücrelerin kantitasyonuna izin vermesidir. Prensip olarak filtrenin alt ve üst kuyuları olmak üzere 2 adet kompartman bulunmaktadır. Üst kompartmana konan hücreler, polikarbonat membranın porlarından geçerek alt kompartmandaki kemoatraktan gradiyentine doğru göç etmektedir (Şekil 3.3). Lökositler için önerilen uygun por büyüklüğü 3 μm iken, tümör ve epitelyal hücreler için 8 μm 'dir (55, 56).



Şekil 3.3. Hücre kültürü petrisinin kuyusuna yerleştirilen filtre ve kompartmanları.

Alt kompartmana göç eden hücrelerin kantitasyonunu gerçekleştirmek amacıyla floresan işaretleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Kalsein-AM boyaması en sık kullanılan metotlardan biridir. Canlı hücrelerde floresan olmayan kalsein-AM bileşiği, hücre içi esterazlar aracılığıyla hidrolize uğrar ve yeşil floresan ışığa veren kalsein'e dönüşür (57).

Primer nötrofiller için filtre deneyi protokolü aşağıda belirtilmiştir.

- 24 kuyucuklu hücre kültürü petripleri içerisine 3 µm çapında porlar içeren polikarbonat membranlı filtreler yerleştirildi.
- Filtrenin üst kompartmanına son hacim 400 ul olacak şekilde 15×10^3 hücre ekildi.
- Filtrenin alt kompartmanına ise, son hacim 600 ul olacak şekilde 100 nM fMLP eklendi ve hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- 24 saatin sonunda göç eden hücreler 1 mM kalsein-AM ile muamele edildi ve 15 dakika boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.
- Leica IM50 floresan mikroskopuyla petrideki her bir kuyunun rastgele 12 alanının (6 orta, 6 kenar) fotoğrafı çekildi.

Negatif kontrol olarak, üst kuyudaki hücreler alt kompartmanlarına fMLP eklenmeden 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

3.4.3. Floresan Boyama

- 4 kuyucuklu LabTek II Chamber Slide preparatlarına son hacim 500 ul olacak şekilde 4×10^5 – $4,5 \times 10^5$ hücre ekildi.
- Preparatlardaki hücreler cam yüzeye yapışmaları için 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 2 saatlik inkübasyona bırakıldı. 2 saatin sonunda besiyerine 50 uM fMLP eklendi ve hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 1 saat boyunca inkübe edildi.

Alexa Fluor® 488 Phalloidin Floresan Boyama

Phalloidin, zehirli *Amanita phalloides* mantarından izole edilen bisiklik peptid yapısındaki bir toksindir. Floresan görüntülemeye seçici olarak filamentöz aktini (F-aktin) işaretlemek için kullanılmaktadır. Yeşil floresan ışığa veren Phalloidin, aktif aktine bağlanarak özgül olmayan boyanmaları engellemektedir (58). Alexa Fluor 488 Phalloidin floresan boyama protokolü aşağıda belirtilmiştir.

- 4 kuyucuklu LabTek II Chamber Slide preparatlarında bulunan hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 500 ul %4 PFA solüsyonu içerisinde inkübe edilerek fiksasyon gerçekleştirildi.
- Preparatın cam zeminine fikse olmuş hücrelerin üzerinden PFA çekildi ve 2 defa 5'er dakika 1XPBS pH:7,4 ile yıkama yapıldı.
- Hücre zarına geçirgenlik kazandırmak amacıyla, örneklerin üzerindeki 1XPBS uzaklaştırılarak %0,2'lik Triton-X-100/1XPBS solüsyonundan 500 ul eklendi ve hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 1 defa 5 dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra nötrofillerin hücre zarında bulunan ve yalancı boyanmaya neden olan *Fc* reseptörlerini kapatmak amacıyla bloklama yapıldı. Bunun için hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde (yaklaşık 5 damla) ticari olarak temin edilen *Fc Receptor Blocker'dan* damlatıldı ve hücreler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 1 defa 5 dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- İkinci bir bloklama aşaması olarak %10'luk BSA, %3'lük keçi serumu ve %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile hazırlanan solüsyondan 250 ul hücrelerin üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi.

- 1 saatin sonunda bloklama solüsyonu hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldı. Aktif aktini boyamak için hücreler, 200 ul %2,5 AF 488 Phalloidin/ %0,1 Tween-20/1XPBS solüsyonu ile muamele edilerek oda sıcaklığında 40 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası hücreler 3 defa 5'er dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- Çekirdek boyaması için distile su içerisinde 1:4000 oranında seyretilmiş DAPI solüsyonundan 500 ul hücrelerin üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 2 defa 5'er dakika 500 ul distile su ile yıkandı.
- Lam üzerine *Prolong Antifade* çözeltisi damlatılarak hücrelerin üzeri kapatıldı ve preparat ışık görmeyecek şekilde 4 °C'ye kaldırıldı.

Negatif kontrol olarak fMLP ile uyarılmamış hücreler kullanıldı. *Alexa Fluor 488 Phalloidin* floresan boyaması bu hücreler için de aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.4.4. İmmüfloresan Boyama

- 4 kuyucuklu LabTek II Chamber Slide preparatlarında bulunan hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 500 ul %4 PFA solüsyonu içerisinde inkübe edilerek fiksasyon gerçekleştirildi.
- Preparatın cam zeminine fikse olmuş hücrelerin üzerinden PFA çekildi ve 2 defa 5'er dakika 1XPBS pH:7,4 ile yıkama yapıldı. Örnekler 1xPBS içerisinde 4 °C'ye kaldırıldı.
- Hücre zarına geçirgenlik kazandırmak amacıyla, örneklerin üzerindeki 1XPBS uzaklaştırılarak %0,2'lik Triton-X-100/1XPBS solüsyonundan 500 ul eklendi ve hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 1 defa 5 dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.

- PBS uzaklaştırıldıktan sonra nötrofillerin hücre zarında bulunan ve yalancı boyanmaya neden olan *Fc* reseptörlerini kapatmak amacıyla bloklama yapıldı. Bunun için hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde (yaklaşık 5 damla) ticari olarak temin edilen *Fc Receptor Blocker*'dan damlatıldı ve hücreler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 1 defa 5 dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- Bloklama solüsyonu yıkama ile hücrelerin üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra Fare Anti-MEFV primer antikoru, 1:50 oranında %0,1 Tween-20/1XPBS ile %3 *Fc Receptor Blocker* solüsyonu içinde seyreltilerek hazırlandı ve hücrelerin üzerine 150 ul eklendi. Hücreler 4 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- 1 saatin sonunda primer antikor uzaklaştırılıp hücreler 1 defa 5 dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- Primer antikor uygulandıktan sonra Anti-Fare AF 568 sekonder antikor 1:1000 oranında %0,1 Tween-20/1XPBS ile %3 *Fc Receptor Blocker* solüsyonu içinde seyreltilerek hazırlandı ve hücrelerin üzerine 150 ul eklendi. Hücreler oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildi.
- Sekonder antikor uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 defa 5 dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- Aktif aktin iskeletini boyamak için sekonder antikor uzaklaştırılıp %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkama yapıldı ve protokolünde belirtildiği gibi *Alexa Fluor 488 Phalloidin* floresan boyaması gerçekleştirildi.
- Alexa Fluor 488 Phalloidin ile inkübasyon sonrası hücreler 3 defa 5'er dakika 500 ul %0,1'lik Tween-20/1XPBS ile yıkandı.
- Çekirdek boyaması için distile su içerisinde 1:4000 oranında seyreltilmiş DAPI solüsyonundan 500 ul hücrelerin üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 2 defa 5'er dakika 500 ul distile su ile yıkandı.
- Lam üzerine *Prolong Antifade* çözeltisi damlatılarak hücrelerin üzeri kapatıldı ve preparat ışık görmeyecek şekilde 4 °C'ye kaldırıldı.

Negatif kontrol olarak fMLP ile uyarılmamış hücreler kullanıldı. İmmünfloresan boyama bu hücreler için de aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.4.5. Verilerin Değerlendirilmesi Ve İstatistiksel Analiz

Floresan ve immünfloresan boyama yapılan preparatlar *Carl-Zeiss* Axioplan 2 floresan mikroskobu ile görüntülendi. 20x ve yağ immersiyonlu 40x ile 63x'lik *apochromat DIC* objektifler kullanıldı. Preparattaki her bir kuyu için rastgele 5-8 alan çekildi. Farklı kanallarda çekilen floresan görüntüler *GIMP 2.8* yazılımı ile birleştirildi.

Kalsein-AM boyaması yapılan kuyular *Leica DMIL* floresan mikroskopta görüntülendi. Petrideki her bir kuyunun rastgele 12 alanının (6 orta, 6 kenar) fotoğrafları *Leica Application Suite 3.1* yazılımı kullanılarak çekildi. Filtrenin alt kuyusuna göç eden hücreler *ImageJ 1.46* yazılımında bulunan 'parçacık analizi' metoduyla kantite edildi.

Grafiklerin çiziminde ve gruplar arasındaki istatistiksel analizin değerlendirilmesinde *GraphPad Prism 6.1* programı kullanıldı. Parametrik-olmayan Mann-Whitney U-test ile setler arasındaki farklılık belirlendi. $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Klinik Durumları İle İlgili Özellikleri

Tez çalışmasına katılan tüm hasta ve kontrol bireylerin eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ile C-reaktif protein (CRP) değerlerini gösteren klinik test sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Tez çalışmasına katılan hastaların ve kontrol bireylerin klinik durumları ile ilgili özellikleri ve gruplandırma.

SET 1			
Çalışmaya Katılan Bireyler	ESH değeri (0 – 20 mm/saat)	CRP değeri (0 -0.8 mg/dL)	Grup
Hasta 1	25	2,2	Ataklı
Kontrol 1	2	0,277	Sağlıklı
Hasta 2	12	0,927	İyi gidişli
Kontrol 2	6	0,128	Sağlıklı
Hasta 3	34	1,04	İyi gidişli
Kontrol 3	5	0,64	Sağlıklı
Hasta 4	9	5,47	Ataklı
Kontrol 4	5	0,153	Sağlıklı
Hasta 5	5	0,256	İyi gidişli
Kontrol 5	2	0,342	Sağlıklı
*Hasta 6	31	8,94	Ataklı
Kontrol 6	6	0,223	Sağlıklı
Hasta 7	23	0,605	İyi gidişli
Kontrol 7	2	0,285	Sağlıklı

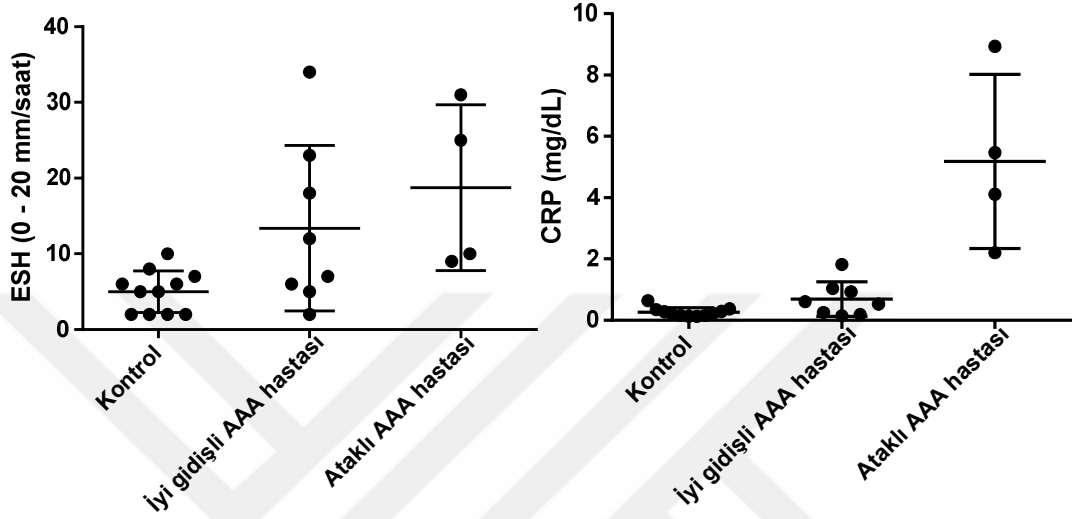
SET 1			
Çalışmaya Katılan Bireyler	ESH değeri (0 – 20 mm/saat)	CRP değeri (0 -0.8 mg/dL)	Grup
Hasta 8	2	0,531	İyi gidişli
Kontrol 8	2	0,132	Sağlıklı
Hasta 9	18	1,82	İyi gidişli
Kontrol 9	10	0,372	Sağlıklı
Hasta 10	6	0,191	İyi gidişli
Kontrol 10	7	0,191	Sağlıklı

SET 2			
Çalışmaya Katılan Bireyler	ESH değeri (0 – 20 mm/saat)	CRP değeri (0 -0.8 mg/dL)	Grup
*Hasta 11	10	4,11	Ataklı
Kontrol 11	8	0,154	Sağlıklı
Hasta 12	7	0,147	İyi gidişli

*Hasta 6 ve 11 yeni tanı almış ve henüz tedaviye başlamamış hastalardır.

Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Romatoloji Bilim Dalı'nın katkılarıyla bu değerlere ve klinik öyküye göre, Set 1 ve 2'deki tüm hastalar atak geçiren AAA hastaları ve iyi gidişli AAA hastaları olarak iki gruba ayrıldı. Kontrol bireylerin ise, enfeksiyon geçirmeyen veya inflamasyona neden olan herhangi bir kronik hastalığı olmayan sağlıklı bireyler olduğu, bu klinik testler aracılığıyla doğrulandı. ESH ve CRP değerleri referans aralığının dışında kalan bireyler kontrol grubundan çıkarıldı. Set 1

ve 2'deki ataklı AAA hastaları, iyi gidişli (tedaviye iyi cevap veren) AAA hastaları ve kontrol bireyler olmak üzere oluşturulan 3 gruba ait CRP ve ESH değerlerinin dağılımı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

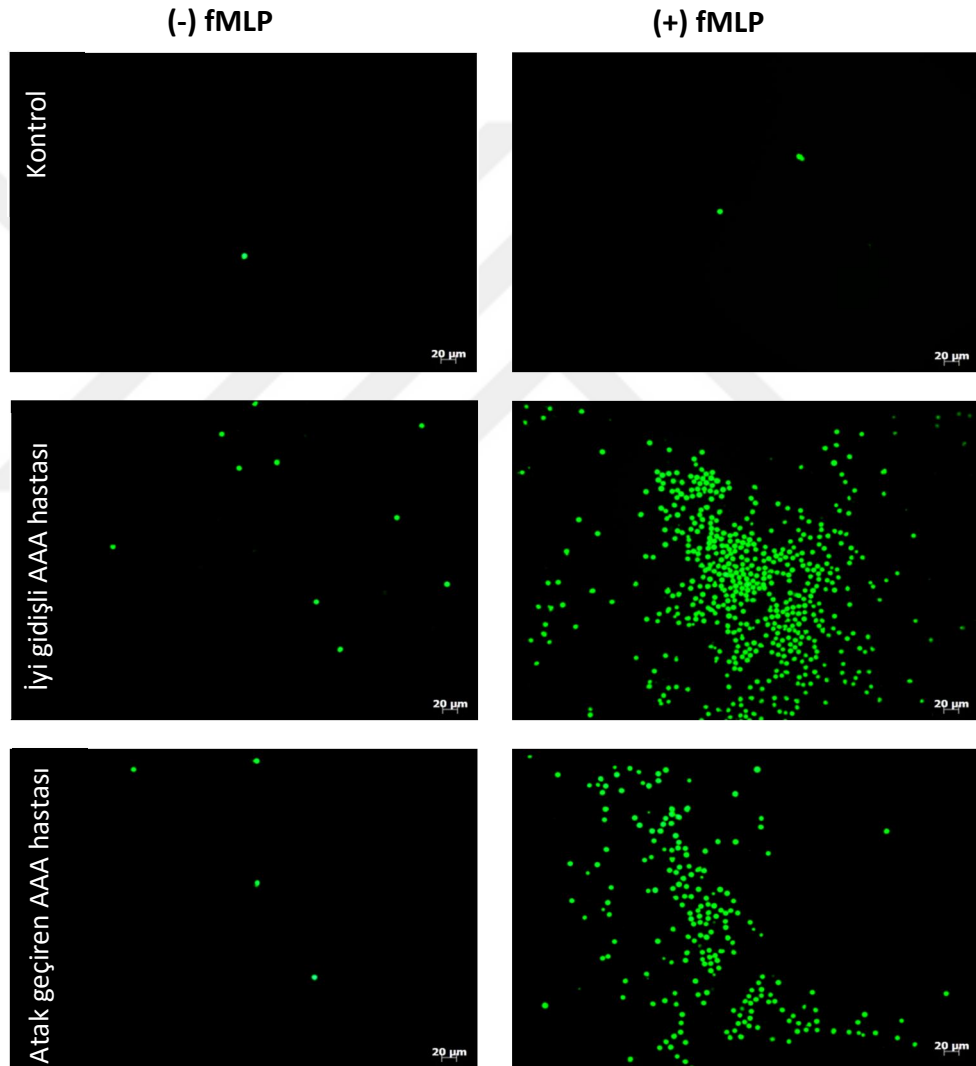


Şekil 4.1. Kontrol bireyler ile iyi gidişli ve ataklı AAA hastalarına ait CRP ve ESH değerlerinin dağılımını gösteren grafik.

CRP ve ESH değerlerinin dağılımını gösteren şekle göre, iyi gidişli AAA hastaları ve kontrol bireyler için bu değerler referans aralık içindedir. Ataklı hastalar için ise, bu değerler referans aralığın üstündedir. Akut inflamasyonla beraber CRP ve ESH değerleri yükseldiği için bu değerler hasta bireylerde kontrollere kıyasla daha yüksektir. Atak geçiren AAA hastalarında ise, ağır bir subklinik inflamasyon olduğundan bu değerler en yüksek seviyededir.

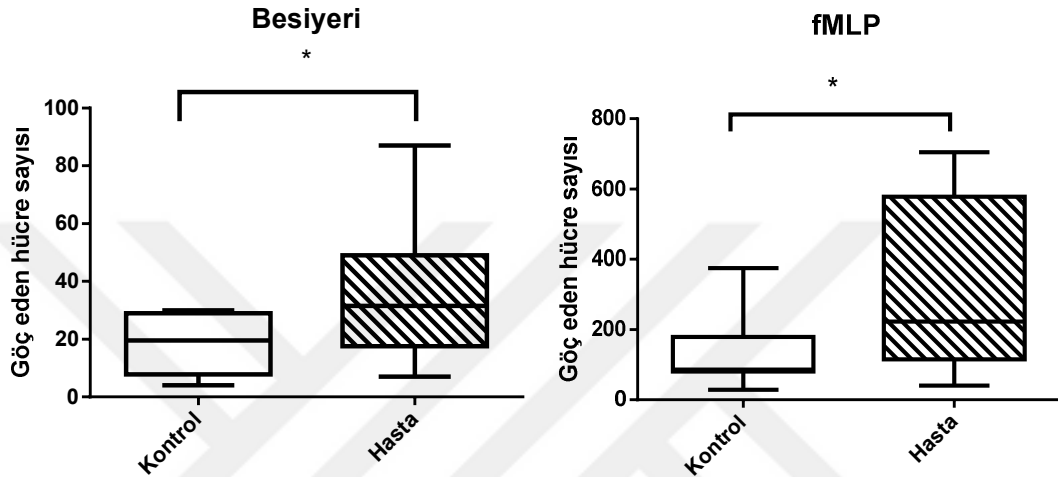
4.2. Filtre Deneyi İle Hücre Göçü Oranının Karşılaştırılması

Set 1'deki 10 hasta ve 10 kontrol bireyin nötrofilleri, fMLP uygulanmamış ve fMLP uygulanmış koşul için Kalsein-AM canlı boyaması ile görüntülendi. fMLP uygulamasının yapılmadığı ve 24 saat 100 nM fMLP uygulamasının yapıldığı koşulda, hasta nötrofil hücrelerinin filtrenin alt kompartmanına daha fazla sayıda göç ettiği gözlemlendi. Kontrol nötrofil hücrelerinin ise, her iki koşul için de filtrenin alt kompartmanına daha az sayıda göç ettiği tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İyi gidişli ile ataklı hasta ve kontrol nötrofillerinin, fMLP uygulanmamış ve 100 nM fMLP uygulanmış koşul için Kalsein-AM boyama görüntüleri.

Hem hasta hem de kontrol bireylerin her biri için rastgele 12 alanın mikroskop görüntüleri çekilerek filtrenin alt kompartmanına göç eden nötrofil hücreleri kantite edildi. Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri *Image J 1.46* programının 'parçaçık analizi' metodu kullanılarak analiz edildi. Hasta ve kontrol nötrofillerinde hücre göçü oranının karşılaştırılması Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

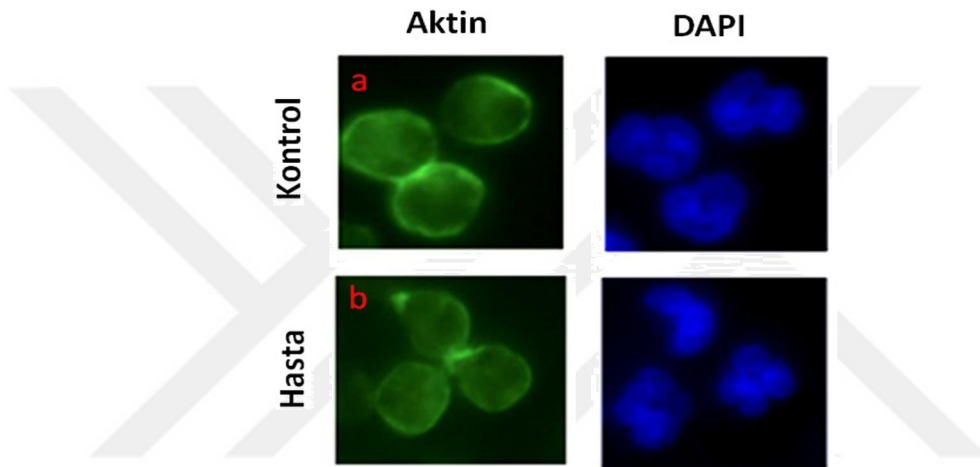


Şekil 4.3. Hasta ve kontrol nötrofillerinin filtrenin fMLP içermeyen (besiyeri) ve fMLP içeren alt kompartmanlara gerçekleştirdiği hücre göçü oranının karşılaştırıldığı grafik (* Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$).

Hasta ve kontrol nötrofillerinde hücre göçü oranını karşılaştıran şekle göre, fMLP uygulanmış koşulda hasta nötrofillerinde kontrol nötrofillerine kıyasla hücre göçü oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p=0.0414$). fMLP uygulanmamış koşulda ise, yine hasta nötrofillerinin kontrol nötrofillerine göre filtrenin alt kompartmanına istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla sayıda göç ettiği saptandı ($p=0.0449$). Hasta grubu kendi içinde karşılaştırıldığında ise, fMLP uygulanmış koşulda ataklı 3 AAA hastası ve iyi gidişli 7 AAA hastası arasında, göç oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0.5273$). fMLP uygulanmamış koşulda ise, yine ataklı ve iyi gidişli hastalar arasında göç oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.9500$).

4.3. Hücrelerde Polarizasyon Oranının Karşılaştırılması

Set 1'deki 10 kontrol ve M694V mutasyonuna sahip 10 hasta bireyin nötrofil hücrelerinde *Alexa Fluor® 488 Phalloidin* floresan boyaması gerçekleştirildi. Filamentöz yapıdaki aktif aktin iskeletine özgül olarak bağlanan *Phalloidin* ile, fMLP uygulanmamış ve 1 saat 50 uM fMLP uygulanmış koşullarda hücre polarizasyonunun gösterilmesi amaçlandı. Polarizasyon gözlenen ve gözlenmeyen nötrofil hücreleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

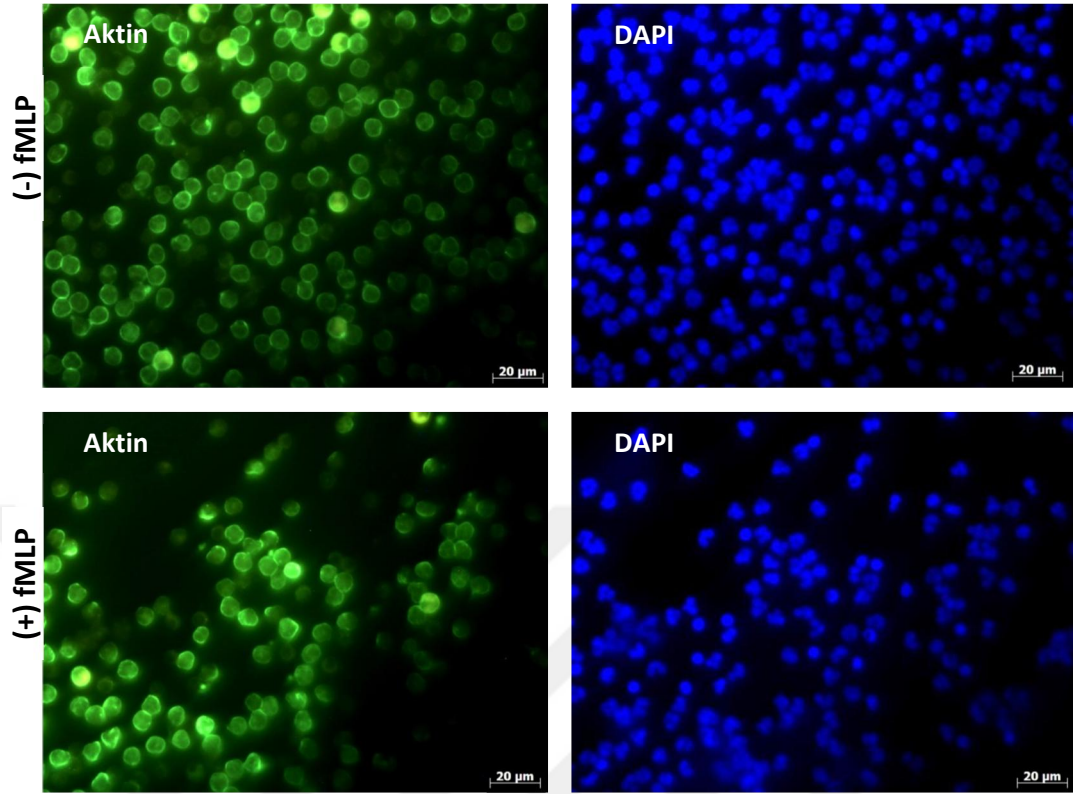


Şekil 4.4. fMLP ile uyarılmış nötrofil hücrelerinde aktin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyaması görüntüleri (Orijinal büyütme: 63X-Zoom). (a) Aktin polarizasyonu gerçekleşmemiş hücreler. Hücrede aktin iskeleti boyanmıştır ancak polarizasyon gözlenmemektedir. Hücre yuvarlak morfolojisini korumaktadır. (b) Aktin polarizasyonu gerçekleşmiş hücreler. Hücrenin ön kısmında bulunan polarize bölgede yoğun bir aktin boyanması gözlenmektedir. Hücre uzantı atarak yuvarlak morfolojisini kaybetmiştir.

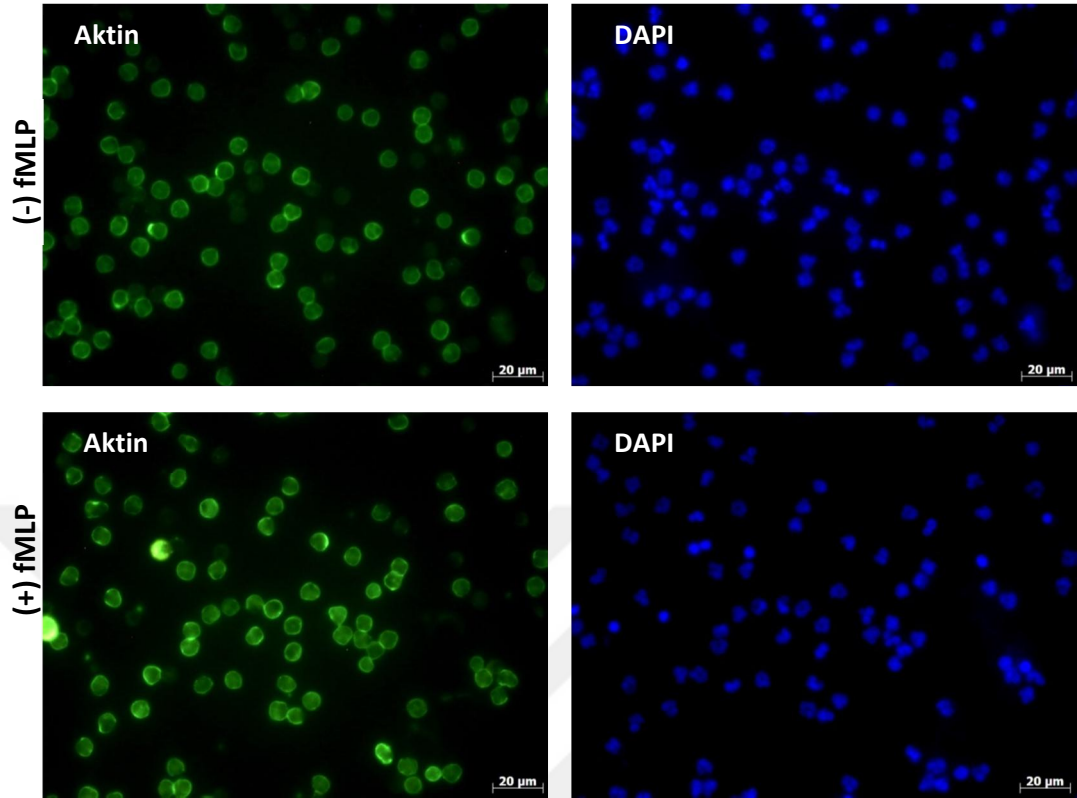
Tez çalışmasına katılan tüm hasta ve kontrol bireylerin *Phalloidin* boyaması yapılmış preparatlarında rastgele 6-10 alanın floresan mikroskop görüntüleri çekildi. Kontrol nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için (Şekil 4.5), iyi

gidişli AAA hastası nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için (Şekil 4.6) ve ataklı AAA hastası nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için (Şekil 4.7) ilgili şekiller verilmiştir. fMLP ile uyarılmış ve uyarılmamış koşul için, hücrelerin polarizasyon durumu görüntülendi (Şekil 4.8).

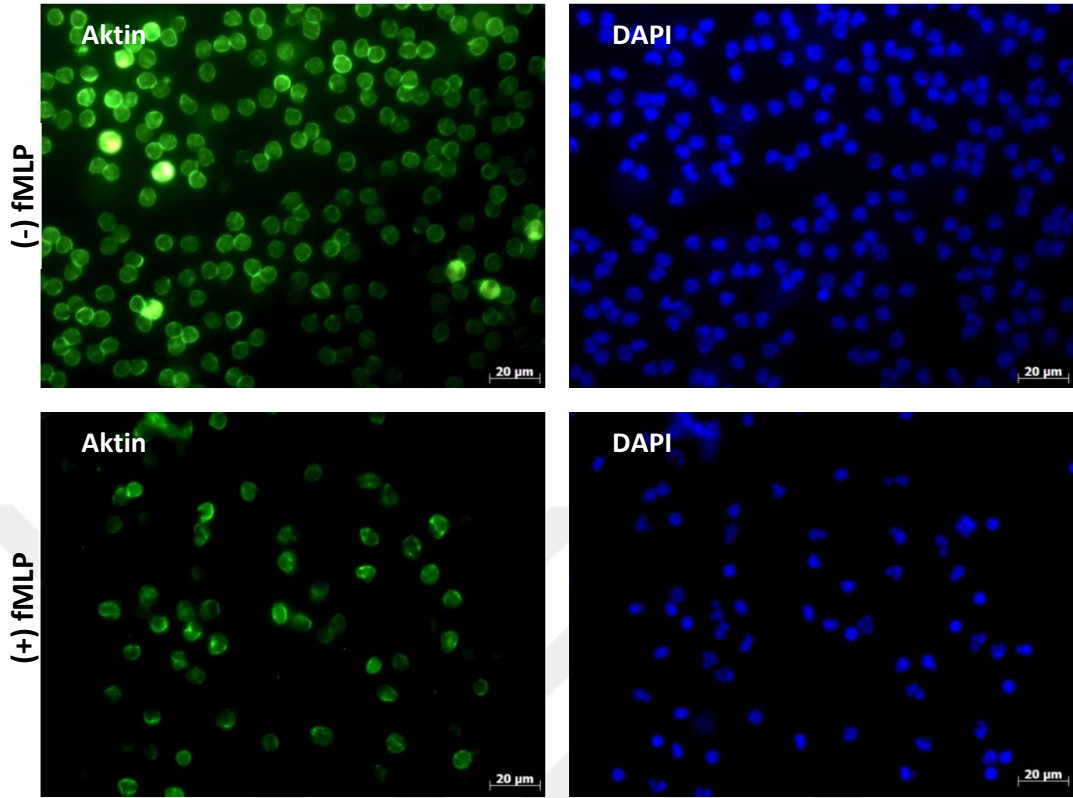




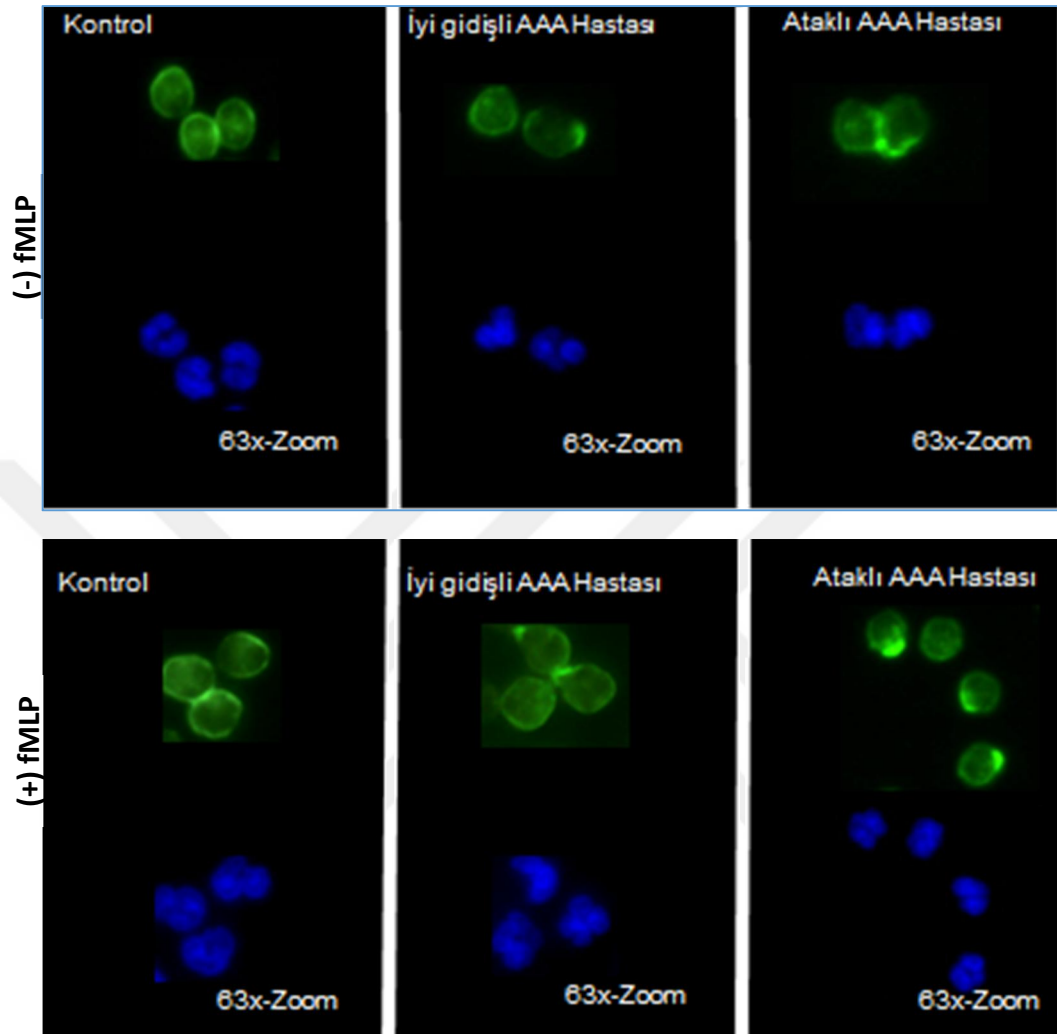
Şekil 4.5. Kontrol nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.6. İyi gidişli AAA hastası nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri.

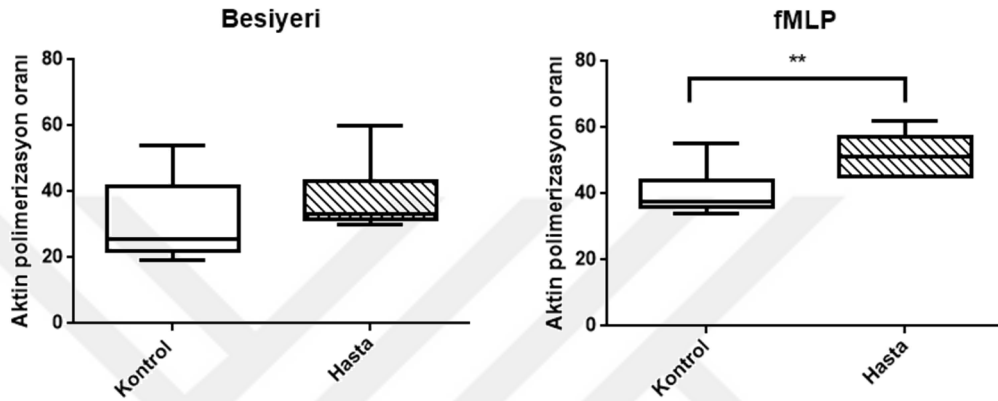


Şekil 4.7. Ataklı AAA hastası nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.8. Ataklı ile iyi gidişli hasta ve kontrol nötrofillerinde fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için Aktin (yeşil)- DAPI (mavi) boyamasının floresan mikroskop görüntüleri (Orijinal büyütme: 63X-Zoom).

Polarizasyon yüzdesini çıkarmak amacıyla her bir bireyin preparatından 100 hücre sayıldı. Böylelikle gruplar arasındaki hücre polarizasyon oranı karşılaştırıldı. fMLP ile uyarılmış ve uyarılmamış koşul için, hasta ve kontrol nötrofil hücrelerinde hücre göçü polarizasyonunun karşılaştırılması Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

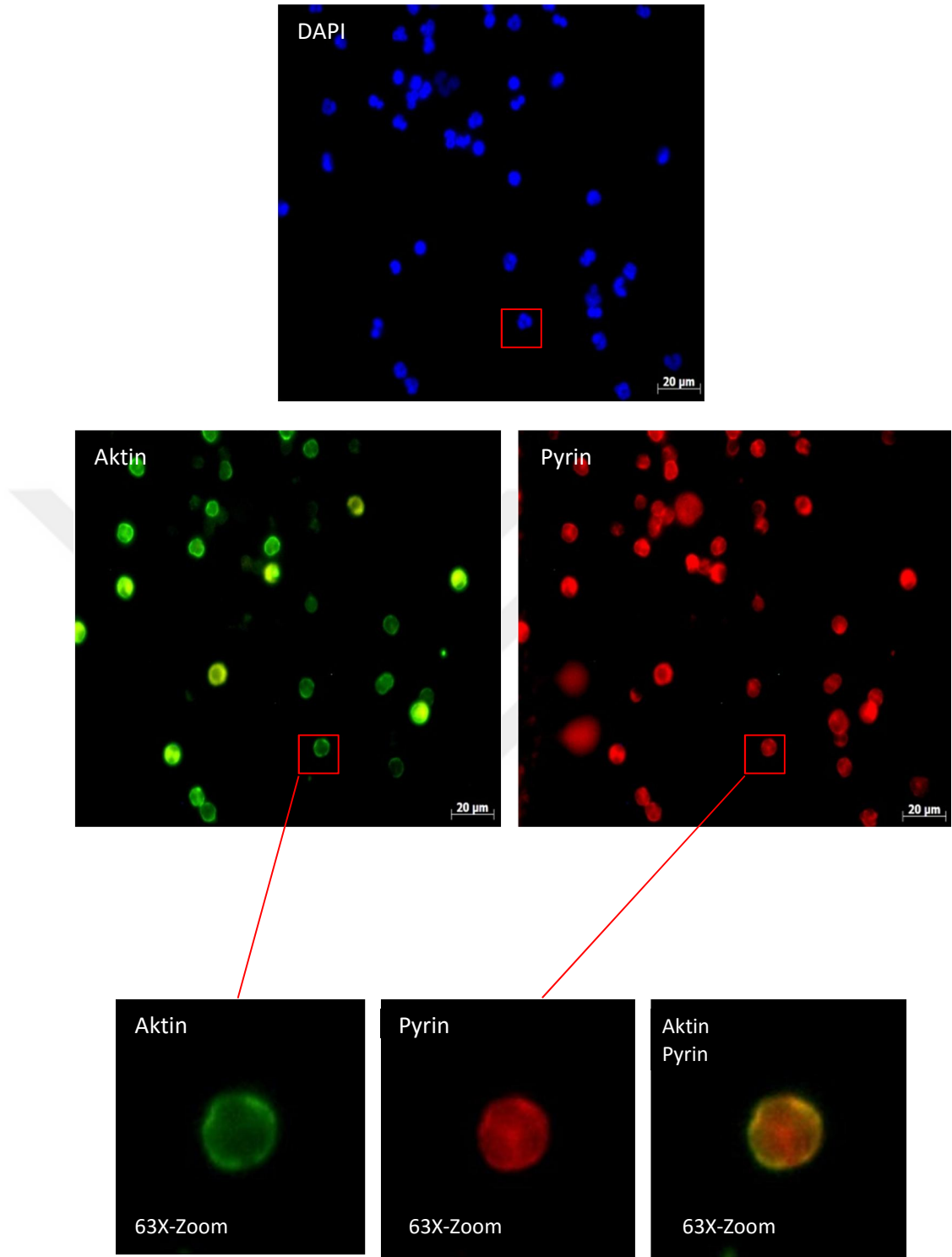


Şekil 4.9. Hasta ve kontrol nötrofillerinin fMLP uygulanmamış (besiyeri) ve fMLP uygulanmış koşuldaki polarizasyon oranı (** Mann-Whitney U-test, $p < 0.05$).

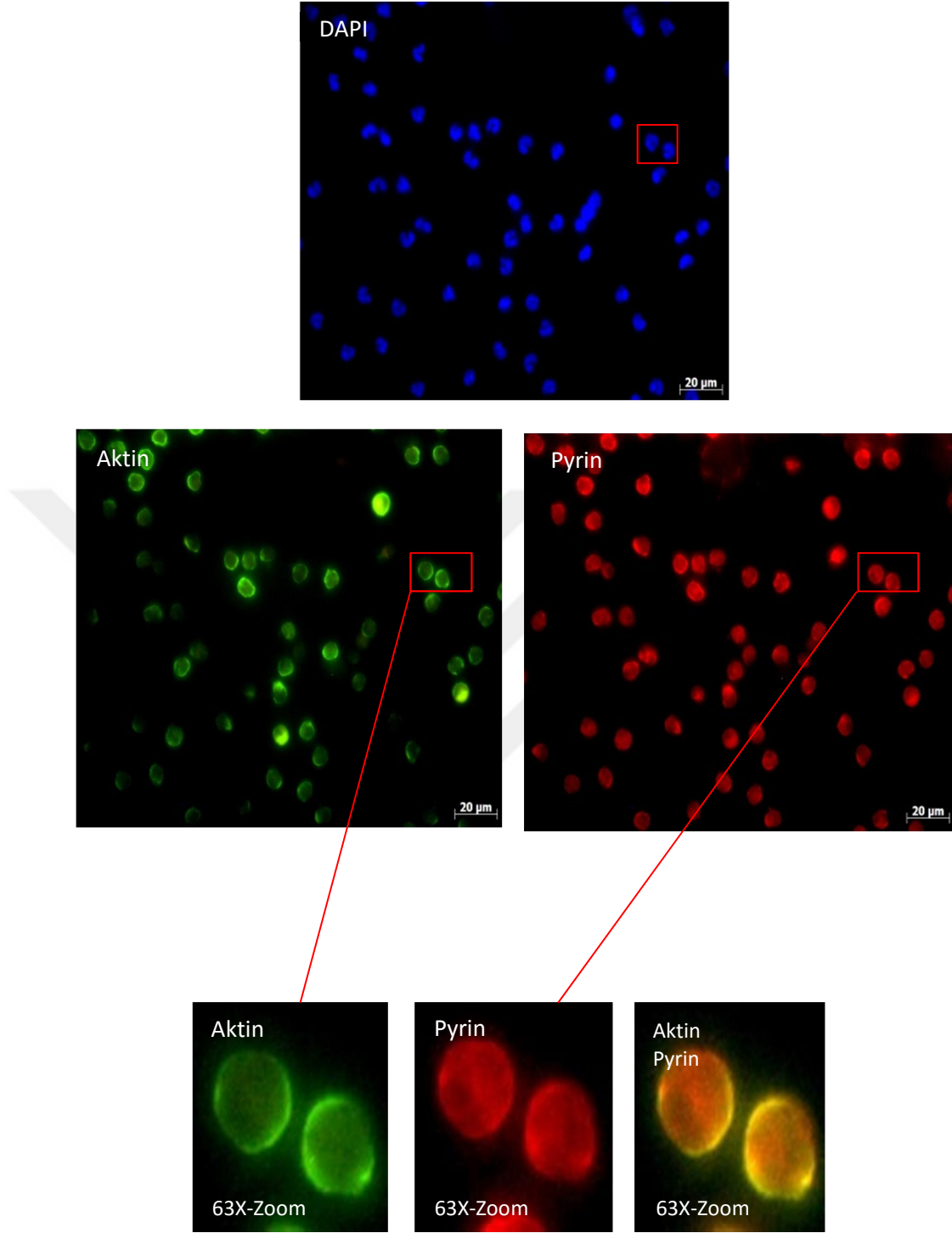
fMLP uygulanmış koşulda aktin polarizasyon yüzdesi hasta nötrofillerinde %52 , kontrol nötrofillerinde ise %40 olarak bulundu. Hasta nötrofillerindeki aktin polarizasyonunun kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.0016$). fMLP uygulanmamış koşulda ise, hasta nötrofillerinin aktin polimerizasyon yüzdesinin (%38), kontrollere (%31,5) göre daha fazla olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p=0.1590$). Ek olarak, hasta grubu kendi içinde karşılaştırıldı. fMLP uygulanmış koşulda aktin polimerizasyon yüzdesi, ataklı 3 AAA hastasında %52,8 iken, iyi gidişli 7 AAA hastasında %55 olarak bulundu. İki grup arasında aktin polarizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0.1417$). fMLP uygulanmamış koşulda ise, aktin polimerizasyon yüzdesi ataklı 3 AAA hastası için %35 iken, iyi gidişli 7 AAA hastası için %36 olarak bulundu. Bu koşul için de, iki grup arasında aktin polarizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0.8083$).

4.4. Pyrin Proteininin Hücre İçi Yerleşiminin Belirlenmesi

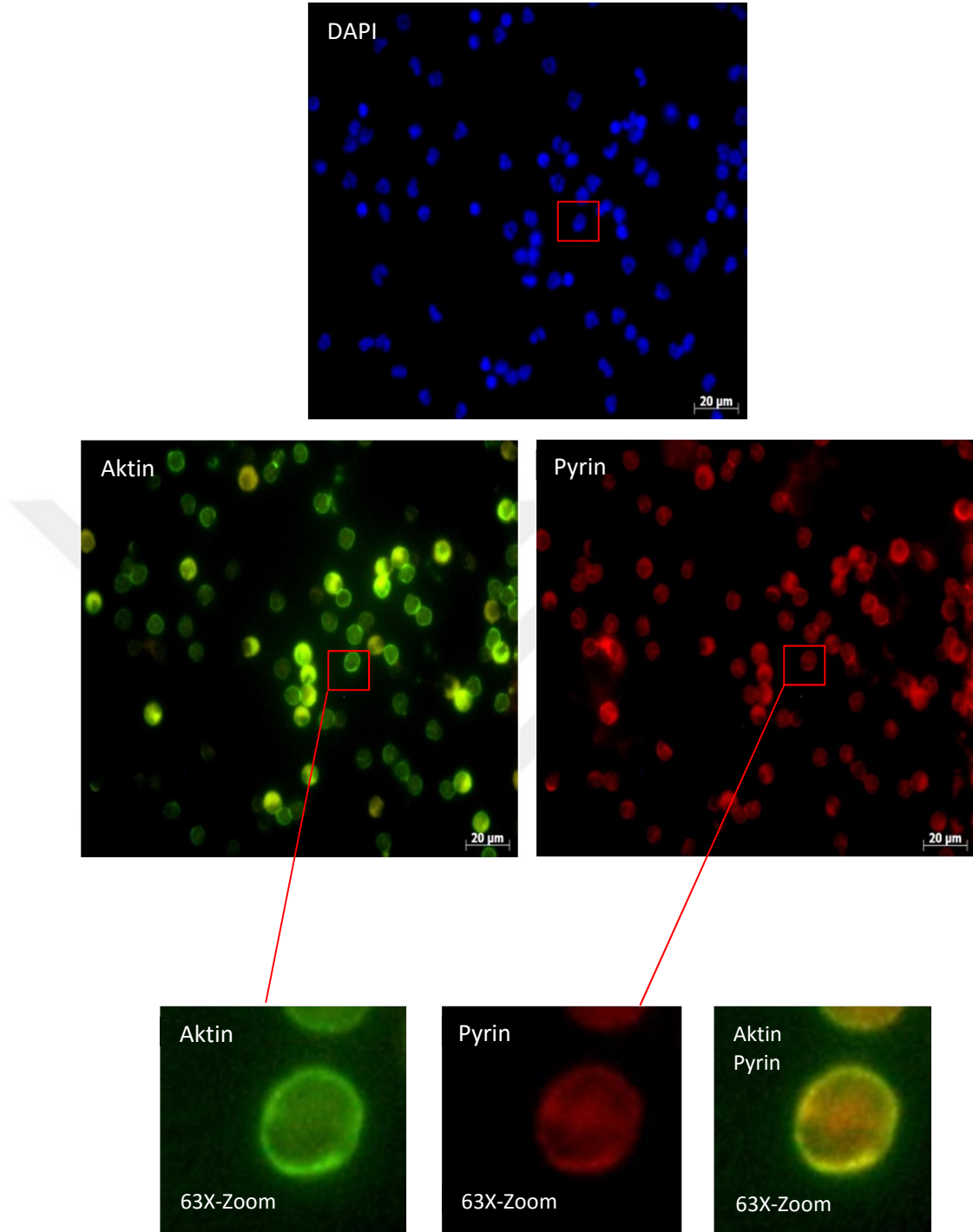
Pyrin'in hücre içi yerleşimini belirlemek amacıyla, filtre ve immünfloresan boyama deneylerine dahil edilen 10 hasta ve 10 kontrolün dışında yeni bir set kuruldu. Buna göre 1 kontrol, iyi gidişli 1 hasta ve yeni tanı almış 1 hastadan oluşan 2.setin nötrofil hücrelerinde, Pyrin-aktin eş boyaması gerçekleştirildi. Eş boyama sonuçlarına göre, fMLP uyarımının olmadığı durumda hasta ve kontrol nötrofillerinde Pyrin'in hem çekirdekte hem de sitoplazmada, aktinin ise sitoplazmada ve özellikle hücre membranının hemen altında yerleşim gösterdiği saptandı (Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). fMLP uyarımı sonrası ise, hasta ve kontrol bireylerin polarize olmuş hücrelerinde membran uzantılarına doğru, Pyrin'in aktin ile birlikte yerleşim gösterdiği belirlendi (Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



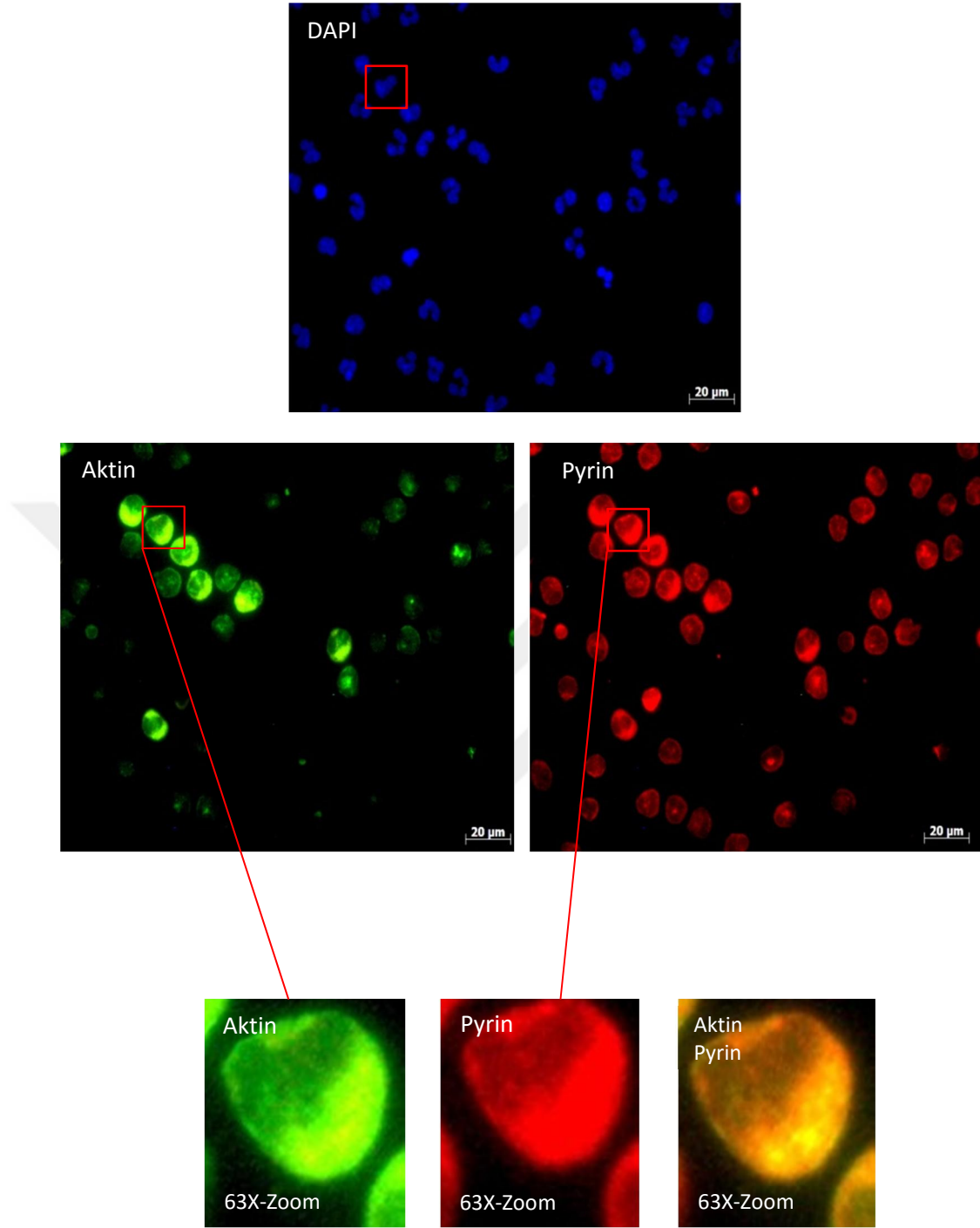
Şekil 4.10. fMLP ile uyarılmamış koşulda kontrol bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.



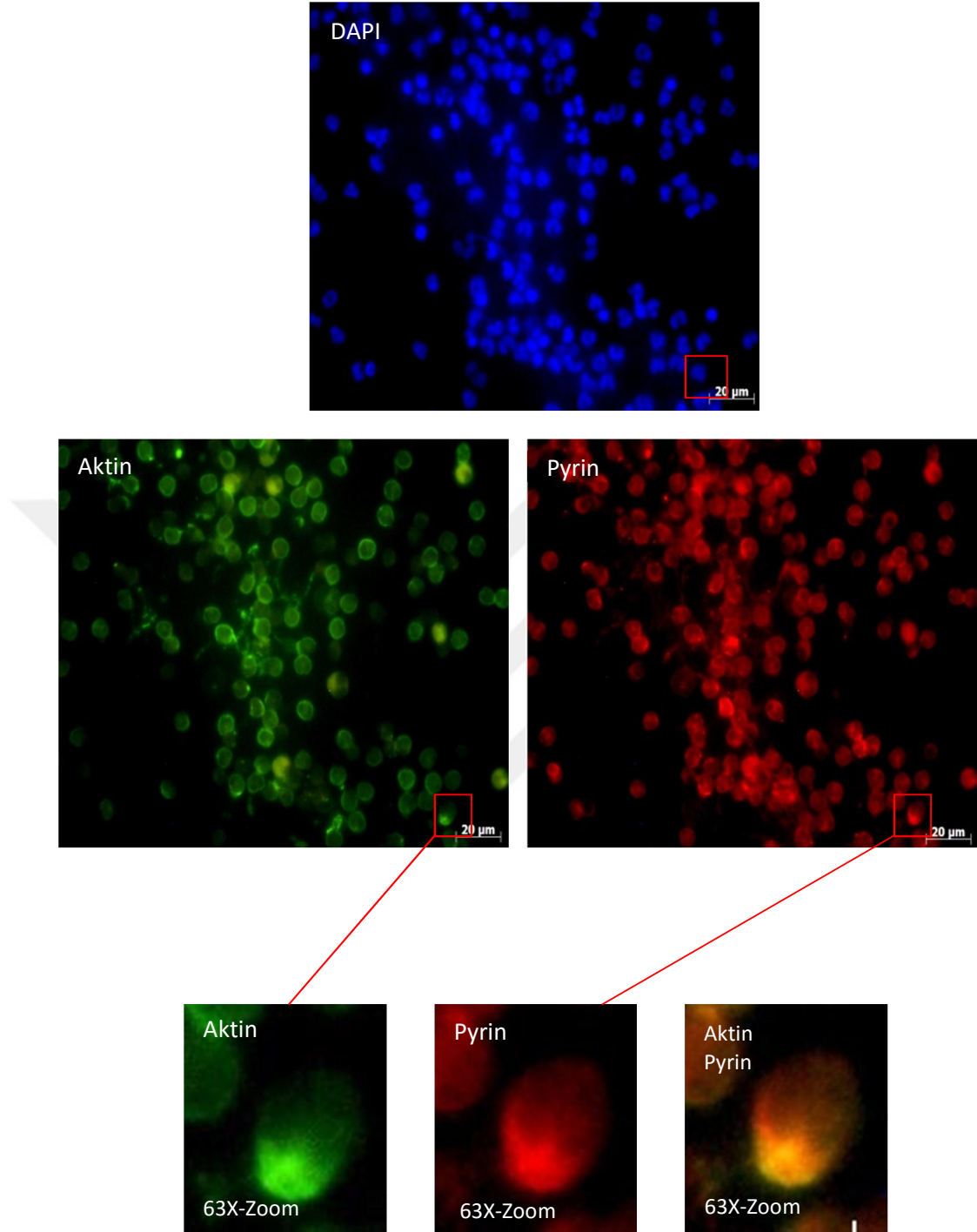
Şekil 4.11. fMLP ile uyarılmamış koşulda yeni tanı almış hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.



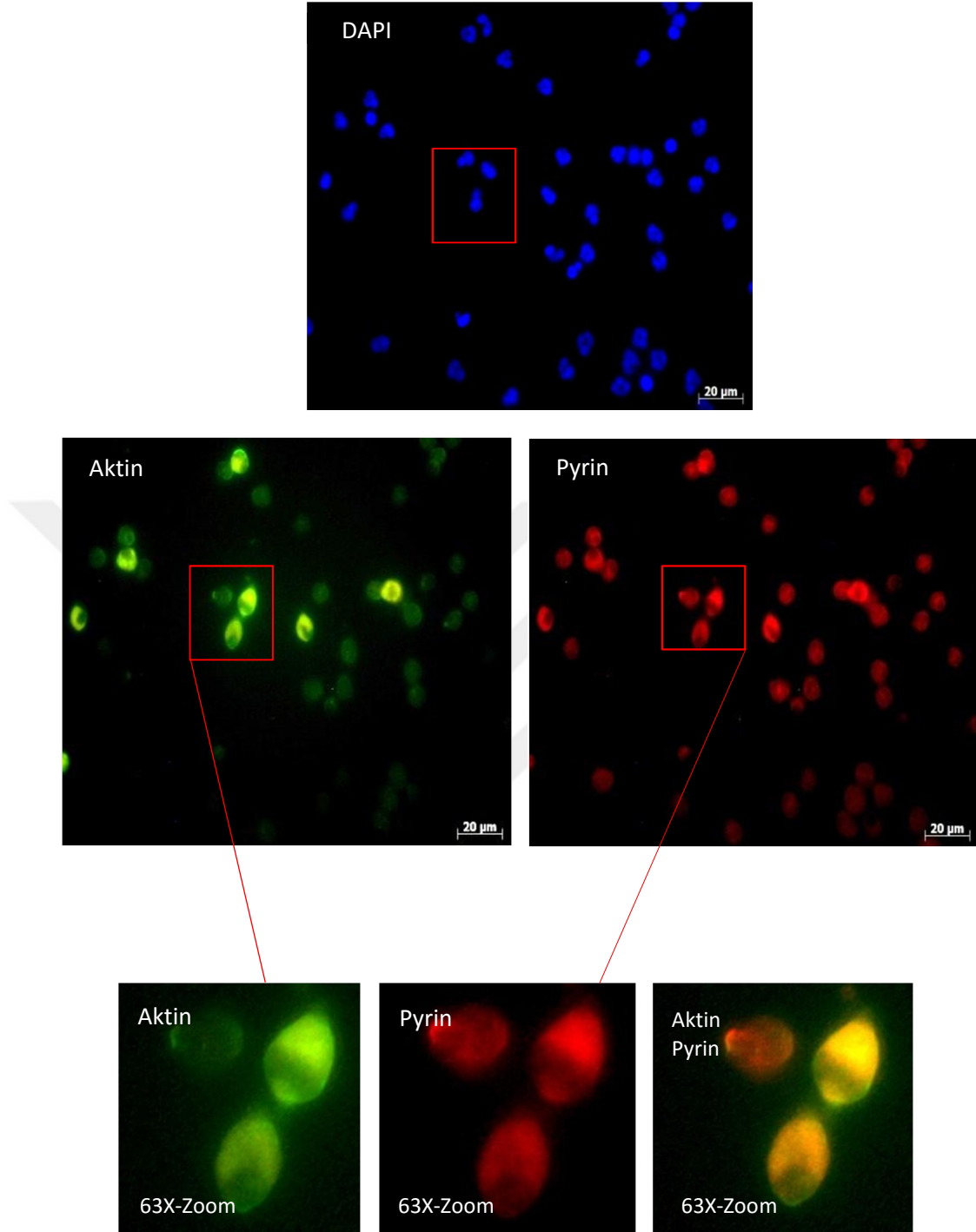
Şekil 4.12. fMLP ile uyarılmamış koşulda iyi gidişli hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.



Şekil 4.13. fMLP ile uyarılmış koşulda kontrol bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.



Şekil 4.14. fMLP ile uyarılmış koşulda yeni tanı almış hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.



Şekil 4.15. fMLP ile uyarılmış koşulda iyi gidişli hasta bireyin nötrofillerinde Pyrin-aktin eş boyama görüntüleri.

5. TARTIŞMA

İnflamasyon; enfeksiyon, yaralanma ve kontamine ajanlara maruz kalma gibi homeostasiyi bozan çeşitli durumlar karşısında vücudun gösterdiği özgül olmayan biyolojik bir reaksiyondur. İnflamatuvar yolak, omurgalı canlılarda sinyal molekülleri yardımıyla düzenlenen immünolojik, fizyolojik ve davranışsal olaylara aracılık eden karmaşık bir ağıdır (59).

İnflamasyonda rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, kontrolsüz inflamatuvar cevabın görüldüğü otoinflamatuvar hastalıklara neden olmaktadır. Otoinflamatuvar bir hastalık olan AAA ise, Pyrin proteinini kodlayan MEFV genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ve Türk toplumunda yaygın görülen bir hastalıktır (4, 5).

AAA patogenezinin sorumlu Pyrin proteininin işlevi halen bilinmemekle beraber, ilişkide olduğu proteinler aracılığıyla inflamasyonla ilişkili yolaklarda görev aldığı bilinmektedir (4, 13). İnsan monositlerinde Pyrin'in aktif aktin ile hücrenin ön kısmında göç yönünde beraber yerleşim gösterdiği saptanmıştır. Bu bulguyu destekleyecek biçimde; tübülün, aktin ve aktin ile interaksiyona girdiği bilinen VASP ve Arp2-3 gibi proteinlerle yakın ilişki içinde olması Pyrin'in inflamatuvar hücre göçünde rol oynadığını düşündürmektedir (7, 60). Bu bulgulara ek olarak, Pyrin'in HL-60 hücrelerinde, hücre göçünden sorumlu bir diğer protein olan PSTPIP1 ile polarize uçta birlikte yerleşim gösterdiği saptanmıştır (41). İnflamatuvar hücre göçünde görev aldığı düşünülen Pyrin proteininin AAA patogenezinde pro-inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar bir düzenleyici olarak yer aldığı tartışmalıdır.

Pek çok çalışmada, hücre hatları ve hayvan modelleri kullanılarak, Pyrin'in PSTPIP1 ve ASC proteinleri ile interaksiyona girdiği, kaspaz-1 ile NF- κ B aktivasyonunu düzenlediği ve pro-inflamatuvar bir sitokin olduğu bilinen IL-1 β sentezi yolağına katıldığı gösterilmiştir (8,9). Grubumuzun da içinde olduğu diğer başka çalışmalarda ise, Pyrin'in inflamatuvar hücre göçünde yer aldığı, bir kemoatraktan karşısında hücre göçünü arttırdığı, aktin ile ilişkili proteinlerle ve

PSTPIP1 ile hücrenin ön kısmında göç yönünde yerleşim gösterdiği bulunmuştur (7,60).

Bu tez çalışması, AAA hastalarında primer nötrofil hücreleri kullanılarak inflamatuvar hücre göçünün araştırılmasını ve Pyrin'in olası işlevinin yorumlanmasını amaçlamaktadır. Bu kapsamda, klinik değerlendirmeler sonucu AAA tanısı almış ve genetik analizler ile her iki alleli de M694V mutasyonu için homozigot olduğu gösterilmiş 12 hasta ve 11 kontrol bireyden alınan kan örneklerinden izole edilen nötrofil hücrelerinde inflamatuvar hücre göçü araştırılmıştır. Klinik testler ile kanda yükselen inflamasyon belirteçleri değerlendirilerek çalışma grupları oluşturulmuştur. Tez kapsamında nötrofil hücreleriyle çalışılmasının sebebi, inflamatuvar bölgeye ulaşan ilk hücre grubu olmaları ve Pyrin proteinini esas olarak ifade etmeleridir (3, 46).

Tez çalışmasının ilk aşamasında, 10 sağlıklı ve 10 hasta bireyin filtre deneyleri aracılığıyla fMLP uygulanmamış ve fMLP uygulanmış koşul için göç eden hücreleri sayısal olarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen kantitatif analiz sonuçlarına göre, hasta nötrofillerinin kontrol bireylere kıyasla hem fMLP uygulanmamış hem de fMLP uygulanmış koşulda daha fazla sayıda göç ettiği saptanmıştır ($p < 0.05$). Hastalar, atak geçiren 3 ve iyi gidişli 7 AAA hastası olarak fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, göç eden hücre sayısı açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$). Atak geçiren ve iyi gidişli AAA hastaları arasında, göç eden hücre sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemesi atak esnasında hastaların nötrofillerinde apoptoz artışı olduğunu düşündürmüştür. Atak durumuna ek olarak, izolasyon işlemi ile doğal ortamından ayrılan nötrofillerde *in vitro* koşullarda geçirdikleri süre ile doğru orantılı olarak hücre ölümünün artması beklenmektedir. fMLP uyarımı sonrası apoptoz artışının sonucu olarak ataklı hastalarda göç eden hücreler canlı hücre boyası olan Kalsein-AM ile saptanamamış olabilir. Bu bulguyu destekleyecek şekilde, Özen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada atak geçiren AAA hastalarında CRP ve ESH değerleri ile birlikte nötrofil ve monosit apoptozunun da arttığı gösterilmiştir. Ataklı hastalarda görülen apoptoz artışı, istenmeyen inflamatuvar hücrelerin temizlenmesi ve doku hasarının

önlenmesi için hücrenin oluşturduğu bir cevap olarak yorumlanmaktadır. Ayrıca, AAA hastalarında atakların kendiliğinden ortadan kalkması artan nötrofil ve monosit apoptozu ile ilişkilendirilmektedir (61). Atak geçiren ve iyi gidişli AAA hastalarına dair elde edilen bu bulgu yorumlanırken, gruplar arasında sayısal fark olduğu da göz önüne alınmalıdır. Bu datayı geliştirebilmek için gruptaki birey sayılarının eşitlenmesi ve daha fazla hasta ile örneklemin arttırılması gereklidir. En büyük dezavantaj ise, atak geçiren hasta bulmanın zorluğudur.

Tezin ikinci aşamasında ise, floresan boyama tekniği ile sağlıklı ve hasta bireylerin polarizasyon oranları karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, fMLP uygulanmış koşulda hasta nötrofillerinde %52 oranında, kontrol bireylerde ise %40 oranında polarizasyon görülmüştür ($p<0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasına karşın, hasta bireylerde kontrollere kıyasla polarizasyon yüzdesinin beklenilenden daha düşük olması hastaların yüksek dozda günlük kolşisin kullanımı ile açıklanabilir. Kolşisinin anti-inflamatuvar etkisi sebebiyle daha az sayıda hücre göçe uyarılmış olabilir. Tez kapsamında belirlenen fMLP konsantrasyonundan daha yüksek dozlarla hücreler göçe uyarılmaya çalışılmıştır ancak çekirdek morfolojisine bakıldığında bu dozların hücreye toksik geldiği görülmüştür. fMLP uygulanmamış koşulda ise, polarizasyon yüzdesi hasta bireyler için %38 iken, kontrol bireyler için %31,5'dir ($p>0.05$). Ortamda hücre göçünü başlatacak bir tetikleyici olmadığı halde, kontrol bireylerin polarizasyon yüzdesinin hastalara yakın olmasının nedeni, nötrofil izolasyonu esnasında gerçekleştirilen bazı işlemler ile açıklanabilir. Literatürde, nötrofillerin izolasyon esnasında kolaylıkla aktive olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. Yüksek hızda santrifüj yapılması, elde edilen peletin hızlı hareketlerle süspanse edilmesi, vorteks işleminin yüksek hızda gerçekleştirilmesi, kullanılan izolasyon solüsyonunun steril olmaması gibi çeşitli koşulların nötrofil aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (62, 63). Hastalar, atak geçiren 3 ve iyi gidişli 7 AAA hastası olarak fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, aktin polimerizasyonu açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). Atak geçiren 3 AAA hastası için aktin polimerizasyon yüzdesi fMLP uygulanmış koşulda %55 iken, uygulanmamış koşulda %35'tir. İyi gidişli 7 AAA

hastası içinse ise, bu değerler fMLP uygulanmış koşulda %52,8, uygulanmamış koşulda %36 olarak saptanmıştır. Filtre deneylerinde olduğu gibi, bu verinin de geliştirebilmesi için gruptaki birey sayılarının eşitlenmesi ve daha fazla hasta ile örneklemin arttırılması gerekmektedir.

Tezin üçüncü aşamasında ise, hasta ve kontrol nötrofillerinde Pyrin-aktin hücre içi yerleşimi belirlenmiştir. fMLP uygulanmamış koşulda, hasta ve kontrol nötrofillerinde Pyrin'in hem çekirdekte hem de sitoplazmada, aktinin ise sitoplazmada ve özellikle hücre membranının hemen altında yerleşim gösterdiği saptanmıştır. fMLP uygulanmış koşulda ise, hasta ve kontrol nötrofillerinde Pyrin proteininin aktin ile beraber polarize uçta birlikte yerleşim gösterdiği saptanmıştır. Böylelikle, M694V mutasyonunun Pyrin proteininin aktin ile olan ilişkisini bozmadığı belirlenmiştir.

Tüm bulgular beraber değerlendirildiğinde, hastalarda kolşisin kullanımına rağmen devam eden subklinik bir inflamasyonun olduğu görülmektedir. Literatürde de, AAA hastalarında subklinik inflamasyona işaret edecek şekilde kronik inflamasyon belirteçlerinin atak geçirilmeyen dönemde dahi sağlıklı bireylere kıyasla yüksek seviyelerde bulunduğu belirtilmiştir (17). Bu tez çalışması ile birlikte AAA hastalarında görülen subklinik inflamasyon, ilk defa nötrofil hücresi düzeyinde gösterilmiştir.

Literatürde Pyrin'in hücre göçünde görev aldığı bilinen ve aktin ile yakın ilişki içerisinde olan PSTPIP1 proteini ile interaksiyona girdiği gösterilmiştir. PAPA sendromundan sorumlu olan PSTPIP1 proteininin mutant olduğu durumda, Pyrin proteinine yüksek afinite ile bağlandığı ve IL-1 β salınımının arttığı saptanmıştır. siRNA teknolojisi ile Pyrin ifadesi susturulduğunda kaspaz-1 aktivasyonu ve buna bağlı olarak IL-1 β salınımının gerçekleşmediği görülmüştür (39). Grubumuzun nötrofil benzeri HL-60 hücrelerinde Pyrin ifadesini baskılayarak gerçekleştirdiği çalışmalar sonucunda, bu hücrelerin kemoatraktan uygulaması sonrası düşük polarizasyon ve hücre göçü gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise, Pyrin'in aktin ve aktin ile ilişkili proteinlerle hücre göçü esnasında birlikte yerleşim

gösterdikleri saptanmıştır (42, 60). Tüm bu veriler ve tez kapsamında elde edilen sağlıklı bireylere ait nötrofillerin kemoatraktan uyarımı sonrası artan hücre göçü gösterdiği sonucu birbirini desteklemektedir. Örtüşen bu bulgular, doğal Pyrin proteininin aktin iskeleti üzerinden PSTPIP1 ile interaksiyona girerek hücre göçünü başlattığını, başka bir deyişle Pyrin'in pro-inflamatuvar bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

Tez kapsamında, M694V mutasyonu için homozigot AAA hastalarında, bir kemoatraktan gradiyenti boyunca sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı bir hücre göçünün gerçekleştiği saptanmıştır. Elde edilen bu veri, AAA ile ilişkili mutasyonların artan inflamasyona neden olduğu ve bu mutasyonların Pyrin'in aktivitesini değiştirerek hastalarda görülen patolojiye neden olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuç, en ağır klinik fenotipin görüldüğü M694V mutasyonu için homozigot AAA hastalarında hastalık şiddeti ile artan hücre göçü arasında bir korelasyonun olduğunu düşündürmektedir. Bu durumun, mutasyona özgül olup olmadığını anlayabilmek için M680I, V726A ve E148Q gibi başka mutasyonları taşıyan hasta bireylerde de hücre göçü oranının araştırılması gereklidir.

Tez kapsamında yapılan analizler sonucunda elde edilen verilere göre; M694V için homozigot AAA hastalarında yoğun inflamatuvar hücre göçünün görülmesinin nedeni, mutant Pyrin'in işlev kazanımına sebep olan mutasyonlar (*gain of function mutation*) ile aktivitesinin değişmesi şeklinde yorumlanabilir.

Bu çalışmada karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, nötrofillerin *in vitro* ortamda manipüle edilmesi zor hücreler olmalarıdır. Ancak, tez kapsamında hücre göçünü analiz etmek amacıyla kullanılan filtre deneyi ve immünfloresan boyama yöntemleri primer nötrofil hücrelerinde optimize edilmiştir. Bu yöntemlerin, nötrofil aracılı inflamatuvar hücre göçünün görüldüğü başka otoinflamatuvar hastalıklar için de uygulanabilir olması tez çalışmasının önemli artılarından biridir.

Tez sonunda elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmanın Pyrin'in inflamasyondaki olası rolünü aydınlatmaya yardımcı olacağı ve literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Ayrıca, hücre göçü ile ilgili elde

edilen bilgiler, otoinflamatuvar hastalıklara sebep olan faktörlerin, Pyrin proteininin içinde bulunduğu hücre göçü yolağı açısından değerlendirilmesine ve bu sayede yeni etkin koruyucu veya tedavi protokollerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Set 1'in filtre deneylerinde fMLP uygulanmamış ve uygulanmış koşullarda hasta nötrofillerinin kontrol bireylere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla sayıda göç ettiği saptandı ($p<0.05$). Atak geçiren hastalar ile iyi gidişli (tedaviye iyi cevap veren) hastalar arasında göç eden hücre sayısı bakımından fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşulda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).
- Set 1'in floresan boyama deneylerinde fMLP uygulanmış koşullarda hasta nötrofillerinin aktin polarizasyon yüzdesinin (%52) kontrol bireylere kıyasla (%40) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gösterildi ($p<0.05$). fMLP uygulanmamış koşulda ise, hasta nötrofillerinin aktin polimerizasyon yüzdesinin (%38), kontrollere (%31,5) göre daha fazla olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$).
- Set 1'deki ataklı ve iyi gidişli hastaların aktin polarizasyonu karşılaştırıldığında ise, fMLP uygulanmış ve uygulanmamış koşul için istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). fMLP uygulanmış koşulda aktin polimerizasyon yüzdesi, ataklı AAA hastaları için %52,8, iyi gidişli AAA hastaları içinse %55 olarak saptandı. fMLP uygulanmamış koşulda ise, aktin polimerizasyon yüzdesi ataklı 3 hastaları için %35 iken, iyi gidişli 7 AAA hastası için %36 olarak belirlendi.
- Set 2'nin immünfloresan boyama deneylerinde fMLP uygulanmış koşulda, hasta ve kontrol bireylerin polarize olmuş hücrelerinde membran uzantılarına doğru, Pyrin'in aktin ile birlikte yerleşim gösterdiği belirlendi.
- fMLP uygulanmamış koşulda ise, hasta ve kontrol nötrofillerinde Pyrin'in hem çekirdekte hem de sitoplazmada, aktinin ise sitoplazmada ve özellikle hücre membranının hemen altında yerleşim gösterdiği saptandı.
- Filtre ve floresan boyama deneyleri ile AAA hastalarında kolşisin tedavisine rağmen subklinik inflamasyonun olduğu nötrofil hücresi düzeyinde gösterildi.

- Hücre göçünü analiz etmek amacıyla kullanılan filtre deneyi ve immünfloresan boyama yöntemleri, *in vitro* çalışmalar açısından zor bir hücre grubu olan primer nötrofil hücrelerinde optimize edilmiş oldu.

6.2. Öneriler

- Türk toplumunda sık görülen M680I, V726A ve E148Q gibi başka mutasyonları taşıyan hasta bireylerde hücre göçü oranı araştırılmalıdır.
- Hücre göçünü analiz etmek için kullanılan ve yönlü polarizasyona izin veren, kantitasyona dayalı başka analiz sistemleri kullanılarak AAA hastalarında elde edilen veriler doğrulanmalıdır.
- Bu tez kapsamında optimize edilmiş laboratuvar metodları, nötrofil aracılı inflamatuvar hücre göçünün görüldüğü başka otoinflamatuvar hastalıklar için kullanılıp test edilmelidir.

Önerilen çalışmaların tamamlanması ile Pyrin'in inflamatuvar hücre göçü sürecine etkisi ve olası görevi hakkında daha detaylı bilgi elde edilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Doherty, T.A., Brydges, S.D., Hoffman, H.M. (2011). Autoinflammation: translating mechanism to therapy. *J Leukoc Biol*, 90 (1), 37-47.
2. Martinon, F., Aksentijevich, I. (2015). New players driving inflammation in monogenic autoinflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 11 (1), 11-20.
3. Grandemange, S., Aksentijevich, I., Jeru, I., Gul, A., Touitou, I. (2011). The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes Immun*, 12 (7), 497-503.
4. Chae, J.J., Aksentijevich, I., 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. Kumar, V., Sharma, A. (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*, 10 (11), 1325-1334.
6. Seshadri, S., Duncan, M.D., Hart, J.M., Gavrilin, M.A., Wewers, M.D. (2007). Pyrin Levels in Human Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages Regulate IL-1 β Processing and Release. *The Journal of Immunology*, 179 (2), 1274-1281.
7. Waite, A.L., Schaner, P., Hu, C., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Hong, A. (2009). Pyrin and ASC co-localize to cellular sites that are rich in polymerizing actin. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234 (1), 40-52.
8. Yu, J.W., Wu, J., Zhang, Z., Datta, P., Ibrahimi, I., Taniguchi, S. ve diğ erleri. (2006). CryoPyrin and Pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ*, 13 (2), 236-249.
9. Chae, J.J., Wood, G., Richard, K., Jaffe, H., Colburn, N.T., Masters, S.L. ve diğ erleri. (2008). The familial Mediterranean fever protein, Pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kB through its N-terminal fragment. *Blood*, 112 (5), 1794-1803.
10. Bonfrat, L. (2014). Familial Mediterranean Fever: From Pathogenesis to Treatment. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, 05 (05).

11. Portincasa, P., Scaccianoce, G., Palasciano, G. (2013). Familial mediterranean fever: a fascinating model of inherited autoinflammatory disorder. *Eur J Clin Invest*, 43 (12), 1314-1327.
12. Cattan, D., Notarnicola, C., Molinari, N., Touitou, I. (2000). Inflammatory bowel disease in non-Ashkenazi Jews with familial Mediterranean fever. *The Lancet*, 355 (9201), 378-379.
13. Schaner, P.E., Gumucio, D.L. (2005). Familial Mediterranean Fever in the Post-Genomic Era: How an Ancient Disease is Providing New Insights into Inflammatory Pathways. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4, 67-76.
14. Turkish FMF Study Group. (2005) Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey. *Medicine*, 84 (1), 1-11.
15. Yilmaz, E., Ozen, S., Balci, B., Duzova, A., Topaloglu, R., Besbas, N., Saatci, U. ve diğ erleri. (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.
16. Infevers. Eriş im: Ocak 2016, <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/index.php>
17. Ben-Zvi, I., Livneh, A. (2011). Chronic inflammation in FMF: markers, risk factors, outcomes and therapy. *Nat Rev Rheumatol*, 7 (2), 105-112.
18. Ozen, S., Bilginer, Y. (2014). A clinical guide to autoinflammatory diseases: familial Mediterranean fever and next-of-kin. *Nat Rev Rheumatol*, 10 (3), 135-147.
19. Lidar, M., Livneh, A. (2007) Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *Neth J Med*, 65, 318–324.
20. Korkmaz, C., Ozdogan, H., Kasapcopur, O., Yazici, H. (2002) Acute phase response in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*, 61(1), 79–81.
21. Hardison, CS. (1968). The sedimentation rate. Erythrocyte sedimentation rate; blood sedimentation rate. *JAMA*, 204, 257.

22. Happe, MR., Battafarano, DF., Dooley, DP., ve diğeri. (2002). Validation of the Dienes Mini-Ves erythrocyte sedimentation rate (ESR) analyzer using the Westergren ESR method in patients with systemic inflammatory conditions. *Am J Clin Pathol*, 118, 14-7.
23. Erer, B., Demirkaya, E., Ozen, S., Kallinich, T. (2015). What is the best acute phase reactant for familial Mediterranean fever follow-up and its role in the prediction of complications? A systematic review. *Rheumatol Int*, [Epub ahead of print].
24. Volanakis, JE. (2001). Human C-reactive protein: Expression, structure, and function. *Mol Immunol*, 38: 189-97.
25. Meier-Ewert, HK., Ridker, PM., Rifai, N., ve diğeri. (2001). Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem*, 47: 426-30.
26. Frohlich, M., Sund, M., Thorand, B., ve diğeri. (2002). Lack of seasonal variation in C-reactive protein. *Clin Chem*, 48: 575-7.
27. Szalai, AJ., McCrory, MA., Cooper, GS., ve diğeri. (2002). Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immun*, 3: 14-9.
28. Goldfinger, SE. (1972) Colchicine for familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* , 287, 1302.
29. Taskiran, E.Z., Cetinkaya, A., Balci-Peynircioglu, B., Akkaya, Y.Z., Yilmaz, E. (2012) The effect of colchicine on Pyrin and Pyrin interacting proteins. *J Cell Biochem*, 113 (11), 3536-3546.
30. Centola, M., Wood, G., Frucht, DM., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C. ve diğeri. (2000). The gene for familial mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95 (10), 3223-3231.

31. Touitou, I. (2001). The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*, 9, 473-483.
32. Gumucio, D.L., Diaz, A., Schaner, P., Richards, N., Babcock, C., ve diğerleri. (2002). Fire and ice: The role of Pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20, 45-53.
33. Wood, G., Kanno, Y., Sun, H., Gutierrez-Cruz, G., Aksentijevich, I., Kastner, D. (2015). Identification of pyrin targets by ChIP-Seq. *Pediatric Rheumatology*, 13 (Suppl 1):P125.
34. Richards, N., Schaner, P., Diaz, A., Stuckey, J., Shelden, E., Wadhwa, A. ve diğerleri. (2001). Interaction between Pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *The journal of biological chemistry*, 276 (42), 39320-39329.
35. Balci-Peynircioglu, B., Waite, A., Hu, C., Richards, N. ve diğerleri. (2008). Pyrin, product of MEFV locus, Interacts with the proapoptotic protein, siva. *The Journal of Cellular Physiology*, 216: 595–602.
36. Fink, S.L., Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73 (4), 1907-1916.
37. Seshadri, S., Duncan, M.D., Hart, J.M., Gavrilin, M.A. ve diğerleri. (2007). Pyrin Levels in Human Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages Regulate IL-1 β Processing and Release. *The Journal of Immunology*, 179: 1274–1281.
38. Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Nuñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nature Immunology*, 10 (3).
39. Yu, J.W., Fernandes-Alnemri, T., Datta, P., Wu, J., Juliana, C., Solorzano, L., McCormick, M., Zhang, Z., Alnemri, E.S. (2007). Pyrin activates the ASC

pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell*, 26; 28(2): 214–227.

40. Çetinkaya, A. (2011). Pyrin Proteininin Hücre Göçü Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

41. Akkaya-Ulum, Z.Y., Balci-Peynircioglu, B., Puralı, N., Yılmaz, E. (2015) Pyrin–PSTPIP1 colocalises at the leading edge during cell migration. *Cell Biol Int*, 39, 1384–1394.

42. Güler, C. (2014). İnflamatuvar Hücre Göçü Sürecimde Aktin İle İlişkili Genlerin İfadelerinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

43. Chae, J.J., Cho, Y.H., Lee, G.S., Cheng, J., Liu, P.P., Feigenbaum, L., Katz, S.I., Kastner, D.L. (2011). Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*, 27;34 (5) :755-68.

44. Luster, A.D., Alon, R., von Andrian, H.U. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*, 6 (12):1182-90.

45. Masters, S.L., Simon, A., Aksentijevich, I., Kastner, D.L. (2009). Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol*, 27:621-68.

46. Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3):159-75.

47. Mayadas, T.N., Cullere, X., Lowell, C.A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 9:181-218.

48. Kumar, V., Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*, 10(11):1325-34.

49. Williams, M.R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P., Luscinskas, F.W. (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol*, 32(10):461-9.
50. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1):16-34.
51. Ridley, A.J. (2011). Life at the Leading Edge. *Cell*, 145, 1012-1022.
52. Tondeleir, D., Vandamme, D., Vandekerckhove, J., Ampe, C., Lambrechts, A. (2009). Actin isoform expression patterns during mammalian development and in pathology: insights from mouse models. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(10):798-815.
53. Holmes, K.C. (2009). Structural biology: Actin in a twist. *Nature*, 457, 389-390.
54. Berridge, M.J. (2012). Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. *Cell Signalling Biology*, Module 11.
55. Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115:453-66.
56. Entschladen, F., Drell, T.L. 4th, Lang, K., Masur, K., Palm, D., Bastian, P., Niggemann, B., Zaenker, K.S. (2005). Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res*, 307(2):418-26.
57. Puralı, N. (2008). Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri. *Palme Yayıncılık*, 1. baskı, Ankara.
58. Lengsfeld, A.M., Löw, I., Wieland, T., Dancker, P., Hasselbach, W. (1974). Interaction of phalloidin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(7):2803-7.
59. Ashley, N.T., Weil, Z.M., Nelson, R.J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43: 385-406.

60. Mansfield, E., Chae, J.J., Komarow, H.D., Brotz, T.M., Frucht, D.M., Aksentijevich, I., Kastner, D.L. (2001). The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* ;98(3):851-9.
61. Ozen, S., Uckan, D., Baskin, E., Besbas, N., Okur, H., Saatci, U., Bakkaloglu, A. (2001). Increased neutrophil apoptosis during attacks of familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol*, 19(5 Suppl 24):S68-71.
62. Oh, H., Siano, B., Diamond, S. (2008). Neutrophil Isolation Protocol. *J Vis Exp*, (17): 745.
63. Ferrante, A., Thong, Y.H. (1980). Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods*. 36(2):109-17.

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -209

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 04.02.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/03
Proje No : GO 15/90 (Değerlendirme Tarihi: 04.02.2015)
Karar No : GO 15/90 – 20

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'nun sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof.Dr. Seza ÖZEN, Doç.Dr. Ömer KARADAĞ, Doç.Dr. Umut KALYONCU, Zülfiye Yeliz Akkaya ULUM, Uzm.Dr. Ezgi Deniz BATU ve Edibe AVCI ile birlikte çalışacakları GO 15/90 kayıt numaralı ve "Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalarında İnflamatuvar Hücre Göçünün İncelenmesi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1.Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)

9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye)

2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye)

10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)

3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)

11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)

İZİNLİ

4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)

12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)

5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye)

İZİNLİ

13 Prof. Dr Leyla Dinç (Üye)

6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)

İZİNLİ

14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye)

İZİNLİ

7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye)

15. Av. Meltem Onurlu (Üye)

8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)