

**SERPINB3 PROTEAZ İNHİBİTÖRÜNÜN MUKUS
ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**THE EFFECT OF SERPINB3 PROTEASE INHIBITOR ON
MUCUS PRODUCTION**

GÖKHAN ARIK

PROF. DR İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Eskimeyen dostum Aristo'ya



ÖZET

SERPINB3 Proteaz İnhibitörünün Mukus Üretimi Üzerine Etkisi

Gökhan Arık

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

NİSAN 2025, 97 Sayfa

Astımın ve kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarının yaygınlığı, özellikle çocuklarda önemli bir sağlık sorunu olarak öne çıkmaktadır. Astım, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyerek, yılda 450.000 ölümle sonuçlanmaktadır. Astımın prevalansı, gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranlarda görülmekle birlikte, çocuklarda daha fazla gözlemlenmektedir. Akciğer epitel hücreleri ve savunma mekanizmaları astım patofizyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır.

Akciğer epitelinin savunma mekanizmaları, özellikle mukosiliyer temizleme, solunum yolunun sağlıklı işleyişi için büyük önem taşır. Mukus üretimindeki bozulmalar, astım ve diğer akciğer hastalıklarının patofizyolojisinde kritik bir rol oynar ve hava yolu obstrüksiyonunu şiddetlendirebilir. Mukus yapısındaki bozukluklar, özellikle MUC5AC'in artışı, astım gibi hastalıkların seyrinde belirleyici olabilmektedir. MUC5AC, mukusun başlıca bileşenlerinden biri olarak, akciğerlerdeki savunma mekanizmalarına hizmet ederken, aşırı üretimi hava yollarında tıkanmaya ve inflamasyona yol açar. Sağlıklı bireylerde MUC5AC ve MUC5B arasındaki denge, mukusun etkili bir şekilde fonksiyon göstermesini sağlar. Ancak astımda, MUC5AC'in artışı mukus yapısının ve fonksiyonunun bozulmasına neden olur, bu da hastalığın şiddetini artırır.

Mukus üretim mekanizmaları, özellikle IL-13 gibi inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenir. IL-13, goblet hücrelerinin çoğalmasını ve MUC5AC üretimini teşvik eder. Astımda bu süreçlerin aşırı aktivasyonu, mukus üretiminin kontrolsüz şekilde artmasına ve mukosiliyer klirensin bozulmasına yol açar. MUC5AC üretimini düzenleyen bu mekanizmaların anlaşılması, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemlidir.

Astım patofizyolojisinde, proteaz ve proteaz inhibitörlerinin çok çeşitli rolleri bulunmaktadır. Astım hastalarında yüksek seviyede ifade olan ve hastalığın şiddeti ile doğru oranda artış gösteren SERPINB3, astım hastalığında dikkat çeken bir proteaz inhibitörüdür. SERPINB3'ün apoptoz önleyici mekanizmaları ile farklı kanser türlerindeki rolleri bilirken astımdaki rolü ve mekanizmaları henüz netlik kazanmamıştır. SERPINB3'ün MUC5AC ifadesi üzerine olan etkisini inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmasına rağmen mukus üretimi ile ilişkili bir mekanizmaya sahip olduğu düşünülmektedir. Tez kapsamında, SERPINB3 ve MUC5AC arasındaki ilişkinin gen düzeyinde transkriptom ve protein düzeyinde western blot ile incelenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda bronş epitel hücre hattı olan Calu-3 hücreleri SERPINB3 ekspresyon vektörü ve SERPINB3 siRNA'sı ile transfekte edilmiştir. Transfekte olan ve normal Calu-3 hücreleri, MUC5AC ifadesini artıran doz ve zamanda IL-13 ile uyarılmıştır. Uyarım sonunda gen seviyesinde inceleme amacıyla hücrelerden RNA izolasyonu ve protein seviyesinde inceleme amacıyla protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. SERPINB3 ifadesinin artırıldığı ekspresyon vektörü ile transfekte edilen hücrelerde MUC5AC gen ifadesinde azalma tespit edilirken, SERPINB3 ifadesinin susturulduğu siRNA ile transfekte edilen hücrelerde de MUC5AC gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Elde edilen protein örnekleri ile gerçekleştirilen deneylerde, IL-13 uyarımına bağlı olarak 12. saatte artan MUC5AC ifadesinin, literatürle uyumlu olarak STAT6 fosforilasyonu ve SPDEF ifadesindeki artış ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Astım, IL-13, MUC5AC, Mukus, SERPINB3,

ABSTRACT

The Effect of SERPINB3 Protease Inhibitor on Mucus Production

Gökhan Arık

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

APRİL 2025, 97 pages

Asthma and chronic inflammatory lung diseases are emerging as significant health issues, especially in children. Asthma affects millions of people worldwide, leading to 450,000 deaths annually. The prevalence of asthma is higher in developed countries, with higher rates observed in boys during childhood and in women during adulthood. Lung epithelial cells and defense mechanisms play a crucial role in the pathophysiology of asthma.

The defense mechanisms of the lung epithelium, particularly mucociliary clearance, are of great importance for the proper functioning of the respiratory system. Disruptions in mucus production play a critical role in the pathophysiology of asthma and other lung diseases, potentially exacerbating airway obstruction. Disorders in mucus composition, especially the increase in MUC5AC, can be decisive in the progression of diseases like asthma. MUC5AC, a key component of mucus, aids in lung defense mechanisms, but its excessive production leads to airway blockage and inflammation. The balance between MUC5AC and MUC5B in healthy individuals ensures that mucus functions effectively. However, in asthma, the increase in MUC5AC disrupts the structure and function of mucus, intensifying the severity of the disease.

Mucus production mechanisms are primarily regulated by inflammatory cytokines such as IL-13. IL-13 promotes the proliferation of goblet cells and the production of MUC5AC. In asthma, the excessive activation of these processes leads to uncontrolled mucus production and the disruption of mucociliary clearance. Understanding the mechanisms regulating MUC5AC production is crucial for developing new therapeutic approaches.

Proteases and protease inhibitors have various roles in asthma pathophysiology. SERPINB3, which is highly expressed in asthma patients and increases at the same rate with the severity of the disease, is a remarkable protease inhibitor in asthma. While the apoptosis inhibitory mechanisms of SERPINB3 and its roles in different types of cancer are known, its role and mechanisms in asthma have not yet been clarified. Although contradictory results have been found in studies examining the effect of SERPINB3 on MUC5AC expression, it is thought to have a mechanism related to mucus production. Within the scope of the thesis, it was aimed to examine the relationship between SERPINB3 and MUC5AC at the gene level, transcriptome and protein level with western blot. In this direction, Calu-3 cells, a bronchial epithelial cell line, were transfected with SERPINB3 expression vector and SERPINB3 siRNA. Transfected and normal Calu-3 cells were stimulated with IL-13 at a dose and time increased MUC5AC expression. At the end of stimulation, RNA isolation was performed from the cells for gene level examination and protein isolation was performed for protein level examination. While a decrease in MUC5AC gene expression was detected in cells transfected with an expression vector in which SERPINB3 expression was increased, a decrease in MUC5AC gene expression was also detected in cells transfected with siRNA in which SERPINB3 expression was silenced. In experiments performed with the obtained protein samples, it was determined that the increased MUC5AC expression at the 12th hour due to IL-13 stimulation was associated with an increase in STAT6 phosphorylation and SPDEF expression, consistent with the literature.

Keywords: Asthma, IL-13, MUC5AC, Mucus Production, SERPINB3

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana birçok projede yer alma fırsatı sağlayarak gelişmeye öncü olan, tez sürecimde bilgi ve deneyimlerinden sıklıkla yararlandığım değerli danışmanım **Prof. Dr. Çağatay Karaaslan**'a

Tez çalışmamın tamamlanmasında maddi destek sağlayan FHD-2024-21369 numaralı proje ile **HÜ Bilimsel Araştırma Birimi**'ne, yüksek lisans sürecimde maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanları Destek Programı Başkanlığı**'na, tezin biyoinformatik süreçlerinde yer alan kaynaklarını kullanmamıza imkan sağlayan **TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi**'ne,

Kendisi burada olmasa da hem tezin hem de projemizin biyoinformatik süreçlerindeki katkılarından dolayı **Doç.Dr. İdil Yet** hocama,

Bana projesinde çalışma imkânı vererek farklı alanda bilgi birikimime katkı sağlayan **Araştırmacı SLAVICA VASELEK** hocama,

Tez yazım sürecinde ve diğer projelerdeki desteklerinden dolayı **Araştırma Görevlisi Dilara Karagüzel**'e, yine tezin yazım sürecinde ve deneysel çalışmalarda bilgisini benden esirgemeyen ve beraber çalışmaktan zevk aldığım hocam **Araştırma Görevlisi Başak Ezgi Saraç**'a

Tüm bu süre boyunca katkısı bulunan ECRG lab üyelerine, stajyerlerimize ve özel çalışma öğrencilerimize,

Yüksek lisansa başladığım andan onlar mezun olana kadar bana her türlü süreçte yardım eden, bildiklerini benimle paylaşan, beraber fikir üretmekten ve çalışmaktan çok mutlu olduğum canım arkadaşlarım, **Araştırma Görevlisi Berfin Doğa Koçkaya** ve **Araştırma Görevlisi Emine Beyza Doğan**'a,

Tez deneylerimde hem bilgisel olarak hem fiziksel olarak yardım etmekten kaçınmayan **Araştırma görevlisi Gülşen Bayrak, Öğretim görevlisi Özgür Özdemirel, Hazal Tahravi ve Dilara Vaizoğlu**'na,

Bu 3 sene boyunca, kendi zamanını benim zamanına göre ayarlayan yol arkadaşlığı yaptığım dostum **Ali Anıl Mızrak**'a,

Yüksek lisans sürecinde tanıştığım, iyi günümde kötü günümde hep yanımda olan, burada bulunduğu sürede tez deneylerimde katkıda bulunan, yanımda olduğu için kendimi şanslı hissettiğim hayat arkadaşım **Göksu Canitez'e**,

Çalışkanlığını ve ahlakını kendime örnek aldığım, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgisini her zaman hissettiren canım babam **Coşkun Arık'a**, Bu hayatta kahrımı belki en çok çeken, samimi ve iyi kalbiyle bana hep umut veren canım annem **Mehtap Arık'a**

Hayatım boyunca en iyi anlaştığım arkadaşım olan, özellikle yüksek lisans sürecimde maddi manevi her desteği gösteren ablam **Buket Saveri** ve eşi Eniştem **Eren Saveri'ye** en içten duygularımda teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akciğer Anatomisi ve Fizyolojisi.....	3
2.1.1 Akciğer Epitelinin Temel Özellikleri ve Görevleri	4
2.2 Akciğer Epitel Hücreleri	5
2.2.1 Bazal Hücreler	5
2.2.2 Kulüp Hücreleri	5
2.2.3 Siliyer Hücreler.....	5
2.2.4 Goblet Hücreleri	6
2.2.5 Alveolar Epitel Hücreleri.....	6
2.3. Akciğer Epitelinin Vücut Savunmasındaki Rolü	7
2.3.1 Fiziksel bariyer Özelliği	8
2.3.2 Mukosiliyer Klirens	9
2.3.3. İmmünolojik Bariyer.....	12
2.4. Astım	14
2.4.1. Astım Tanımı ve Epidemiyolojisi	14
2.4.2. Astım Fenotipleri	15
2.4.3 Astım Endotipleri	16
2.4.3 Astımda Proteazlar ve Proteaz İnhibitörlerinin Rolü	19
2.4.5 Astımda Mukus Üretimi	21
2.4.6. Mukus Üretiminin Moleküler Mekanizmaları.....	22
2.5. SERPINB3 Proteaz İnhibitörü	24
2.5.1. Yapısı ve Biyokimyasal Özellikleri.....	24

2.5.2. Doku Dağılımı ve Hücre İçi Konumu.....	26
2.5.3. SERPINB3 ve Hastalıklarla İlişkisi.....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	32
3.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler.....	32
3.2 Ekspresyon Vektörünün Çoğaltılması Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler.....	35
3.2.1. Kompetan Bakterilerin Elde Edilmesi.....	35
3.2.2. Ekspresyon Vektörü Transformasyonu.....	36
3.2.3. Plazmid İzolasyonu.....	37
3.3 Hücre Kültürü Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler	38
3.3.1 Hücrelerin Kültürlenmesi, Tripsinizasyonu ve Ekimi	38
3.3.2. siRNA ve Ekspresyon Vektörü ile Transfeksiyon.....	38
3.3.3. Hücre Uyarımı	41
3.4. Gen İfadesinin İncelenmesi Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler	41
3.4.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	41
3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	42
3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)	43
3.5 Transkriptom Analizi.....	43
3.5.1 Kalite Kontrolü	44
3.5.2 Okumaların STAR ile Hizalanması	44
3.5.3 FeatureCounts ile Sayım Matrisi Oluşturulması	45
3.5.4 DESeq2 ile Diferansiyel Gen Ekspresyon Analizi	45
3.5.5 Temel Bileşen, Volkan ve Isı Haritası Grafikleri.....	46
3.6. Protein İfadelerinin İncelenmesi Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler	47
3.6.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	51
4.1. SERPINB3 Ekspresyon Vektörünün Çoğaltılması ve İzolasyonu.....	51
4.1.1. Kompetan Bakterilerin Elde Edilmesi.....	51
4.1.2. SERPINB3 Ekspresyon Vektörü ile Transformasyon	51
4.1.3. Bakterilerden Plazmid İzolasyonu.....	53
4.2. Gen İfadesi Değişimlerinin Analizi Kapsamında Elde Edilen Sonuçlar ..	53
4.2.1. SERPINB3 Ekspresyon Vektörünün Etkinliği	53

4.2.2. Transfeksiyon Koşullarının Optimizasyonu	54
4.2.3. IL-13 Doz ve Saat Optimizasyonları.....	57
4.2.4. Transkriptom Analizi için Örneklerin Hazırlanması.....	62
4.3. Transkriptom Analiz Sonuçları.....	63
4.3.1. Okumaların Kalite Kontrolü ve Hizalama Başarısı.....	64
4.3.2. Temel Bileşen Analizi, Volkan ve Isı Haritası Grafikleri.....	64
4.4. Protein İfadesi Değişimlerinin Analizi Kapsamında Elde Edilen Sonuçlar	
74	
4.4.1. MUC5AC İfadesinin Arttığı Uyarım Süresinin Tespit Edilmesi	74
4.4.2. IL-13 İlişkili Yolakların İncelenmesi	76
5. YORUM.....	79
6. KAYNAKLAR.....	82
EKLER	98
EK-1 Okuma Kaliteleri	98
ÖZGEÇMİŞ.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akciğer anatomisi ve epitel hücreleri [27].....	7
Şekil 2.2. Epitel bariyer bütünlüğünü sağlayan sıkı bağlantı proteinleri.....	9
Şekil 2.3. Sağlıklı ve astımlı mukosilyer klirens [29].....	11
Şekil 2.4 İmmünolojik bir bariyer olarak akciğer epiteli [56].....	14
Şekil 2.5. Tip-1 aşırı duyarlılık reaksiyonu	17
Şekil 2.6. MUC5AC üretiminin moleküler mekanizmaları	24
Şekil 2.7. İnsan ve fare SERPINB3/B4 RCL bölgelerindeki farklılıklar	25
Şekil 2.8. SERPINB3'ün dokular arası dağılımı	26
Şekil 2.9. A549 hücre hattında SERPINB3 ekspresyon plazmidi ve siRNA'sı ile elde edilen ön veriler. SERPINB3 ekspresyon plazmidi ile transfekte edilen hücre hattında SERPINB3 ve MUC5AC gen ifadesi değişimleri (A), Artan dozlarda SERPINB3 siRNA'sı ile transfekte edilen hücre hattında SERPINB3 ve MUC5AC gen ifadesi değişimleri	31
Şekil 3. 1. Transkriptom analizinde incelenen koşullar, SERPINB3--: SERPINB3 ifadesi susturulmuş Calu- 3, SERPINB3+: SERPINB3 ifadesi artırılmış Calu-3	44
Şekil 4.1. Transformasyonun kontrolü, ekspresyon vektörü ile transforme edilmiş bakteriler, normal agar (A) ve amfisilin içeren agar (B). Transforme edilmemiş bakteriler, normal agar (C) ve amfisilinli agar (C)	52
Şekil 4.2. İzole edilen plazmidlerin etkinlik kontrolü **** p<0,0001	54
Şekil 4.3. SERPINB3 siRNA ve ekspresyon vektörü transfeksiyonu sonucunda SERPINB3 ifadesi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.....	55
Şekil 4.4. Transfeksiyon 2 seçilen koşullarda MUC5AC gen İfadesi koşullar arası anlamlılık düzeyi, One- way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * p<0,05, ** p<0,01	56
Şekil 4.5. Kronik IL-13 uyarım modeli.....	58
Şekil 4.6. Serumsuz Besiyeri Modeli MUC5AC gen ifadesi, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. *** p<0,001	59
Şekil 4.7. 24 Saatlik Uyarım Sonrası MUC5AC gen ifadesi, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * p<0,05	60
Şekil 4.8. Farklı uyarım saatlerinde MUC5AC gen ifadesi, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * p<0,05, *** p<0,001	61
Şekil 4.9. Transkriptoma gönderilen örneklerle ait MUC5AC ve SERPINB3 gen ifadesi değişimleri, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001	62
Şekil 4. 11. Koşullar arası temel bileşen analizi grafikleri.....	65

Şekil 4. 12. Uyarılmamış ve SERPINB3 ekspresyon vektörü RNA-seq analizi volkan grafiği.....	66
Şekil 4. 13. Uyarılmamış ve SERPINB3 siRNA RNA-seq analizi volkan grafiği	66
Şekil 4. 14 Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı RNA-seq analizi volkan grafiği	67
Şekil 4. 15. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı + SERPINB3 ekspresyon vektörü RNA-seq analizi volkan grafiği	67
Şekil 4. 16. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı + SERPINB3 siRNA RNA-seq analizi volkan grafiği	67
Şekil 4. 17. Uyarılmamış ve SERPINB3 ekspresyon vektörü ısı haritası	69
Şekil 4. 18. Uyarılmamış ve SERPINB3 siRNA ısı haritası.....	70
Şekil 4. 19. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı ısı haritası	71
Şekil 4. 20. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı + SERPINB3 ekspresyon vektörü ısı haritası	72
Şekil 4. 21. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı + SERPINB3 siRNA RNA-seq analizi volkan grafiği	73
Şekil 4.22. MUC5AC protein ifadesi optimizasyonu membran görüntüleri.....	74
Şekil 4. 23. MUC5AC protein ifadesi optimizasyonu western blot protein ifadesi değişimleri, Koşullar arası STAT6 protein ifadesi değişimi (A), p-STAT6 miktarı değişimi (B), SPDEF ifade değişimi (C) ve MUC5AC ifade değişimi (D).	75
Şekil 4. 24. IL-13 ilişkili proteinlerin incelenmesine dair bant görüntüleri. A) 6 saatlik IL-13 uyarımına ait, b) 12 saatlik IL-13 uyarımına ait	76
Şekil 4. 25. IL-13 ile 6 ve 12 saat uyarım sonrası tüm koşullara ait SERPINB3 ifadesi değişimi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$	77
Şekil 4. 26. IL-13 ile 6 ve 12 saat uyarım sonrası tüm koşullara ait MUC5AC ifadesi değişimi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür.....	77
Şekil 4. 27. IL-13 ile 6 ve 12 saat uyarım sonrası tüm koşullara ait STAT6 ifadesi ve p-STAT6 değişimi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * $p<0.1$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Bakteri kültür ve transformasyon deneylerinde kullanılan malzemeler.....	32
Çizelge 3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler	32
Çizelge 3.3. Hücre ve bakteri deneylerinde kullanılan plastik malzemeler.....	33
Çizelge 3.4. RNA deneylerinde kullanılan malzemeler	33
Çizelge 3.5. Protein deneylerinde kullanılan malzemeler	34
Çizelge 3.6. Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar	34
Çizelge 4.1. Zamana bağlı değişen E. coli OD600 değerleri.....	51
Çizelge 4. 2. İzolasyon sonrası elde edilen plazmid konsantrasyonları	53
Çizelge 4. 3 Transkriptom analizine gönderilen örneklerin RNA konsantrasyonları	63
Çizelge 4. 4. Okuma Kaliteleri ve Hizalama Başarısı.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	alfa
β	beta

Kısaltmalar

AAT	α -1 Antitripsin
AD	Atopik Dermatit
AMP	Anti Mikrobiyal Peptitler
AP-1	Aktivatör Protein 1
ASL	Hava Yolu Yüzey Sıvısı
CFTR	Kistik Fibrozis Transmembran İletkenlik Regülatörü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	Mitojen-ile-Aktive Olan Kinaz-1
GINA	Global Initiative for Asthma
GMNC	Geminin-Sarmak İçeren Protein-1
HDM	Ev tozu akarı
HIF	Hipoksi-ile-İndüklenen Faktör
IL	İnterlökin
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KF	Kistik Fibrozis
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LL-37	Kathelidisin Antimikrobiyal Peptit

LMP	Lizozomal Membran Geçirgenliği
15-LO-1	15-Lipoksijenaz-1
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen-ile-Aktive Olan Kinaz
MHC-1	Majör Histokompatibilite Kompleksi 1
MMP	Matriks Metalloproteaz
NE	Nötrofil Elastaz
PAI -1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör -1
PCD	Perisiliyer Disknezi
PRR	Kalıp Tanıma Reseptörleri
RCL	Reaktif merkez döngüsü
RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SCC	Skvamöz Hücreli Karsinom
SERPIN	Serin Proteaz İnhibitörleri
SLPI	Sekretuar Lökosit Proteaz İnhibitör
SPDEF	SAM-pointed Bölge İçeren ETS-benzeri Transkripsiyon Faktörü
TACE	TNF- α Dönüştürücü Enzim
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TIMP	Matriks Metalloproteaz Doku İnhibitörleri
TLR	Toll-Benzeri Reseptörler
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TSLP	Timik Stromal Lipopoietin
UV	Ultraviyole
ZO	Zonula Ocludens

1. GİRİŞ

Solunum sistemi, vücuttaki gaz alışverişinden sorumlu olup, akciğerler aracılığıyla oksijen alımını ve karbondioksit atılımını gerçekleştirerek kandaki oksijen ve karbondioksit seviyesini düzenler. Bu gaz alışverişi, havanın akciğerlerde en son ulaştığı nokta olan alveolar bölgede, epitel hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Solunum yollarının iç yüzeyini kaplayan epitel hücreler, sadece gaz değişimini sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda solunan hava ile maruz kalınan yabancı partikül, patojen, toksin ve alerjenlere karşı fiziksel ve immünolojik bir bariyer oluşturmaktadırlar. Epitel hücreleri bariyer özelliklerinin yanı sıra mukosiliyer klirens adı verilen, siliyer hareket ve mukus salgılanması ile maruz kalınan etkenlerin vücut dışına taşındığı dinamik bir savunma mekanizmasının da başlıca aktörleridir. Özellikle alt solunum yollarında bulunan epitel hücreleri, mukoza salgısı ve immün yanıt üretim mekanizmaları ile akciğerlerin homeostazını korumakta hayati rol oynar. Ancak, kronik akciğer hastalıklarında bu savunma mekanizmalarının aksaması hem hastalığın ilerlemesine hem de solunum yollarının yapısal bütünlüğünün bozulmasına yol açar.

Kronik inflamatuvar akciğer hastalıkları, dünyada yaygınlığı giderek artan ve tedavisi zor olan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. 2017 yılında yapılan bir araştırmaya göre dünyada kronik inflamatuvar akciğer hastalığına sahip insanların sayısı son 30 senede %40 artarak 545 milyona ulaşmıştır. Bu hastalıklar içerisinde KOAH toplam nüfusun %3,9'unu ve astım ise toplam nüfusun %3,6'sını etkileyerek en yaygın kronik inflamatuvar akciğer hastalıkları olarak bilinmektedirler. Hava yolu mukusu, çevreden solunan yabancı maddeleri ve mikroorganizmaları hapsedip mukosiliyer klirens yoluyla uzaklaştırılmasını kolaylaştıran, savunma amaçlı fiziksel bir bariyer oluşturan viskoelastik jeldir. Ancak inflamasyon, enfeksiyon veya epitel hasarı gibi patolojik durumlar da epitel hücreleri tarafından salgılanan mukus miktarı artmaktadır. Artan mukus, hava yollarında tıkanıklığa sebep olmakta, enfeksiyon riskini artırmakta ve hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır. Astım, KOAH ve kistik fibroz gibi hastalıklar, solunum yollarında çoğu zaman mukus üretiminin artması ve mukus bileşenlerinin patolojik olarak değişmesiyle karakterize edilmektedir.

Mukusun yapısını başlıca tuz, su ve musin proteinleri oluşturmaktadır. Musin proteinleri glikoprotein yapıları sayesinde solunan partiküllerin yakalanmasını sağlarken, su ve tuzlar, musin proteinlerinin elastik yapısını koruyabilmesi için gerekli olan hidrasyon ortamını sağlamaktadırlar. Ancak mukusun işlevini yerine getiren temel bileşenleri musin proteinleridir. Mukus üretimine bağlı düzensizlikler, özellikle MUC5AC ve MUC5B gibi musin proteinlerinin miktarlarındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. MUC5AC, patolojik şartlarda aşırı üretilmekte ve mukusun yapısının bozulmasına yol açmaktadır. Bu durum, solunum yollarında inflamasyonu artırmakta ve epitel bariyer bütünlüğünü zayıflatmaktadır. Alerjik astım gibi tip-2 inflamasyonun öne çıktığı hastalıklarda, IL-13 gibi sitokinlerin MUC5AC ifadesini arttırdığı bilinmektedir. Bu mekanizma hem mukus üretimini hem de epitel hücrelerinin mukus üreten fenotipe doğru farklılaşmasını tetiklemektedir. Ancak, MUC5AC ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan moleküler mekanizmaların tam anlamıyla aydınlatılamamış olması, bu alanda daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir.

Son yıllarda, SERPINB3 proteaz inhibitörünün MUC5AC üzerine olan etkileri ilgi çekmiştir. SERPINB3, kanser ve kronik inflamatuvar hastalıklarda ifadesi artan bir protein olarak dikkat çekmektedir. İnsanlarda ve fare modellerinde yapılan çalışmalarda, SERPINB3'ün MUC5AC ifadesi üzerine etkileri incelenmiş, ancak birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. İnsan epitel hücre hattında yapılan bir çalışma, SERPINB3'ün MUC5AC ifadesini baskıladığını öne sürerken, fare modelleri üzerinde yapılan başka bir çalışma, bu proteinin MUC5AC ifadesini arttırdığını göstermiştir. Bu çelişkili bulgular, SERPINB3'ün MUC5AC ifadesini düzenleyen mekanizmaların daha detaylı bir şekilde incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, bronş epitel hücrelerinde SERPINB3 ifadesi ekspresyon plazmidi ile artırılıp ve siRNA ile baskılanarak, SERPINB3 ve MUC5AC ilişkisinin bronş epitel hücre hattında incelenmesi amaçlanmıştır. SERPINB3 ifadesinin arttırıldığı ve baskılandığı koşullarda, MUC5AC ifadesini indüklediği bilinen IL-13 aracılı yollar gen ve protein seviyesinde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Anatomisi ve Fizyolojisi

Solunum yolu, havanın burundan başlayarak sırasıyla farinks, larinks ve trake yoluyla akciğerlere ulaşmasını sağlamaktadır [1]. Akciğerler; trake, bronş, bronşiyoller ve uç alveolar bölgelerden oluşan, fraktal yapıda dinamik bir hava yolu ağıdır. Bu ağ, kardiyovasküler sistemle koordineli bir şekilde çalışarak solunan havadaki oksijenin kana geçişini ve oksijence zengin kanın dolaşıma katılmasını sağlamaktadır [2].

Solunum yolunun burun, farinks ve larinksi içeren bölgesi “üst solunum yolu”, trake, bronş, bronşiyoller ile alveolar bölgeleri içeren bölgesi ise “alt solunum yolu” olarak adlandırılmaktadır. Solunan hava, üst solunum yolundan geçerek alt solunum yoluna ulaşır ve burada iki ayrı akciğere doğru yönlendirilir. Trakeden başlayan alt solunum yolu, bronşlar aracılığıyla sağ ve sol akciğere daha küçük dallara ayrılarak ilerlemektedir. Alt solunum yolu, solunum sistemindeki görevlerini betimleyecek şekilde “yönlendirici bölge” ve “solunum bölgesi” olmak üzere iki bölge olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.1-A). Yönlendiren bölge, solunan havanın taşınmasından sorumluyken, solunum bölgesi gaz alışverişinin gerçekleştiği alveolar bölgeleri içermektedir [3]. Alt solunum yolunda, alveolar bölgeye doğru ilerledikçe bronşlar giderek daha küçük bronşçuklara, bronşiyollere ayrılır ve bu dallanma, terminal bronşiyollerin sonunda alveol keseleriyle sonlanır. Bu fraktal yapıllı dallanma sistemi, solunum yüzey alanını maksimize ederek oksijenin kana geçişini ve karbondioksitin atılımını sağlamak amacıyla özelleşmiştir. Hem üst hem de alt solunum yollarında, havanın dolaştığı boşluklar hava yolu lümeni olarak adlandırılmaktadır. Hava yolu lümeni, solunum gerçekleşmesi için en az solunum sisteminin morfolojisi kadar önemli olan epitel hücreleri ile kaplıdır. Yetişkin bir insan, günde ortalama 10.000 litre hava solumakta ve bu süreç boyunca hava yolu epiteli, saat başına yaklaşık 25 milyon partikül ile karşılaşmaktadır [4]. Bu yoğun maruziyete rağmen solunum sisteminin fizyolojik olarak işlevini sürdürebilmesi, hava yolu lümenini kaplayan yüksek plastisite ve güçlü yenilenme mekanizmalarına sahip epitel hücrelerine bağlıdır.

2.1.1 Akciğer Epitelinin Temel Özellikleri ve Görevleri

Alt solunum yolu, başlıca yalancı çok katlı bazal, siliyer, goblet ve kulüp hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerin bazal ve apikal bölgeleri farklı fonksiyonlar için özelleştiklerinden dolayı, hücre içi organel dağılımları da hücre amacına uygun olarak düzenlenmiştir. Hücreler bazal kısımlarından bazal laminaya bağlanarak, hücre-hücre/hücre-doku haberleşmesinin sağlandığı hücre dışı matriks ile doğrudan etkileşim halindedir. Apikal kısımları ise hava yolu lümenine bakması sebebiyle, solunan hava ile doğrudan temas halindedir. Dolayısıyla bu hücrelerin, solunum sırasında karşılaşılan patojen, alerjen vb. faktörlere karşı geliştirecekleri cevap hücrelerin bazal kısımlarında üretilip, apikal kısımlarına doğru aktarılmaktadır [5].

Akciğer epitel hücreleri, solunan hava ile partiküller, toksik gazlar, alerjenler, virüs, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalara sürekli olarak maruz kalmaktadır. Hava yolu lümenini kaplayan akciğer epitel hücreleri, solunan hava ile doğrudan temas eden yaklaşık 100 m²'lik bir alana karşılık gelmektedir [6]. Günlük olarak solunan havanın miktarı ve karşılaşılan patojenlerin sayısı göz önünde bulundurulduğunda, solunum homeostazının devam ettirilmesi akciğer epitel hücrelerinin vücut savunmasında etkin ve başarılı olmasına bağlıdır [7].

Epitel hücrelerinin tipi ve yoğunlukları, solunum yolunda bulundukları bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Alt solunum yolunun yönlendirici bölgesinde siliyer epitel ve goblet hücreleri yoğun olarak bulunurken (Şekil 2.1-B), solunum bölgesinde kulüp ve alveol hücreleri yoğun olarak bulunmaktadır (Şekil 2.1-C). Son yıllarda tek hücre RNA dizileme teknolojisi sayesinde, akciğer epitelinde çok sayıda yeni hücre tipi ve bu hücrelerin üstlendiği görevleri keşfedilmiştir [8-11]. Yeni keşfedilen hücreler arasında; mukus salgılama yeteneğine ve sil yapısına sahip epitel hücreleri olan siliyer mukus hücreleri, var olan siliyer epitel hücrelerinden daha yoğun bir şekilde sil bulundurabilen çoklu siliyer hücreler gibi tipler arası geçiş hücreleri veya mikrofoid hücreler ve Hillock hücreleri gibi daha önce tanımlanmayan hücreler bulunmaktadır [12, 13]. Ayrıca pulmoner iyonosit veya pulmoner nöroendokrin hücreleri gibi hücrelerin fonksiyonları da bu çalışmalar ile netlik kazanmıştır [11]. Bu bulgular, akciğer epitelinin bölgesel ve fonksiyonel heterojenitesini daha iyi anlamamıza olanak sağlamıştır. Ancak akciğer

savunma mekanizmalarına katkıda bulunan başlıca hücre tipleri veya fonksiyonlarına dair anlayışımızda bir değişiklik yaratmamıştır.

2.2 Akciğer Epitel Hücreleri

2.2.1 Bazal Hücreler

Bazal hücreler; kübik şekilli, sitokeratin-5, sitokeratin-14 ve dönüşüm-ilişkili protein 63 (Trp-63) proteinlerinin ifadesi ile tanımlanan, bazal membrana yapışık hücrelerdir. Bu hücreler, üst ve alt solunum yolu boyunca değişkenlik gösterecek şekilde tüm akciğer hücrelerinin % 6-31 oluşturmaktadırlar [14, 15]. Bazal hücreler, hasara bağlı olarak epitel hücre yenilenmesinde ve solunumun homeostazında hayati rollere sahiptirler. Hasar görmesi durumunda, kendi kendini yenileyebilir veya goblet, kulüp, tuft, siliyer ve pulmoner iyonosit hücreleri gibi önemli hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler [16-19].

2.2.2 Kulüp Hücreleri

Kulüp hücreleri, dönüştürücü büyüme faktörü- β reseptör Alk5 (activin-receptor like kinase 5) ifadesinin artması ile bazal hücrelerden farklılaşırlar [20]. Bazal hücreler gibi, hücre hasarı veya kaybı gibi durumlarda goblet veya siliyer hücrelere hatta bazal hücrelere farklılaşabilmektedirler [21]. Bazal hücrelerin aksine solunum yolunda bronşiyoller gibi küçük hava yollarında, kulüp hücrelerinin sayısı önemli bir şekilde artmaktadır [22]. Farklılaşma özelliklerinin yanı sıra goblet hücreleri gibi salgılama işlevleri de bulunmaktadır. Kulüp hücrelerinden salgılanan uterogloblin, hava yollarının yüzeyini kaplayan sıvı tabakasında en bol bulunan proteindir [23].

2.2.3 Siliyer Hücreler

Siliyer hücreler, alt solunum yolunun tamamında bulunan silindirik epitel hücreleridir. Bu hücreler; bazal veya kulüp hücrelerinde başlıca Notch sinyal yolağının baskılanması ve MYB proto-onkogen aktivasyonu, geminin sarmal içeren protein 1 (GMNC) ve forkhead kutu protein J1 (Foxj1) sinyal yolaklarının aktifleşmesi sonucunda farklılaşırlar [24, 25]. Bu sinyal yolakları, hücrelerin karakteristik özelliği olan sil yapısının

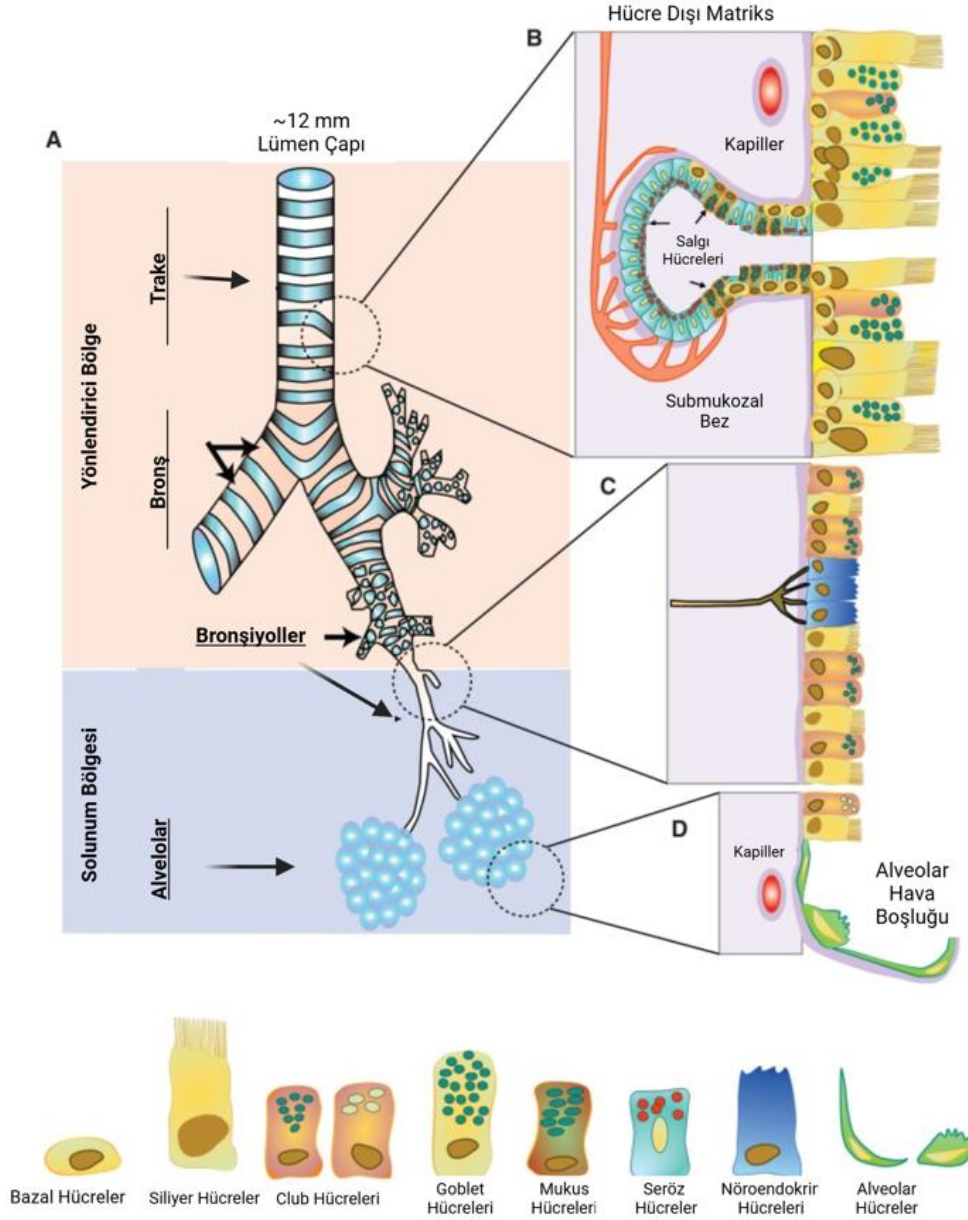
oluşmasında görev almaktadırlar. Siliyer hücrelerin apikal bölgeleri, ritmik hareket yapma kabiliyetine sahip kıl benzeri siller ile kaplıdır. Sillerin ritmik hareketi sayesinde, solunan veya hava yolu mukusu tarafından yakalanan mikroorganizma, patojen, partikül veya alerjenler sürekli olarak alt solunum yolundan üst solunum yoluna doğru uzaklaştırılır. Siliyer hücreler hem solunum yolunun tamamında bulunması hem de sillerin sürekli hareketi dolayısıyla, akciğer epitel bariyeri ve mukosiliyer klirens mekanizmaları gibi çok önemli savunma mekanizmalarında merkezi rol alırlar [26].

2.2.4 Goblet Hücreleri

Goblet hücreleri, solunum yolunda mukus üreten başlıca hücrelerdir. Bu hücreler, siliyer epitel hücreleri gibi bazal veya kulüp hücrelerinden farklılaşırlar. Goblet hücre farklılaşması, SAM-pointed bölge içeren ETS-benzeri transkripsiyon faktörü (SPDEF) ve forkhead kutu A3 (Foxa3) olmak üzere iki temel transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir [26]. Goblet hücreleri, bileşiminde elektrolit, metabolit, antimikrobiyal ürünler, su ve musin proteinlerini içeren mukus adı verilen bir salgı üretirler. Mukus, solunum ile gelen yabancı partiküllerin yakalanmasını sağlayarak akciğerleri temiz tutmada önemli bir rol oynar. Aynı zamanda, epitel bariyerin korunmasını destekleyerek solunum yollarını enfeksiyon ve zararlı etkenlere karşı korur. Bu mekanizmalar, akciğer savunmasının sürdürülebilirliği açısından hayati öneme sahiptir [27].

2.2.5 Alveolar Epitel Hücreleri

Alveolar epitel hücreleri, akciğerlerin gaz değişiminden sorumlu alveolar bölgelerinde bulunur ve Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki ana alt tipi içermektedirler. Tip 1 hücreleri, ince yapılarıyla gaz alışverişini optimize eden geniş yüzeyler oluşturmakla beraber alveolar bölgelerin ~%95'ini kaplamaktadırlar. Tip 2 hücreleri ise sürfaktan üretimiyle alveollerin çökmesini önler ve gerektiğinde Tip 1 hücrelerine farklılaşarak alveolar bariyerin bütünlüğünü korumaktadırlar. Bu hücreler, akciğer savunmasında, sürfaktan üretimi ve lokal immün yanıtların düzenlenmesi gibi hayati görevler üstlenmektedirler [28].



Şekil 2.1. Akciğer anatomisi ve epitel hücreleri [27]

2.3. Akciğer Epitelinin Vücut Savunmasındaki Rolü

Akciğer epitel hücreleri büyük bir alana yayılmış olduklarından ve hava yollarının farklı bölgelerinde farklı hücre tiplerinin birlikteliğinden oluştuklarından dolayı, bir topluluk olarak farklı ve etkili savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmalarından en iyi bilineni, akciğer epitelyal bariyer olarak bilinen; hücrelerin, aralarındaki bağlantılar aracılığıyla tüm lümen boyunca solunan faktörlere karşı oluşturduğu fiziksel bir bariyer olma özelliğidir. Ayrıca solunan faktörlere karşı

başıklık hücreleriyle birlikte doğal ve kazanılmış başlık yanıtlarının oluşturulduğu immünolojik bir bariyer olarak da akciğer savunmasında çok önemli bir yere sahiptir [29]. Ancak akciğer epitel hücrelerinin sahip olduğu en önemli savunma mekanizması; amacı solunan veya etkisiz hale getirilen patojen, partikül veya alerjenleri akciğerlerden uzaklaştırmak olan mukosiliyer klirens mekanizmasıdır [27]. Bu 3 mekanizmanın başarısı, her bir savunma sisteminin sorunsuz şekilde çalışmasına bağlıdır. Ancak bu savunma mekanizmalarının da yetersiz kaldığı durumlarda veya savunma mekanizmalarını bozabilecek sistemik, genetik bozuklukların olduğu durumlarda akciğer hastalıkları gelişebilmektedir [27].

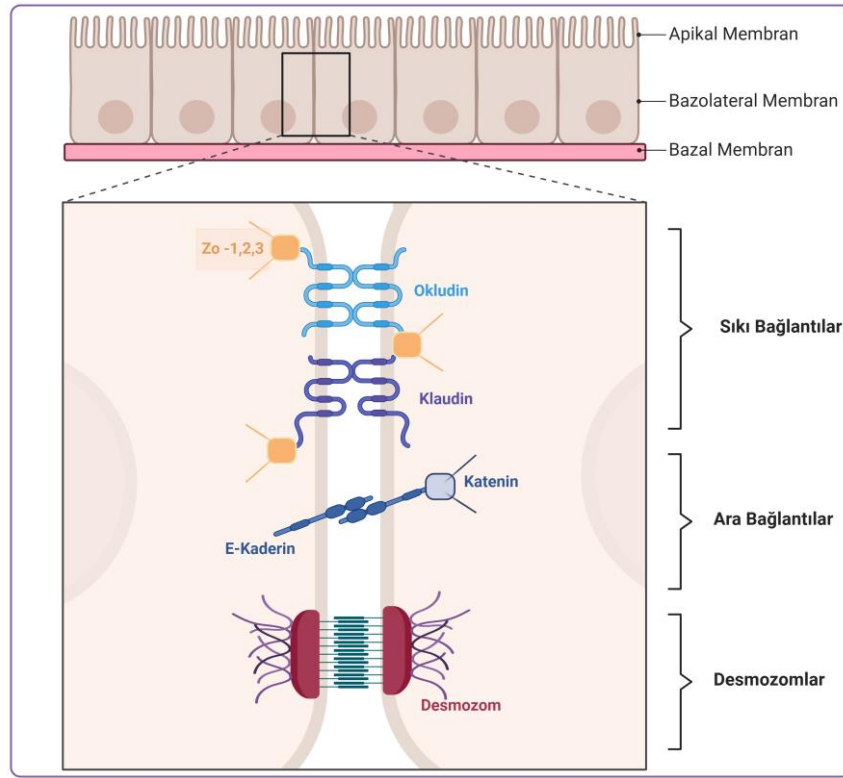
2.3.1. Fiziksel Bariyer Özelliği

Hava yollarında aralıksız bir epitel örtü bariyerinin korunması, büyük oranda epitel hücreler arasında bulunan bağlantılar ile gerçekleştirilmektedir. Temel amacı vücudu dış ortamdan korumak olan epitel hücre örtüsü arasında sıkı bağlantılar, ara bağlantılar ve desmozomlar olarak bilinen proteinler ile bariyer yapısı sağlanmaktadır [30]. Bu bağlantılar hücrelerin birbirlerine sıkı bir şekilde yapışmasını sağlamanın yanı sıra, hücreler arası iletişim için de oldukça önemlidir.

Sıkı bağlantılar; hücrelerin apiko-lateral kısımlardan hücreleri birbiri ile bağlayarak, hücreler arası madde alışverişine izin veren protein kompleksleridir. Sıkı bağlantı proteinleri hem birbirlerine hem de hücre iskeletine bağlanarak iki hücre arası bağlantıyı güçlendiren bir kompleks oluştururlar. Klaudinler (klaudin-1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 18), okludinler ve zonula okludens (ZO) proteinleri (ZO-1,2,3) bu kompleksi oluşturan başlıca sıkı bağlantı proteinleridir [31-33].

Ara bağlantılar; lateral kısımdan hücreleri birbirlerine bağlamaktadır. Bu bağlantılar genellikle bir epitel hücre belirteci olan E-Kaderin molekülünün iki epitel hücreyi birbirine bağlaması ile gerçekleşir. E-Kaderin, sitoplazmik plak proteinleri olan β -katenin ve α -katenin aracılığıyla hücre iskeletine bağlanmaktadır [34].

Bu bağlantılar normal şartlarda stabil durumdadır ancak enfeksiyon veya inflamasyon durumunda bu bağlantılar bozulabilmekte ve bariyer bütünlüğü olumsuz etkilenmektedir. Bariyer bütünlüğünü bozan faktörler arasında, dış ortam kaynaklı ev tozu akarı (HDM) gibi alerjenler veya lipopolisakkarit (LPS) gibi patojen kaynaklı moleküllerin olduğu bilinmektedir [35, 36].



Şekil 2.2. Epitel bariyer bütünlüğünü sağlayan sıkı bağlantı proteinleri

2.3.2. Mukosiliyer Klirens

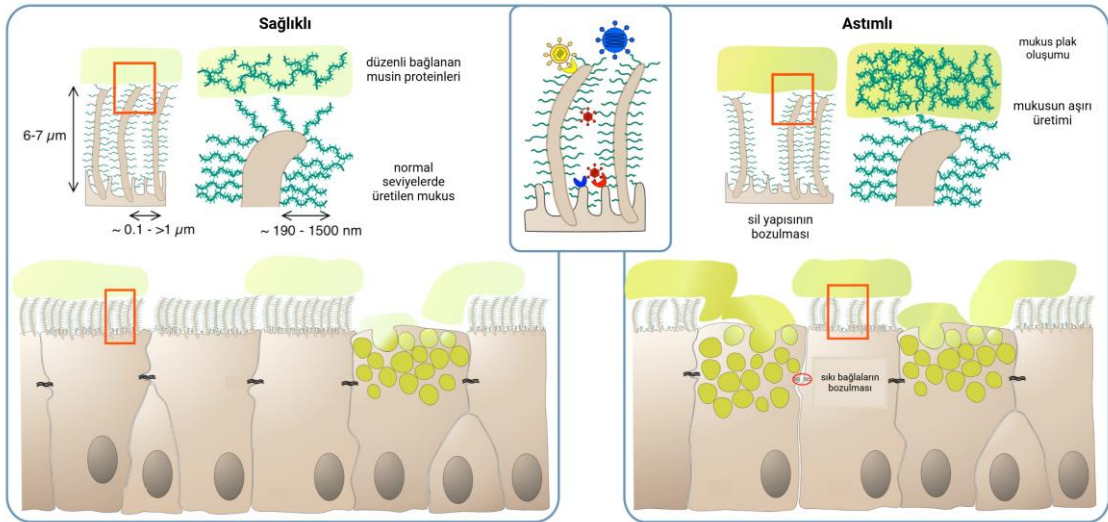
Akciğerler solunan havadaki patojenlere, partiküllere ve toksik kimyasallara sürekli maruz kalmasına rağmen çevresel hasara karşı oldukça dirençlidir. Bu direnç mukosiliyer klirens olarak bilinen, protein ve su bileşiminden oluşan jel formundaki mukus tabakasının trakeye doğru, siliyer hücreler tarafından hareket ettirildiği çok güçlü bir savunma mekanizmasına bağlıdır. Sağlıklı kişilerde, mukus tabakası uç havayollarından trakeye doğru, saniyede yaklaşık 50 μm hızında taşınmaktadır [37]. Mukosiliyer klirens mekanizması başlıca siliyer epitel ve goblet hücrelerinin iş birliği ile sürdürülmektedir. Siliyer epitel hücreleri aracılı siller, hava yolu yüzey sıvısı (ASL) adı verilen ince bir katman içerisinde hareket etmektedir. Bu katman sillerin rahat hareket edebileceği düşük viskoziteye sahip perisiliyer tabaka ve solunan faktörleri yakalayıp etkisiz hale getirebilen mukus tabakadan oluşmaktadır [27].

Perisiliyer jel katman, membran-bağlı musin proteinleri (MUC1, MUC4, MUC16) ve glikolipidler gibi molekülleri içeren ortalama 7 μm genişliğinde bir katmandır [38]. Düşük viskozitesi sayesinde sillerin hareketine olanak sağlamasının yanı sıra epitel

hücreler tarafından düzenlenen hidrasyonu ile mukus tabakasını taşıma özelliğine de sahiptir.

Hava yolu mukus tabakası ise solunan faktörleri yakalayarak, siliyer hareket ve öksürük yoluyla akciğerlerden dışarı taşınmasını sağlamaktadır. Hava yolu mukusu, yaklaşık ~%97 su, ~%1 tuz, ~%1 musin proteinleri ve ~%1 diğer proteinlerden oluşan bir hidrojel olarak tanımlanmaktadır [39, 40]. Perisiliyer tabakada olduğu gibi mukus tabakanın hidrasyonu epitel hücreler tarafından düzenlenmektedir. Hidrasyon başlıca, Cl^- taşınmasını kontrol eden kistik fibrozis transmembran iletkenlik regülatörü (CFTR) ve Ca^{2+} ile aktive olan klorid kanalı (CaCC) ile Na^+ geçişine izin veren epitelyal Na^+ kanalı (ENaC) tarafından kontrol edilmektedir [41]. Sağlıklı bir mukus katmanı yaklaşık 2-5 μm genişliğe sahip, düşük viskoziteli bir yapıya sahiptir. Solunum ile karşılaşılan potansiyel olarak zararlı etkenlerin ilk karşılaştığı mukus tabakasının bileşimi patolojik durumların ortaya çıkmasında, gelişmesinde veya ilerlemesinde doğrudan ilişkilidir.

Mukusun viskozitesi ve etkinliği, yapısını oluşturan kimyasal bileşenlerinin miktarları tarafından belirlenirken, mukus yapısında en belirleyici olan bileşenler musin proteinleridir. Musin proteinleri genellikle membran bağlı ve salgılanan musin proteinleri olarak sınıflandırılan ve 20'den fazla gen tarafından kodlanan bir protein ailesinden oluşmaktadır. Mukus yapısında bulunan majör musinler MUC5B ve MUC5AC olarak kabul edilirken bunlardan MUC5B, bağışıklık savunmasında önemli role sahiptir ve epitel tarafından sürekli olarak salgılanmaktadır. MUC5AC'nin ise patolojik durumda üretimi ve salgılanması artmaktadır. Fizyolojik koşullarda musin proteinleri hücre-hücre adezyonu, bağışıklık cevabı, inflamasyon ve hücre çoğalması gibi süreçlerde rol oynamaktadır [42]. Ancak kistik fibrozis (KF), astım, KOAH gibi düzensiz mukus üretiminin görüldüğü hastalıkların ölüme neden olduğu vakalarda, musin proteinlerinin üretilmesi ve salgılanmasındaki aşırı artışın ölüm sebebi ile doğru orantılı olduğu görülmektedir [43, 44]. Ayrıca astım, KOAH ve kistik fibrozis gibi muko-obstrüktif hastalıklarda, inflamatuvar uyaranlara yanıt olarak artan MUC5AC üretiminin mukus salgılayan hücrelerde genişlemeye yol açtığı ve havayolunda kapsamlı yapısal değişiklikleri tetiklediği bilinmektedir [45] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Sağlıklı ve astımlı mukosiliyer klirens [29]

Sağlıklı bireylerin hem proksimal hem de distal havayollarında MUC5AC ve MUC5B, farklı hücreler tarafından veya aynı hücre içindeki farklı granüllerde üretilmekte ve lümene salgılandıktan sonra fiziksel olarak birleşmeden kalmaktadır [46, 47]. MUC5AC ve MUC5B'nin mukus içerisindeki oranı mukus yapısını ve fonksiyonunu doğrudan etkilemektedir. Mukus üretiminde görevli, özellikle MUC5AC salgılayan hücreler, goblet hücreleri olarak tanımlanmaktadır. Patojenle karşılaşılan bölgelerde, doğal bağışıklık mekanizmasının bir işlevi olarak, goblet hücreleri sayıca çoğalabilmektedir. Bu çoğalma, mevcut hücrelerin fenotipik olarak goblet hücre morfolojisine farklılaşması (goblet hücre metaplazisi) veya bazal hücrelerin seçici olarak goblet hücrelerine farklılaşması (goblet hücre hiperplazisi) ile mümkün olmaktadır [48]. Metaplazi aynı zamanda mevcut mukus üreten hücrelerin hacim olarak büyümesi ve granül depolarını arttırması olarak da gözlenebilmektedir ve bu durum doğrudan musin proteinlerinin üretimi ve depolanması ile ilişkilidir [49].

Fizyolojik koşullarda orantısız olarak goblet hücrelerinin çoğalması veya hacim olarak büyümesi, akciğer hücrelerinin kök hücreleri olarak bilinen bazal hücrelerin etkinliği ve goblet hücre metaplazisinin çözülmesi olarak bilinen süreç aracılığıyla dengelenir. Goblet hücre metaplazisinin çözülmesi olarak bilinen süreç özünde, dış uyaranlara bağlı olarak goblet fenotipine farklılaşan hücrelerin, dış uyaranların olmadığı durumlarda tekrar eski fenotipine döndüğü hücresel homeostaz mekanizmasını ifade etmektedir. Çözülme evresinde goblet hücreleri, içerisindeki granülleri salgılamakta veya otofaji ile

parçalamaktadır ve böylece hücre küçülmektedir. Bu özelliğiyle otofaji, son yıllarda akciğer hastalıklarında hem ortak bir patoloji hem de terapötik hedef olarak oldukça dikkat çekmektedir [50].

2.3.3. İmmünolojik Bariyer

Akciğer epitelinin fiziksel bir bariyer ve mukosiliyer klirens mekanizmalarına ek olarak sahip olduğu diğer bir savunma mekanizması ise solunan patojenlere karşı immünolojik bariyer olma özelliğidir. Akciğer epitel hücreleri ve epitel altı bağışıklık hücreleri tarafından oluşturulan bu savunma, karşılaşılan virüs, bakteri, mantar veya alerjenlerin reseptör aracılı algılanması ile başlamaktadır. Bu patojenleri tanıyan reseptör aileleri; toll-benzeri reseptörler (TLRs), RIG-I-benzeri reseptörler (RLRs), Nod-benzeri reseptörler (NLRs), C-tip lektin reseptörler (CLRs) ve proteaz ile aktive olan reseptörler (PARs) olarak bilinmekle birlikte hepsi patern tanıma reseptörleri (PRRs) olarak adlandırılmaktadır. PRR'ler, ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan tehlike-ilişkili moleküler paternleri (DAMPs) veya patojenler tarafından paylaşılan korunmuş yapıları tanıyan patojen-ilişkili moleküler paternleri (PAMPs) algılayabilmektedirler. Bu moleküllerin varlığında, hava yolu epitel hücreleri ve epitel-altı dokuda bulunan bağışıklık hücreleri arasında uygun bağışıklık yanıtı geliştirilmektedir [51, 52].

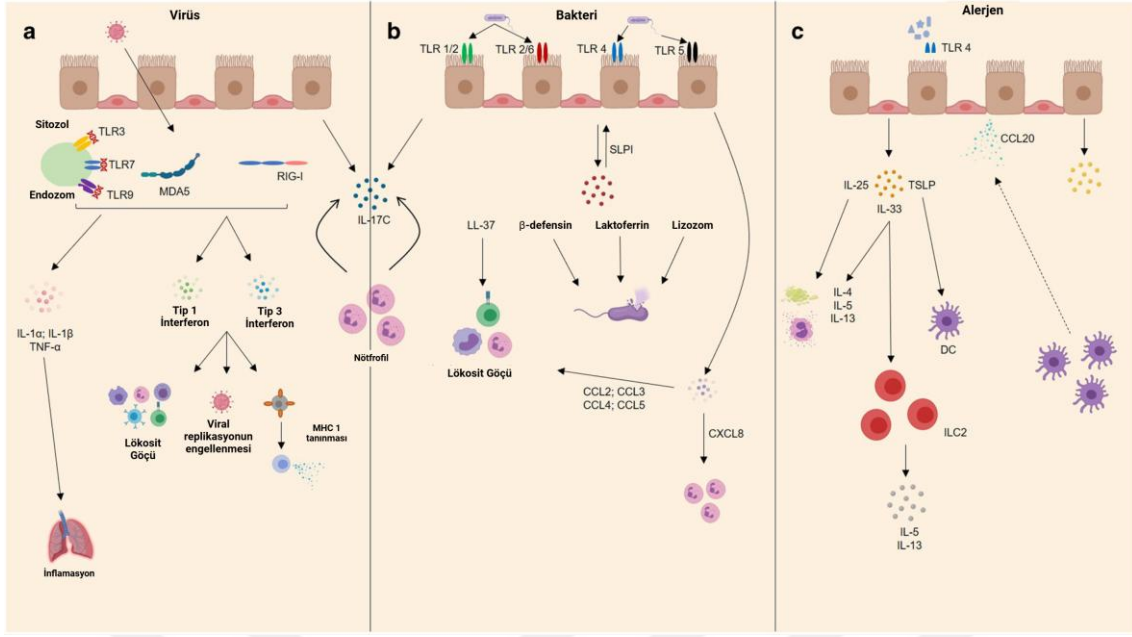
Viral enfeksiyon durumunda, epitel hücrelerinde bulunan çift-zincir RNA'yı tanıyabilen TLR-3 ve MDA5 gibi reseptörler aracılığıyla tip-1 ve tip-3 interferon salgılanması artar [53]. İnterferonlar (IFN) enfekte olan hücreleri uyarak, viral replikasyonun baskılanmasında ve bölgeye bağışıklık hücrelerinin birikmesinde rol alırlar. Ayrıca, enfekte hücrelerde Majör histokompatibilite kompleksi 1 (MHC-1) ifadesini arttırarak, hücrelerin sitotoksik T hücreleri tarafından tanınmasında önemli rol oynamaktadırlar [54] (Şekil 2.4 - A).

Benzer şekilde, PRR'ler bakteriyel enfeksiyon durumlarında da çeşitli TLR aracılığıyla da bakterilere karşı bağışıklık cevabını başlatabilmektedirler. Bu bağışıklık cevapları arasında, anti-mikrobiyal peptitler (AMPs) olarak bilinen ve bakterileri çeşitli mekanizmalar ile etkisiz hale getirebilen araçların üretilmesi ve salınması önemli bir yer tutmaktadır. Lizozimler gram-pozitif bakterilerin yüzeyinde bulunan glikozidik bağları hızlı bir şekilde yıkarak, laktoferrin ise gram-pozitif bakterilerin dış membran bütünlüğünü bozarak onları etkisiz hale getirebilmektedir. PRR'ler aracılı üretilen ve

salınan diğer AMP'ler ise LL-37, β -Defensin ve sekretuvar lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) olarak bilinmektedir [55].

Anti-viral veya anti-bakteriyel moleküllerin üretilmesinin yanı sıra hücrelerin birbirleri ile haberleşmesi ve daha etkili bir bağışıklık cevabın oluşması da PRR'ler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sitokinler ve kemokinler olarak bilinen hücreler arası haberleşme proteinleri, enfeksiyon bölgesine fagositik hücrelerin göçünü, daha güçlü bir cevabın oluşması için kazanılmış bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu veya epitel hücrelerin fonksiyonlarını kontrol edebilmektedirler [56] (Şekil 2.4 - B).

Akciğer epitelinin immünolojik bir bariyer olarak, sitokin ve kemokinler aracılı bağışıklık cevabı alerjik astımda iyi çalışılmış ve anlaşılmıştır. Epitel hücrelerinde bulunan TLR-4, doğrudan HDM ve LPS ile veya alerjen proteazların parçalanmış ürünleri ile aktive olabilmektedir [57, 58]. Alerjik reaksiyonlar, epitel hücreleri tarafından salınan ve alarminler olarak bilinen İnterlökin (IL)-25, IL-33 ve timik-stromal lenfopoietin (TSLP) gibi sitokinler ile başlamaktadır. Alarminlerin temel amacı; karşılaşılan alerjen sinyalini çoğaltarak bölgeye çeşitli inflamatuvar hücrelerin göçünü sağlamak, mukus üretimi ile alerjeni yakalamak ve alerjen ile ikinci bir maruziyete karşı kazanılmış bağışıklık cevabını hazırlamaktır. Bu kapsamda, IL-25 tip-2 sitokinler olarak bilinen IL-4, IL-5 ve IL-13'ün salınımını arttırmak, eozinofil inflamasyonunu uyarmak ve mukus üretimini arttırmak gibi rolleri üstlenmektedir. IL-33 ve TSLP ise tip-2 kazanılmış bağışıklık hücrelerinin ortama göçünü uyarmanın yanı sıra IL-25 gibi tip-2 sitokinlerin üretimini de indüklemektedirler (Şekil 2.4 - C) [59-61].



Şekil 2.4 İmmünolojik bir bariyer olarak akciğer epiteli [56]

2.4. Astım

2.4.1. Astım Tanımı ve Epidemiyolojisi

Astım, kronik inflamasyon ve havayolu obstrüksiyonu ile karakterize heterojen bir hastalıktır. Dünya çapında yaklaşık 300 milyon kişiyi etkileyen astım; hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma ve öksürük gibi semptomlar ve ekspiratuar havayolu obstrüksiyonu ile tanımlanmaktadır [62]. Semptomların ve obstrüksiyonun yoğunluğu genellikle egzersiz, alerjenler, soğuk hava, obezite, hormonlar, sigara dumanı, genetik, epigenetik, sistemik eozinofili ve enfeksiyon gibi çok çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilmektedir. Tetikleyici faktörlerin çeşitliliği ve akciğer fizyolojisi sebebiyle astım; çok sayıda hücre, doku ve sistemin sürekli bir şekilde etkileşim gösterdiği çok çeşitli genetik kökeni olabilen heterojen bir hastalıktır. Astım bu heterojen etkileşimleri sebebiyle, benzer klinik ve fizyolojik belirtilere sahip birçok hastalık grubunu kapsayan bir şemsiye tanı olarak kabul edilmektedir [63].

Dünya çapında yaklaşık yıllık 450.000 kişi astım sebebiyle hayatını kaybetmektedir [62]. Çocukları etkileyen en yaygın kronik hastalık olan astım, Avrupa’da en az 30 milyon çocuk ve genci etkilemektedir [64]. Astım prevalansı ülkeler arasında %1-18 arasında değişiklik göstermekle beraber gelişmiş ülkelerde bu oran daha yüksek olabilmektedir. Astımın prevalansı, yaş ve cinsiyet gibi demografik faktörlere göre de farklılık

göstermektedir. Çocukluk döneminde erkeklerde daha yaygın olan astım, yetişkinlikte kadınlarda daha yüksek oranlarda görülmektedir [62].

2.4.2. Astım Fenotipleri

Demografik yapıya, klinik özelliklere ve patofizyolojik farklılıklara göre astım hastalarının sınıflandırılması, literatürde "astım fenotipleri" olarak adlandırılmaktadır. 2024 Global Initiative for Asthma (GINA) raporuna göre; alerjik astım, alerjik olmayan astım, erken başlangıçlı astım, geç başlangıçlı astım en yaygın görülen astım fenotipleri arasında yer almaktadır.

Alerjik astım, genellikle ailesinde veya geçmişinde alerjik rinit, egzama, besinveya ilaç alerjisi bulunan genç yaştaki bireylerde ortaya çıkan ve hastalarda artan eozinofil inflamasyonu ile karakterize olan astım fenotipidir. Bu fenotip en yaygın astım fenotipi olarak bilinmektedir [65].

Alerjik olmayan astım, semptomların bir alerjen maruziyeti sonucunda oluşmadığı, genellikle soğuk hava, egzersiz veya viral enfeksiyonlar ile tetiklendiği astım fenotipidir. Alerjik astım fenotipinin aksine, alerjik olmayan astım fenotipinde tüm hastalarda ortak olarak baskın bir inflamatuvar hücre artışı bulunmamaktadır. Hastalarda, artan nötrofilik inflamasyon hem nötrofilik hem de eozinofilik inflamasyon veya hiçbir inflamatuvar hücrenin artış göstermediği durumlar alerjik olmayan astım fenotipinde görülebilmektedir [62].

Erken başlangıçlı astım, genellikle atopik bireylerde alerjik astım fenotipinde görülür ve ileri yaşlarda daha belirgin hava yolu yeniden modellenmesi ve kronik inflamasyonla birlikte kalıcı havayolu obstrüksiyonuna yol açabilmektedir [62].

Geç başlangıçlı astım, daha az sıklıkla alerjiyle ilişkilendirilir ve çoğu zaman sigara kullanımı, enfeksiyonlar veya obezite gibi faktörlerle tetiklenmektedir.

Bu fenotipler, hastalığın gözlemlenebilir klinik ve demografik özelliklerine dayanarak gruplandırılmaktadır; ancak altta yatan moleküler veya hücresel mekanizmalar hakkında doğrudan bilgi sağlamamaktadır. Astım fenotipleri, genellikle birbirinden keskin sınırlarla ayrılmamış olup, farklı fenotiplerin birbiriyle örtüşebileceği ve zaman içinde hastanın klinik seyrine bağlı olarak değişiklik gösterebileceği bilinmektedir.

2.4.3 Astım Endotipleri

Fenotiplerin oluşumunda rol oynayan hücresel ve moleküler mekanizmalar, “astım endotipleri” olarak tanımlanmaktadır. Endotipler, hastanın baskın bağışıklık yanıtına göre sınıflandırılmakta olup, Tip-2 yüksek ve Tip-2 düşük olarak gruplandırılmaktadır [63].

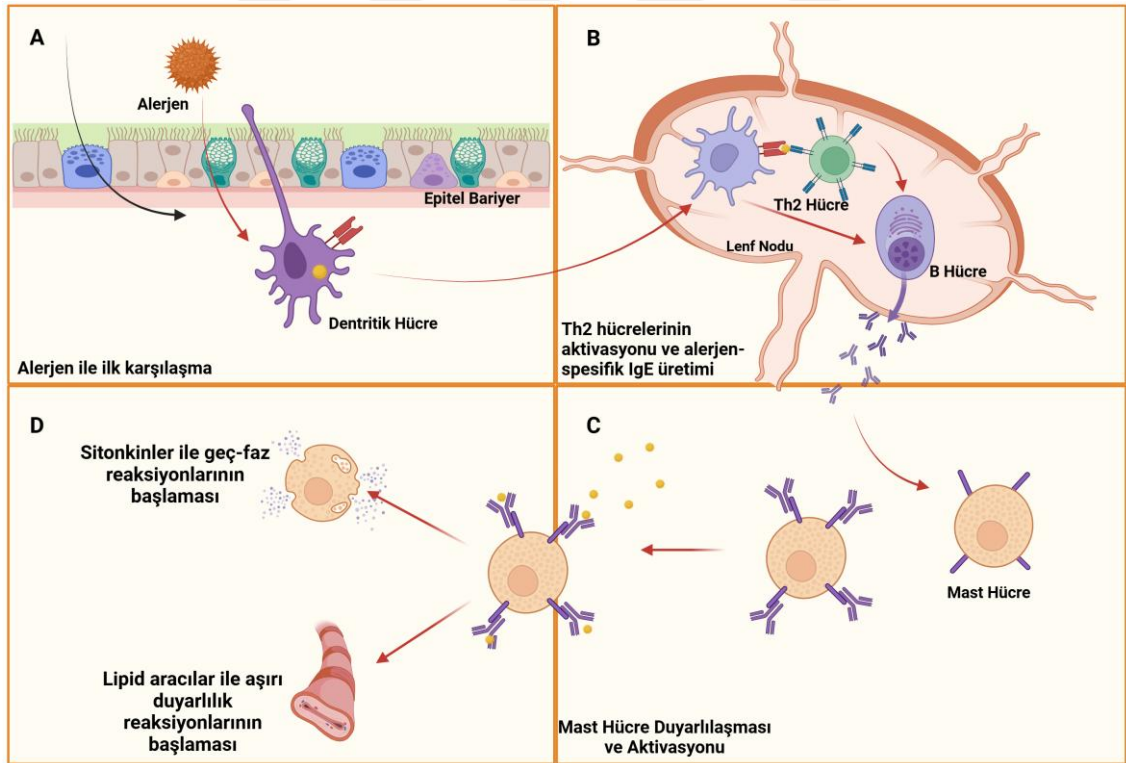
Tip-2 yüksek endotip, çoğunlukla yardımcı T hücre (Th) 2 hücreleri, doğal lenfoid hücreler (ILC) 2 ve eozinofiller gibi bağışıklık hücrelerinden salgılanan IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi tip-2 sitokinlerin baskın olduğu moleküler süreçlerle karakterizedir. Bu endotip doğrudan alerjik astım fenotipi ile ilişkilidir ve kortikosteroid ile tedaviye cevap vermektedir.

Alerjik astım, çevreden solunan alerjenler kaynaklı gelişen havayolu aşırı duyarlılığı ve tip-2 eozinofilik inflamasyon ile karakterize edilmektedir. Tüm astım hastalarının %50’si, çocukluk çağı astım hastalarının ise %80’i alerjik astım profili göstermektedir [61, 66, 67]. Alerjik astım genelde çocukluk çağlarında, atopik dermatit (AD) ve alerjik rinit gibi hastalıklarla birlikte ortaya çıkmaktadır. Alerjik hastalıklar alerjene verilen yanıt bakımından farklılık gösterse de hastalığın gelişiminde aynı mekanizmayı paylaşmaktadırlar.

Tip-1 aşırı duyarlılık reaksiyonları olarak bilinen bu mekanizma; mast hücresi, eozinofil gibi doğal bağışıklık hücreleri ile Th2, ILC2 ve B hücre gibi kazanılmış bağışıklık hücrelerinin yönlendirdiği bir dizi reaksiyondan oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar, Th2 hücrelerinin antijen sunan hücre olarak rol aldığı spesifik immünglobulin (Ig) E üretimi ile başlamaktadır (Şekil 2.5-A). Her karşılaşmada üretilen spesifik IgE tekrar aynı IgE tipinin üretimine sebep olmakta ve bağışıklık hafızasında bulunan B hafıza hücre havuzuna katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.5-B). Mast hücreleri taşıdıkları yüksek afiniteli IgE reseptörü (FcER) 1 ile bu antikorlara bağlanmakta ve bu bağlanma duyarlılaşma olarak tanımlanmaktadır. Duyarlılaştırma, antijen ile tekrar karşılaşıldığında hazır halde bekleyen bağışıklık cevabın gücünü arttırmaktadır. Bağışıklık cevabı bu bakımdan hem çevredeki spesifik IgE seviyesinden hem de mast hücre sayısından etkilenmektedir (Şekil 2.5-C). Antijen ile tekrar karşılaşıldığında, mast hücreler aktifleşmekte ve içerisindeki lökotrien, prostaglandin gibi lipid aracılardan yanı sıra IL-4, IL-5, IL-13 gibi tip-2 sitokinleri de hücre dışına salmaktadır. Lipid aracılar doğrudan endotel ve düz kas

hücresi gibi yapısal hücrelerde fizyolojik bozukluklara sebep olmaktadır. Lipid aracılı patofizyolojik reaksiyonlar, ani aşırı duyarlılık reaksiyonları olarak tanımlanmaktadır. Tip-2 sitokinler ise geç-faz reaksiyonları olarak bilinen daha fazla mast hücresinin veya granüler hücrenin bölgeye geldiği reaksiyonu başlatmaktadır (Şekil 2.5-D).

Bu sitokinlerden biri olan IL-5; eozinofillerin bölgeye çağırılması, çoğalması ve aktivasyonunda çok önemli rol oynamaktadır ve dolayısıyla tüm süreç mast hücreleri gibi eozinofiller tarafından da sürdürülebilmektedir. Bu reaksiyonların en çarpıcı sonucu, alerjik astımda görülen anafilaksi durumudur. Ancak aşırı duyarlılık reaksiyonları her zaman hızlı ve ölümcül sonuca yol açmaz. IgE ve mast hücresine bağlı reaksiyonların tekrarlayan uyarımı, doku hasarı ve yeniden modellenme ile kronik alerjik hastalıklara yol açabilmektedir. Bir diğer önemli tip2 sitokin IL-13 ise hem patolojik musin olarak bilinen MUC5AC üretimini hem de kronik maruziyet durumunda akciğer epitel hücrelerinin mukus hücre fenotipine farklılaştığı metaplazi ve hiperplazi gibi süreçleri indüklemektedir [63, 64, 68].



Şekil 2.5. Tip-1 aşırı duyarlılık reaksiyonu

Tip-2 düşük endotip ise astım hastalarının yarısında görülen ve moleküler mekanizmaları görece daha az anlaşılmış olan astım endotipidir. Tip-2 düşük endotip genellikle, baskın eozinofilik inflamasyon gibi tip-2 yüksek endotip belirteçlerinin olmadığı endotip olarak tanımlanmaktadır. Hastalarda yüksek derecede nötrofilik inflamasyon (balgamda > % 40-60) veya granülosit açısından fakir inflamasyon (balgamda normal seviyede eozinofil ve nötrofil sayısı) ile karakterizedir [63]. Tip-2 düşük endotip, klinik olarak tedavisi zor olan şiddetli astım hastalarının büyük bir çoğunluğunda görülmektedir. Bu endotip genellikle, baskın Th1 ve/veya Th17 hücreler aracılı bağışıklık cevabı ile ilişkilidir [69, 70].

Astım, farklı endotiplerle karakterize edilen karmaşık bir hastalıktır ve bu endotipler altta yatan hücresel mekanizmalar açısından çeşitlilik göstermelerine rağmen, benzer patofizyolojik sorunlara yol açmaktadır. Mukus aşırı üretimi, inflamasyon ve hava yollarında yapısal değişiklikleri içeren hava yolu yeniden modellenmesi süreçleri, astımın her iki endotipinde de ortak patofizyolojik mekanizmalar arasında yer alır. Bu süreçler, hastalığın şiddetini artırarak solunum işlevlerini olumsuz yönde etkileyebilir ve tedaviye dirençli semptomların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Mukus üretimi, tip-2 yüksek endotipte sıklıkla IL-13 aracılığıyla ya da doğal bağışıklık hücreleri tarafından salınan matriks metalloproteinaz (MMP) 9 gibi araçlar yoluyla indüklenmektedir [71-73]. Tip-2 düşük endotipte ise mukus üretimi, nötrofillerden salınan MMP-9'un yanı sıra nötrofil elastaz (NE) gibi proteazlar tarafından tetiklenmektedir [74, 75]. Her ne kadar tip-2 yüksek endotip eozinofilik inflamasyon ve tip-2 düşük endotip nötrofilik inflamasyon ile ilişkilendirilse de alerjik astım hastalarından alınan balgam örneklerinde %60 seviyesine kadar nötrofillere de rastlanmıştır [76]. Ayrıca nötrofiller alerjik astımlı hastaların hava yollarında sürekli olarak bulunmasalar bile; alerjene maruziyetinde, virüsle indüklenen astım alevlenmesinde veya gece krizlerinde sayıca artış gösteren ilk bağışıklık hücreleri olarak karşımıza çıkmaktadır [77-81]. Bu durum astım hastalarında yüksek seviyelerde bulunan nötrofiller ve nötrofil aracılı MMP-9, NE ve onkostatın M gibi proteazların astım patofizyolojisindeki etkisine dikkat çekmektedir [82-85]. Bu proteazlar farklı mekanizmalar ile bağışıklık cevabına katkı sağlamayı amaçlamakta ancak artan inflamasyon ile birlikte proteazların aşırı salınması, mukusun kontrolsüz bir şekilde üretilmesine sebep olmaktadır [86]. Ancak proteazların yalnızca mukus üretimi

üzerindeki etkileri değil, aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu, hücre dışı matriks proteinlerinin parçalanması ve hava yollarındaki yapısal değişiklikleri tetikleyen süreçlerdeki rolleri astım patofizyolojisinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır.

2.4.4 Astımda Proteazlar ve Proteaz İnhibitörlerinin Rolü

Astım patofizyolojisinde proteazlar hem endojen hem de eksojen kaynaklardan salınarak inflamasyonun şiddetlenmesi, mukus üretiminin artması ve hava yolu dokularında yapısal değişikliklerin oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Astım hastalarında, proteazların kontrolsüz aktivitesi, epitel hücre hasarına, mukosiliyer klirens mekanizmasının bozulmasına ve hava yollarının tıkanmasına yol açarak hastalığın şiddetini artırabilmektedir.

Nötrofiller ve eozinofiller gibi bağışıklık hücreleri tarafından üretilen proteazlar arasında serin proteazlar, MMP'ler ve sistein proteazları öne çıkmaktadır [87]. Vignola ve arkadaşları tarafından; sağlıklı bireylerden ve astım hastalardan elde edilen balgam örneklerinde, yalnızca astım hastalarında NE seviyesi ile nötrofil sayısı arasında doğrudan bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir. Bu durum nötrofillerin yalnızca astım hastalarında aktive olarak, hücre içi proteazların salımını arttırdığını göstermektedir. Bu olguyu destekleyecek şekilde, aynı hastalarda NE seviyesi ile hava yolu obstrüksiyonunu belirten zorlu ekspirasyon hacmi (FEV)₁ değeri arasında ters yönde bir ilişki gözlenmiştir [88]. Ayrıca artan NE seviyesi hava yolu epitel hücreleri ve eozinofillerden salınan IL-8 salınımını arttırarak, ortama daha fazla nötrofilin göç etmesine sebep olmaktadır. Dolayısıyla artan NE seviyesi; hücre dışı matriksin majör bir bileşeni olan elastinin NE tarafından degradasyonu, nötrofil inflamasyonun artması gibi patofizyolojik süreçlere doğrudan katkı sağlamaktadır [89].

Nötrofiller tarafından salınan ve astım patofizyolojisinde öneme sahip diğer bir proteaz ise MMP-9'dur. MMP-9 nötrofillerin yanı sıra eozinofiller, epitel hücreler ve fibroblastlar tarafından da salınmaktadır. MMP-9; hücre dışı matriksin önemli bileşenleri olan elastin ve tip IV kolajeni parçalayarak epitel altı fibrozis veya bazal lamina kalınlaşması gibi kapsamlı değişikliklere sebep olabilmektedir [90]. Diğer bir dikkat çeken etkinliği ise IL-8'i keserek daha aktif formuna döndürmesidir. IL-8'in aktif formu bölgeye daha fazla

nötrofilin göçüne sebep olabilmektedir. MMP-9'un yanı sıra matriks-metalloproteinaz-1,-2,-3 ve 12'de astım patofizyolojisinde önemli yere sahip proteazlar olarak bilinmektedir [91].

Proteazlar, yalnızca bağışıklık hücreleri tarafından değil, aynı zamanda çevreden solunan mikroorganizmalar aracılıda olabilmektedir. HDM kaynaklı ve sistein proteaz aktivitesine sahip olan *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p)1 alerjeni bu duruma iyi bir örnek oluşturmaktadır. Der p1 alerjeni, bir alerjen özelliği gösterip bağışıklık mekanizmalarını aktive etmesinin yanı sıra NE inhibitörü olan alfa1-antitripsini (α 1-antitrypsin) parçalayarak astım patogeneze katkıda bulunabilmektedir [89].

Hastalık koşullarında proteazların aşırı aktivitesi, elafin, sekretuar lökosit proteaz inhibitör (secretory leukocyte protease inhibitör, SLPI), plazminojen aktivatör inhibitör -1 (PAI-1), α -1 antitripsin (AAT), matriks metalloproteaz doku inhibitörleri (TIMP), serin ve sistein peptidaz inhibitörleri, kazal tip 5 (SPINK5) ve alfa-1 antitripsin gibi proteaz inhibitörleri tarafından kontrol altında tutulmakta ve proteazların neden olduğu akciğer dokusu hasarını azaltarak veya mukus üretimini baskılayarak hava yollarını korumaktadır. Proteazlar ve anti-proteazlar arasındaki dengenin bozulması astım gibi kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarının patogeneze katkıda bulunmaktadır [92]. Proteaz inhibitörlerinin proteazlar üzerine doğrudan ve dolaylı etkileri, hava yolu yeniden modellenmesinde ve inflamasyonun baskılanması gibi süreçlerde bilinmekte birlikte, proteaz inhibitörlerinin mukus ve MUC5AC üzerine olan etkileri konusundaki literatürde kısmen sınırlıdır.

Astım gibi kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarında proteaz ve anti-proteaz dengesi, hastalık şiddetinin belirlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Proteazların aşırı aktivitesi ve inhibitör mekanizmaların yetersizliği, hava yollarında inflamasyonun artmasına, yeniden yapılanmaya ve mukus üretiminin kontrolsüz şekilde artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, proteazlar ve proteaz inhibitörleri üzerine yapılacak kapsamlı çalışmalar, astım patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır [86].

2.4.5 Astımda Mukus Üretimi

Aşırı mukus üretimi, astım, KOAH ve kistik fibroz gibi muko-obstrüktif akciğer hastalıklarında yaygın bir patoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Solunum yollarında aşırı miktarda salgılanan mukus, bu hastalıkların patofizyolojisinde merkezi bir rol oynamakta ve hava yollarının tıkanmasıyla sonuçlanmaktadır. Özellikle astımda, mukus üretiminin kontrolsüz artışı ve bunun sonucunda gelişen mukus plakaları, 100 yılı aşkın bir süredir patologlar tarafından ölümcül astım ataklarının başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Mukus anomalilerinin tüm astım şiddetlerinde gözlenebilmesi, bu durumun yalnızca ileri aşamalarda hastalarda değil, hafif astım hastalarında da patofizyolojik sürecin bir parçası olduğunu göstermektedir. Astım atağı sırasında bu anomaliler hızlanmakta, mukus üretimi artmakta ve hava yolu tıkanıklığı daha da şiddetlenmektedir [37, 38].

Astımda mukus hücrelerinin ürettiği musin proteinlerinin profili, bu patolojide belirleyici bir role sahiptir. Astım hastalarında, üretilen musin proteinlerinden MUC5AC seviyelerinde belirgin bir artış gözlenirken, MUC5B seviyelerinde bir azalma olduğu raporlanmıştır. Bu dengesizlik, mukus yapısında ve işlevinde ciddi değişikliklere yol açmaktadır. Astımlı fare modeli ile yapılan deneylerde, alerjen maruziyetinin ardından MUC5AC seviyelerinde 12 katlık bir artış gözlenirken, MUC5B seviyelerinde 2 katlık bir azalma rapor edilmiştir. Bu bulgular, astımda musin bileşenleri arasındaki dengenin bozulmasının hastalık patofizyolojisindeki önemini vurgulamaktadır [39].

MUC5AC seviyesindeki artış hava yollarında obstrüksiyona ve epitel bariyer savunmasını zayıflatan önemli patolojik süreçlere sebep olmaktadır. Bu proteinin aşırı üretimi, yalnızca hava yollarının fiziksel olarak tıkanmasına yol açmakla kalmayıp, aynı zamanda bağışıklık sistemi hücrelerinin, özellikle eozinofillerin, astım patofizyolojisine dahil olmasını kolaylaştırmaktadır. MUC5B'nin düşük seviyelerde bulunması, mukus tabakasında eozinofillerin Siglec-8 aracılı apoptozunu engelleyerek hayatta kalmalarına ve inflamasyonu sürdürmelerine olanak tanımaktadır. Bu durum, inflamatuvar yanıtın daha da şiddetlenmesine ve hava yollarındaki yapısal değişikliklerin hızlanmasına neden olmaktadır [93].

Musin proteinlerinin astım patofizyolojisindeki bu kritik rolleri, onları astım tedavisinde terapötik hedef haline getirmiştir. Ancak, MUC5AC ve MUC5B gibi musin proteinlerinin üretimi, salgılanması ve bağışıklık sistemi ile etkileşimleri henüz tam anlamıyla

aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, bu proteinler üzerine yapılan araştırmalar, astım tedavisinde yeni ve daha etkili yaklaşımlar geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

2.4.6. Mukus Üretiminin Moleküler Mekanizmaları

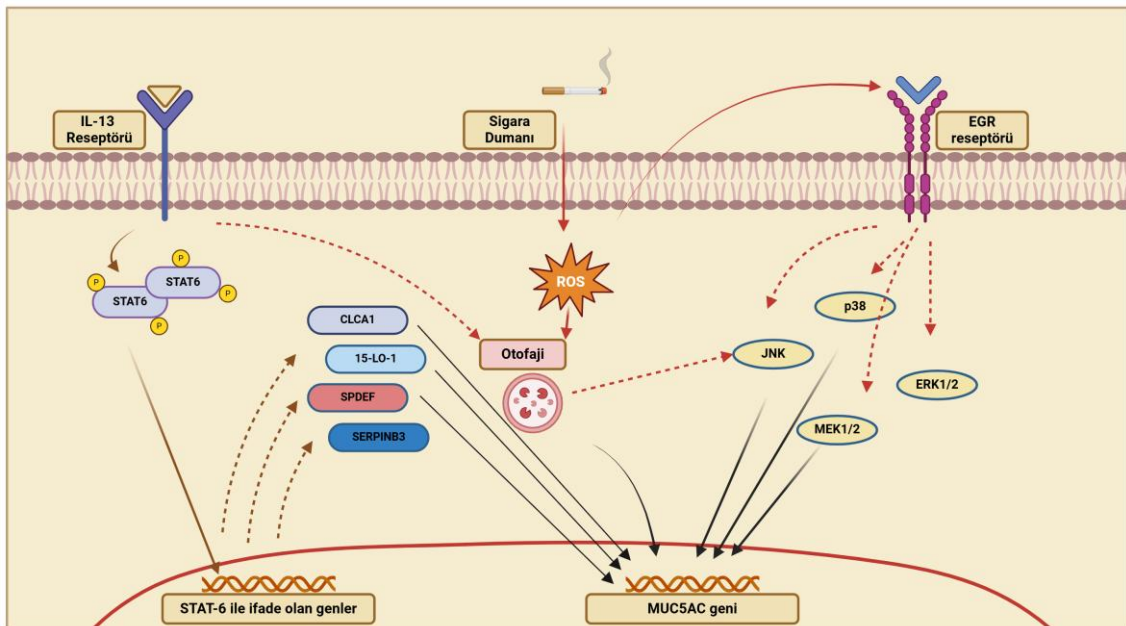
İnsan MUC5AC geni, kromozom 11p15.5 üzerinde MUC2 ve MUC5B genleri arasında konumlanmaktadır. MUC5AC ifadesini indükleyen faktörler arasında viral veya bakteriyel enfeksiyon, sigara dumanı, inflamasyon, proteazlar ve çeşitli büyüme faktörleri bulunmaktadır. Özellikle alerjik astım koşullarında, IL-13 sitokini ve epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü aracılı hücre içi sinyal yolları, MUC5AC ifadesini kontrol eden iki temel mekanizma olarak tanımlanmıştır [73, 94]. IL-13, insan hava yolu epitel hücre kültüründe ve fare modellerinde mukus hücre metaplasisini doğrudan indüklemesi nedeniyle, Tip-2 inflamasyonun etkili olduğu kronik hastalıklarda önemli bir role sahiptir [43, 44]. Tip-2 yüksek ve Tip-2 düşük endotipe sahip hastalarla yapılan bir çalışmada, Tip-2 inflamasyonun epitel hücrelerde MUC5AC üretimini belirgin şekilde artırdığı gösterilmiştir [66].

IL-13 reseptörü aracılı yolak, hücre içi STAT6 fosforilasyonunu uyarak aktif hale gelmektedir. STAT6'nın nakavt edildiği fare modellerinde, IL-13 uyarımının mukus üretimini ve mukus hücre metaplasisini uyarma yeteneğini kaybettiği görülmüştür [95]. STAT6 fosforilasyonu, CLCA1, SERPINB3, 15-LO-1 ve SPDEF gibi önemli aracı moleküllerin ekspresyonunu artırmaktadır [96-98]. Bu sinyal yollarının tamamı, MUC5AC üretiminin artışı ile sonuçlanmaktadır. Ancak IL-13'ün MUC5AC ifadesine olan etkisi yalnızca STAT6 yolağı ile sınırlı değildir. Astım ve KOAH modellerinde, IL-13 maruziyeti sonucu hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) ve otofaji süreçlerinin de MUC5AC ifadesini etkilediği gösterilmiştir [99, 100] (Şekil 2.6). Sigara dumanı ekstraktı gibi diğer uyarılar da otofaji ve ROT aracılığıyla MUC5AC üretimini artırabildiği bilinmektedir [50]. Hem IL-13'ün hem de sigara dumanının hücre içi ROT seviyesini yükselttiği ve otofaji etkinliğini artırdığı bilinmektedir. Bu süreçlerin her biri, doğrudan veya dolaylı olarak MUC5AC üretimi ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, IL-13 veya sigara dumanı ekstraktı maruziyeti sırasında EGF reseptörü de eş zamanlı olarak aktif hale

gelebilmekte ve hatta bağımsız olarak da MUC5AC ifadesini düzenleyebilmektedir [101].

Astım patolojisinde inflamatuvar sitokinler (TNF- α), proteolitik enzimler (NE ve MMP), ROT ve bakteriyel ürünler gibi çeşitli uyaranlar da EGF reseptörü aracılığıyla MUC5AC üretimini artırmaktadır [86]. Hava yolu epitel hücreleri, EGF reseptörü ve bu reseptörün TGF- α gibi ligandlarının inaktif formlarını membran üzerinde eksprese etmektedir [94]. Ortamdaki uyaranların artışı, TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) aracılığıyla pro-TGF- α 'yı aktif formuna dönüştürmekte ve MAPK yollarını (Ras/MEK/ERK) aktive etmektedir. MAPK ailesi, ERK, p-38 ve c-Jun N terminal kinaz (JNK) gibi alt gruplardan oluşmakta ve bu kinazların her biri astım ve KOAH gibi akciğer hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.6). Özellikle ERK1/2'nin JNK ile birlikte aktivasyonu, AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek MUC5AC gen ekspresyonunu artırmaktadır [102].

Buna ek olarak, sigara dumanına bağlı olarak artan ROT seviyelerinin ERK aktivasyonu yoluyla MUC5AC üretimini uyardığı ve transkripsiyon faktörü Sp1'in aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, ROT'un yalnızca EGFR/ERK yolağını değil, Src/JNK yolağını da aktive ederek MUC5AC ifadesini indüklediği bilinmektedir. Ancak p38 gibi diğer kinazların MUC5AC ekspresyonundaki rolleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır [103, 104]. Bu mekanizmaların detaylı incelenmesi, astım tedavisinde daha etkili terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlayabilecektir.



Şekil 2.6. MUC5AC üretiminin moleküler mekanizmaları

2.5. SERPINB3 Proteaz İnhibitörü

2.5.1. Yapısı ve Biyokimyasal Özellikleri

Serin proteaz inhibitörü (SERPIN) ailesi, tüm canlılar arasında yaklaşık 1.500, insanlarda ise 36 fonksiyonel protein kodlayan gene sahip en geniş proteaz inhibitör ailesi olarak bilinmektedir [105, 106]. SERPIN'ler, sekans benzerliklerine göre "klad" adı verilen gruplara ayrılır ve insanlarda 9 farklı klad mevcuttur. SERPIN'lerin büyük çoğunluğu serin proteaz inhibitörleri olmakla birlikte, SERPIN klad B üye 3 (SERPINB3) gibi bazı üyeleri ise sistein proteaz inhibitör özelliğine sahiptir [107]. Ancak SERPIN'lerin bazı üyeleri inhibitör aktivite göstermeden, hormon taşınması veya moleküler taşıyıcı olarak da hücre içi süreçlerde rol alabilmektedirler [108-110].

SERPINB3, ilk olarak 1977 yılında rahim ağzı skuamöz hücreli karsinomdan izole edilmiştir [111]. İzole edilen proteinin izoelektrik odaklama ile incelenmesi sonrasında, aslında nötral ve asidik olmak üzere iki farklı izoforma ait bir protein karışımının izole edildiği keşfedilmiştir. SERPINB3 bu izoformlardan nötral olanı temsil ederken, SERPINB4 izoformlardan asidik olanı temsil etmektedir [112].

SERPINB3 ve SERPINB4, 18. kromozom üzerinde (18q21.3) gen duplikasyonu ile çoğalmış paralog genler olarak bilinmektedirler [113]. Bu genler %98 seviyesinde özdeşlik göstermekle beraber, 8 ekzon ve 7 intron bölgelerinden oluşan yaklaşık 10 kb uzunluğa sahiptirler [114]. SERPINB3/4 protein seviyesinde ise %92 seviyesinde özdeşlik göstermektedir [115, 116]. İki protein amino asit dizisi bakımından yüksek benzerlik gösterse de proteinlerin substratların bağlanma ve inhibe ettiği bölge olan reaktif merkez döngüsünde (RCL) bulunan farklılıklardan dolayı iki proteinin hedef proteazları tamamen farklıdır. SERPINB3'ün papain-benzeri sistein proteazlar olan, katepsin K, L, S ve papain üzerinde, SERPINB4'ün ise kimotripsin-benzeri proteazlar olan kimaz, katepsin G ve Der p1 gibi serin proteazlar üzerinde inhibe edici etkisi olduğu bilinmektedir [117-120].

SERPINB3 ve SERPINB4, diğer klad B SERPIN'ler gibi ovalbumin-benzeri bir ana iskelet etrafında bulunan; 9 α -sarmal, 3 anti-paralel β -yaprak ve 1 hidrofobik RCL bölgesinden oluşmaktadır [121, 122]. RCL bölgesi, substratın bağlanması ve inhibe

edilmesi için hedef proteazı tanıyacak 17 amino asitlik bölgeden oluşmaktadır. RCL bölgesi amino asitleri, proteaz kesim bölgesine yaklaştıkça küçülen ve aktif kesim bölgesinde 1',2',3' gibi tırnak işareti alan artan ardışık sayılar ile sınıflandırılmaktadır [123] (Şekil 2.7). SERPINB3 ve B4 protein düzeyleri arasındaki farklılığın saptanması için yapılan deneylerde, her iki proteinin RCL bölgesinde yüksek homoloji gösteren menteşe bölgesi (hinge region, 15-8) ve hedef proteaz tanıyan değişken bölge (variable region, 7-4') olduğu keşfedilmiştir. SERPINB3 SERPINB4'ün inhibitör aktiviteleri üzerine yapılan tüm çalışmalar *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiş olup *in vivo* olarak henüz enzim-substrat bağlanma kinetikleri hakkında yeterli veri yoktur. Bu durum proteinlerin potansiyel proteaz hedeflerini keşfetmede ve olası hücre içi rollerini aydınlatmanın önünde önemli bir engel olarak durmaktadır [124].

	Menteşe										RCL										Hedef proteaz			
İnsan	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	1'	2'	3'	4'					
SERPINB3	G	A	E	A	A	A	A	T	A	V	V	G	F	G	S	S	P	T	S	Papain, Katepsin L, S, K				
SERPINB4	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	V	E	L	*	S	P	*	Kimaz, Katepsin G, DER P, Granzim M				
Fare																								
serpinb3a	G	T	E	A	A	A	A	T	G	V	E	V	S	L	T	S	A	Q	I	Katepsin K, L, S, V, G, Papain, Der P				
serpinb3b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	R	*	*	*	*	Katepsin L, G				

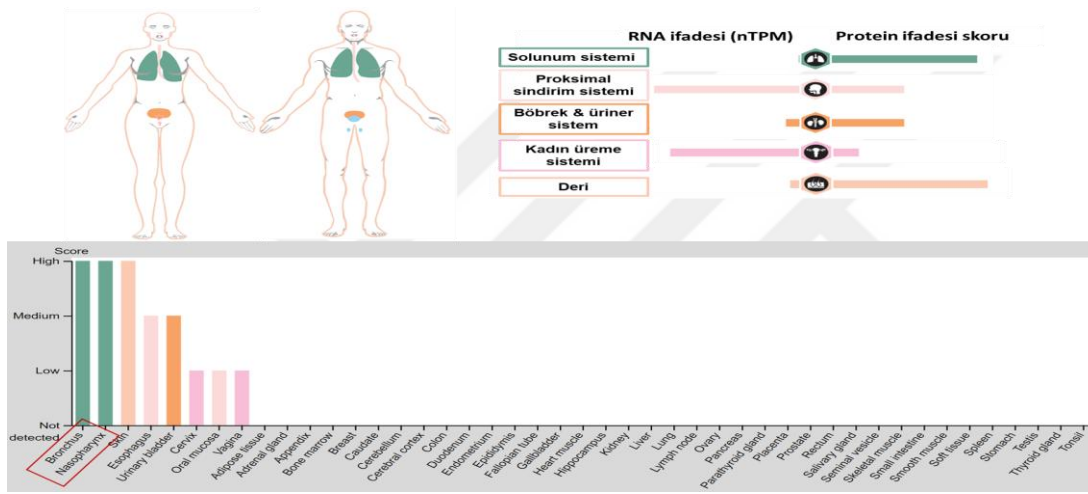
Şekil 2.7. İnsan ve fare SERPINB3/B4 RCL bölgelerindeki farklılıklar

Protein etkileşimlerinin incelenmesi zor olduğu durumlarda, insan proteinin fare homologu ve onun işlevleri üzerinden bilgi eldesi yararlı sonuçlar veren bir uygulamadır. Ancak insan SERPINB3/B4 proteinlerinin işlevsel açıdan aynı olacak biçimde fare homologu bulunmamaktadır. Farede birçoğu insan SERPIN genleri ile ortolog olan 62 tane SERPIN geni bulunmaktadır [106]. Farelerde insan SERPINB3/B4 ortologu olarak 4 kopya bulunmaktadır. Bu genler Serpinb3a, b3b, b3c ve b3d olarak adlandırılmaktadır. Serpinb3a ve serpinb3b, insanlarda olduğu gibi, amino asit diziliminde yüksek (%93) benzerlik göstermekle beraber hedef proteazları açısından farklılık göstermektedirler. Bu 4 kopya arasından yalnızca bu iki serpinin, Serpinb3a ve Serpinb3b, proteaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak hem Serpinb3a hem de Serpinb3b, insan homologlarının aksine serin ve sistein proteaz inhibitör aktivitesi göstermekte ve bu özellikleri ile SERPINB3/B4'ten ayrılmaktadırlar. Ayrıca fare Serpinb3 amino asit dizisi ile insan SERPINB3 amino asit dizisi arasında yalnızca %60 benzerlik bulunmaktadır [125, 126]. Bu iki durum insan SERPINB3 protein işlevinin gelişim veya

hastalık koşullarında daha iyi anlaşılması için fare homologlarından yararlanılmasını engellemektedir.

2.5.2. Doku Dağılımı ve Hücre İçi Konumu

Çataltepe ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada, SERPINB3'ün mesane, uterus, özofagus, akciğer, prostat, testis, timüs ve trake gibi çeşitli sağlıklı dokularda da ifade edildiğini göstermiştir [127]. İnsan Protein Atlası (Human Protein Atlas)'na göre SERPINB3'ün en fazla ifade edildiği dokular Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. SERPINB3'ün dokular arası dağılımı

SERPINB3 ilk olarak dolaşım sisteminde keşfedilmiş olmasına rağmen genellikle sitozolde bulunduğu bilinmektedir. Dolaşım sisteminde tespit edilen SERPINB3'ün, ölü hücrelerden pasif olarak veya canlı hücrelerden aktif olarak salınıp salınmadığı üzerinde bir fikir birliği bulunmamaktadır [128]. Ayrıca yapılan çalışmalar SERPINB3'ün lizozom, mitokondri ve çekirdek gibi organellerde de bulunabildiğini göstermiştir. Özellikle kanser ile ilişkisinin araştırıldığı bu çalışmalarda, SERPINB3'ün anti-apoptotik bir rolü sebebiyle bu organellere translokasyon ile geçtiği düşünülmektedir.

2.5.3. SERPINB3 ve Hastalıklarla İlişkisi

SERPINB3'ün yapısal özellikleri ve bu özelliklere bağlı işlevlerinin tam olarak aydınlatılmamış olması, protein üzerindeki çalışmaların sınırlı kalmasına neden

olmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli kanser türlerinde ve kronik inflamatuvar hastalıklarda SERPINB3 ifadesinin belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir [124]. Bu durum hem bu hastalıklardaki işlevlerini anlamının hem de potansiyel terapötik hedef olarak değerlendirmenin önemini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, SERPINB3'ün hücre içi rolleri ve proteaz inhibitör aktivitesinin detaylı olarak incelenmesi, kanser ve inflamatuvar hastalıkların patofizyolojisine dair önemli ipuçları sağlayabilir.

2.5.3.1. SERPINB3 ve Kanser

SERPINB3, ilk olarak servikal skuamöz hücreli karsinom hastalarının serumunda yüksek seviyelerde tespit edilmiş ve kanserle ilişkisi ortaya konmuştur [129]. Daha sonra, baş-boyun ve özofagus karsinomu gibi diğer skuamöz hücre kaynaklı karsinom türlerinde de artan SERPINB3 ifadesi gözlenmiştir [127]. Bununla birlikte, yalnızca skuamöz hücreli karsinomlarla sınırlı kalmayıp, salgı epitel hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinom türleri (akciğer, pankreas, göğüs ve karaciğer gibi) için de yüksek düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, SERPINB3'ün epitel kaynaklı farklı kanser türlerinde önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Ayrıca servikal, karaciğer ve akciğer kanserleri gibi belirli kanser türlerinde, hastalığın ilerleme seviyesi ile SERPINB3 ifadesi arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu durum, SERPINB3'ün yalnızca hastalığın teşhisinde bir belirteç olarak değil, aynı zamanda kanserin ilerlemesi ve tedaviye verilen yanıtı öngörmek için de önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmasına sebep olmuştur. Ayrıca SERPINB3 ifadesinin, sağlıklı karaciğer hücrelerinde neredeyse tespit edilemeyecek kadar az olmasına karşın hepatosellüler karsinom hücrelerinde yüksek SERPINB3 ifadesinin tespit edilmesi ile SERPINB3'ün kanser gelişimi ve ilerleyişinde önemli bir role sahip olabileceğini belirtmektedir. Literatürde SERPINB3 ve kanser ilişkisi genel olarak, SERPINB3'ün artan ifadesinin farklı mekanizmalar aracılığıyla apoptozu engellemesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Apoptoz; DNA hasarı, viral enfeksiyonlar veya kanser gelişimi gibi hücrelerin normal işlevlerini yerine getiremeyecek olduğu durumlarda, hücrelerin kendilerini programlı bir şekilde imha ettiği bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Kontrolsüz hücre büyümesi olarak bilinen kanserin gelişimi, hücrede apoptoz mekanizmalarının bastırılması veya inhibisyonu ile mümkün olabilmektedir. Suminami ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan çalışmada; antisens SERPINB3 ile transfekte edilen SCC Ag-1 pozitif tümör

hücre hatlarında, SERPINB3 ifadesinin düşmesi ile hücrelerin apoptozu indükleyen anti-kanser ilaçlara karşı daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir [130]. Bu bulgu kapsamında, SERPINB3'ün anti-apoptotik rolü üzerine odaklanılmıştır. SERPINB3 ve kanser ilişkisini araştıran çalışmalarda SERPINB3'ün; UV, TNF- α , ROT ve lizozomal sızıntı ile indüklenen apoptozu engelleyerek kanser gelişimine veya ilerlemesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Katagiri ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği in vitro ve in vivo çalışmalarda, UV ışınlarına maruz kalan keratinosit hücrelerinde SERPINB3 ifadesinin arttığı ve bunun, JNK ve p-38 moleküllerinin inhibisyonu yoluyla UV ile tetiklenen apoptozu engellediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, JNK'nin inhibisyonu, SERPINB3'ün proteaz inhibitörü olmanın ötesinde başka bir işlevi olduğunu ortaya koymuştur. SERPINB3, aktif JNK'ye bağlanarak onu çekirdeğe taşıdığı ve bu şekilde JNK aracılı sinyal yollarının aktive olmasını engellediği gösterilmiştir [131].

2014 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise SERPINB3'ün kemoterapötik ilaçlarla ilişkisi hepatoselüler karsinom hücre hattı (HepG2) üzerinde incelenmiştir. Bu çalışmada, SERPINB3 ekspresyon plazmidi ile transfekte edilen hücrelerin kemoterapötik ilaçlara karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur. Bu direncin, SERPINB3'ün mitokondriyal iç membrana yerleşerek kemoterapi sonrası salınan reaktif oksijen türlerini baskılaması ve böylece apoptozu engellemesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [132]. Diğer bir çalışmada ise SERPINB3'ün mitokondriyal iç membrana yerleşmesinin TNF- α aracılı apoptozu inhibe ettiği bir mekanizma ortaya çıkarılmıştır [133]. Bir proteaz inhibitörü olarak ise SERPINB3'ün lizozomal proteinleri inhibe ettiği anti-apoptotik bir rolü de keşfedilmiştir. Hipoksi ve oksidatif stres gibi stres koşulları veya anti-kanser ilaçlar lizozomal membran geçirgenliğini (LMP) arttırarak, katepsin L ve S gibi lizozomal proteinlerin hücre-içine salınmasını ve apoptozu indükleyebilmektedirler. Ancak kanser koşullarında artan SERPINB3 ifadesinin, sistein proteaz özellikteki lizozomal proteinleri inhibe ettiği ve dolayısıyla apoptozu engellediği öne sürülmektedir. Bu bulguyu destekleyecek şekilde, kanser hücrelerinin oksijensiz ortamda hayatta kalmasını sağlayan önemli araçlardan biri olan hipoksi ile indüklenen faktör 1-alfa'nın (HIF-1- α) doğrudan SERPINB3 promotör bölgesine bağlanarak ifadesini indüklediği tespit edilmiştir [134]. SERPINB3'ün bu anti-apoptotik rollerinin yanı sıra metastaz ve fibrozis gibi kanser patofizyolojisinde farklı rolleri de tespit edilmiştir.

2.5.3.2 SERPINB3 ve Kronik İnflamatuvar Hastalıklar

SERPINB3'ün ifade seviyelerinin kanser hücrelerinde artmasının yanı sıra, AD, sedef hastalığı, astım, KOAH, tüberküloz ve KF gibi çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklarda da arttığı bilinmektedir. AD hastalarından alınan deri örneklerinde yapılan çalışmalar, SERPINB3 seviyesinin hastalığın şiddetiyle doğru orantılı olarak yükseldiğini göstermiştir. Aynı çalışmada, tedaviye olumlu yanıt veren hastalarda SERPINB3 seviyesinin normal düzeye döndüğü tespit edilmiştir [135, 136].

2015 yılında gerçekleştirilen bir başka çalışmada, SERPINB3 homoloğu olan serpinb3a'nın AD fare modeli üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, alerjen maruziyeti sonrasında normal farelerde epitel bariyer hasarı ve inflamasyon artışı gözlenirken, serpinb3a geni eksik (serpinb3a-deficient) olan farelerde bu etkiler görülmemiştir. Bu bulgu, SERPINB3'ün epitel bariyer bütünlüğü ve inflamasyon süreçlerindeki potansiyel rolünü ortaya koymaktadır. Ayrıca, AD üzerine yapılan diğer araştırmalar, SERPINB3 ifadesinin tip-2 sitokinler olan IL-4 ve IL-13 tarafından indüklendiğini göstermiştir [137].

2023 yılında Bürgler ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, SERPINB3 ve AD ilişkisi lizozomal proteinler ve otofaji bağlamında incelenmiştir. IL-4 ve IL-13 blokajı olan dupilumab tedavisi alan AD hastalarından tedavi öncesi ve sonrası deri örnekleri toplanmıştır. Tedavi öncesi örneklerde LC3B, p62, SERPINB3 ve SERPINB4 protein seviyelerinin yüksek olduğu, ancak katapsin D ve katapsin L seviyelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Tedavi sonrasında bu proteinlerin ifade düzeylerinde tersine bir değişim gözlenmiştir. Araştırmacılar, tip-2 sitokinlerin SERPINB3 ve SERPINB4 ifadelerini artırarak lizozomal proteinleri (katapsin L, katapsin D) inhibe ettiğini ve otofajiyle ilişkili proteinlerin (LC3B, p62) birikimine yol açtığını öne sürmektedir [138].

SERPINB3 ile ilişkili olan bir diğer kronik inflamatuvar deri hastalığı ise sedef hastalığıdır [139, 140]. AD de çalışmalarında bulgularla benzer şekilde sedef hastalığında da artan SERPINB3 ifadesinin epitel bariyer hasarı ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir [141]. Sedef hastalığında, artan SERPINB3 ifadesi ile ilişkilendirilen dikkat çekici bir mekanizma bulunmaktadır. Keratinosit hücrelerinde ifadesi artan SERPINB3, mast hücreleri kaynaklı kimaz ile parçalara ayrılmaktadır. Bu parçalar pso p27 olarak adlandırılmakta ve büyük agregatlar oluşturmaktadırlar. Bu durum sedef hastalığında inflamasyonun artmasına ve immün yanıtın SERPINB3 aracılı düzenlenmesine sebep

olmaktadır. Normal şartlar altında keratinosit hücrelerinin sitozolünde bulunan SERPINB3'ün, kimaz tarafından hangi mekanizma ile parçalandığı netlik kazanmamıştır [142]. Ek olarak, sedef hastalığı genellikle tip-1 inflamatuvar sitokinler ile indüklenmektedir. Bu durum AD de karşılaşılan tip-2 sitokin aracılı SERPINB3 ifadesindeki artışın aksine, SERPINB3 ifadesinin başka yollar aracılığıyla da indüklenbildiğini göstermektedir [124].

İlginç bir şekilde, fizyolojik koşullarda akciğerler SERPINB3 ifadesinin en fazla olduğu organ olarak bilinmesine ve kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarında artan SERPINB3 ifadesine rastlanmasına karşın, SERPINB3'ün bu hastalıklar ile ilişkisine ait çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Astım ile ilgili olan çalışmalar, SERPINB3 ifadesinin astımda arttığı ve belirteç olarak kullanılması ile başlamıştır [143, 144]. Bu çalışmalar tip-2 inflamatuvar sitokinler baskın olduğu alerjik astım fenotipine sahip hastalarda üzerinde yapılmakla beraber, artan SERPINB3 seviyesinin tip-2 sitokinler aracılığıyla indüklendiği belirtilmiştir. Astım ve SERPINB3 ilişkisinin incelendiği çalışmalar, patolojik koşullarda üretimi artan MUC5AC ifadesi üzerine yoğunlaşmıştır.

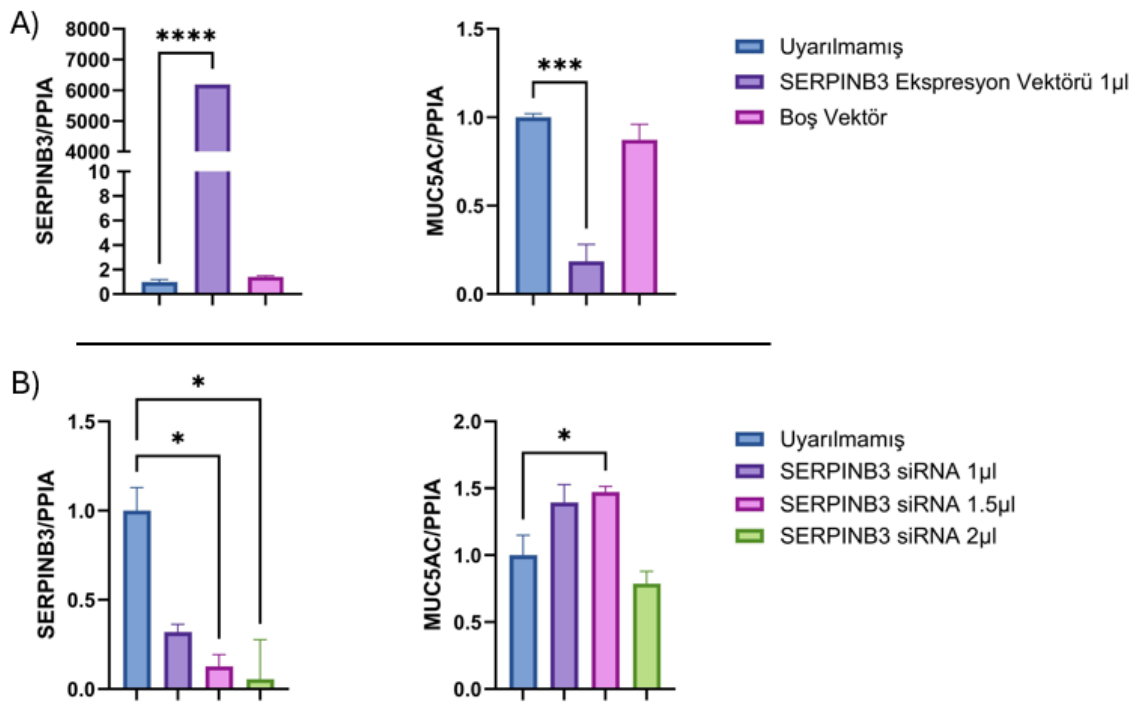
2.5.3.3 SERPINB3 ve Mukus Üretimi

SERPINB3'ün astım patofizyolojisine olan etkisi ilk olarak 2011 yılında Sivaprasad ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada incelenmiştir. HDM veya IL-13 ile indüklenen astım fare modeli üzerinde yapılan bu çalışmada, serpinb3a geni eksik fareler ile yabanıl tip fareler kullanılmıştır. HDM veya IL-13 uyarılan farelerde inflamasyon, hava yolu aşırı duyarlılığı ve MUC5AC üretimi incelenmiştir. Çalışma sonucunda; HDM ile indüklenen astım modelinde serpinb3a'nın MUC5AC üretimine katkı sağladığı, IL-13 indüklenen astım modelinde ise serpinb3a'nın inflamasyon, hava yolu aşırı duyarlılığı ve MUC5AC üretimi süreçlerinde doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada yabanıl farelerde, IL-13 veya HDM uyarımlarında goblet hücrelerin karakteristik proteini olan SPDEF'nin ifadesinin artması ile MUC5AC üretiminin indüklediği öne sürülmüştür. Serpinb3a geni eksik olan farelerde ise IL-13 veya HDM uyarımları sonucunda SPDEF proteinin, yabanıl farelere kıyasla aynı oranda artmadığı ve MUC5AC üretimini indükleyemediği belirtilmiştir [145].

2013 yılında Karaaslan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise; alveolar hücre hattı olan A549 hücreleri, SERPINB3 ekspresyon plazmidi ile transfekte edilmiş ve MUC5AC gen ifadesini indüklediği bilinen NE, IL-4 ve IL-13 ile ayrı ayrı ve birlikte

olarak uyarılmıştır. Çalışma sonucunda SERPINB3 ekspresyon plazmidinin hücrelerde SERPINB3 ifadesini artırdığı ve tüm uyarım koşullarında MUC5AC ifadesini yüksek seviyede baskıladığı görülmüştür [146].

Bu bulgular doğrultusunda, alveolar hücre hattı olan A549 hücre hattı SERPINB3 ekspresyon plazmidi ve siRNA'sı kullanılarak transfekte edilmiş, ardından SERPINB3 ve MUC5AC ifadeleri incelenmiştir. Elde edilen çalışmalar tez çalışmasının hipotezinin geliştirilmesinde ön veri olarak kullanılmıştır. Ön verilere ait SERPINB3 ve MUC5AC ifadesi değişimleri Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9. A549 hücre hattında SERPINB3 ekspresyon plazmidini ve siRNA'sı ile elde edilen ön veriler. SERPINB3 ekspresyon plazmidini ile transfekte edilen hücre hattında SERPINB3 ve MUC5AC gen ifadesi değişimleri (A), Artan dozlarda SERPINB3 siRNA'sı ile transfekte edilen hücre hattında SERPINB3 ve MUC5AC gen ifadesi değişimleri

Alveolar hücre hattında gerçekleştirilen deneylerde, SERPINB3 ifadesinin artırıldığı koşullarda MUC5AC ifadesinin azaldığı ve SERPINB3 ifadesinin artan SERPINB3 siRNA dozu ile baskılandığı koşullarda MUC5AC ifadesinin arttığı tespit edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında, bakteri kültürü ve transformasyonu deneylerinde kullanılan malzemeler laboratuvar öz kaynaklarından karşılanmıştır. Bakteri kültürü ve transformasyon deneylerinde kullanılan malzemeler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bakteri kültür ve transformasyon deneylerinde kullanılan malzemeler

	Malzeme	Firma	Katalog numarası
Kültür ve Transformasyon	LB Broth	Sigma, ABD	L3022
	LB Agar	Sigma, ABD	A3147
	Gliserol	Sigma, ABD	N4662
	Amfisilin	Sigma, ABD	A5354
	S.O.C. Medium	Invitrogen, ABD	15544-034
	Invisorb Spin Plasmid Mini	Invitex, Almanya	1010140300
Kompetan Çözeltisi	Sodyum Asetat	Applchem, Almanya	A1522
	Kalsiyum Klorür Dihidrat	Applchem, Almanya	A3587
	Mangan Klorür Tetrahidrat	Applchem, Almanya	A2087

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan bronş epitel hücre hattı Calu-3 (katalog numarası: HTB-55) American Type Cultural Collection (Virginia, ABD) firmasından ticari olarak temin edilmiştir. Rekombinant IL-13 proteini (katalog numarası: 200-03-10UG) ThermoFisher (Massachusetts, ABD) firmasından temin edilmiştir. Transfeksiyon deneylerinde kullanılan SERPINB3 siRNA (katalog numarası: hs.Ri. SERPINB3.13.4) Integrated DNA Technologies (Iowa, ABD) firmalarından satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemelerin bilgileri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler

	Malzeme	Firma	Katalog numarası
Çoğaltma ve Pasaj	MEM	Gibco, ABD	11095080
	FBS	Gibco, ABD	10500064
	Penisilin/Streptomisin	Capricorn Scientific, Almanya	PS-B
	L-Glutamin	Sigma, ABD	G8540
	Trypsin-EDTA	Gibco, ABD	25200056
	DMSO	Applchem, Almanya	A3672
	Trypan Mavisi	ThermoFisher, ABD	15250061

Transfeksiyon	Lipofectamine 3000	ThermoFisher, ABD	L3000001
	OptiMEM	ThermoFisher, ABD	31985062
	PBS	Applichem, Almanya	A9162

Hücre ve bakteri kültürü deneylerinde kullanılan plastik malzemeler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Hücre ve bakteri deneylerinde kullanılan plastik malzemeler

	Malzeme	Firma	Katalog numarası
Çoğaltma ve Pasaj	24 kuyucuklu plaka	SPL, Kore	SPL30024
	T-25 flask	SPL, Kore	SPL70025
	T-75 flask	SPL, Kore	SPL70075
	T-150 flask	SPL, Kore	SPL70175
	15 mL Falkon tüp	SPL, Kore	SPL50015
	50 mL Falkon tüp	SPL, Kore	SPL50050
	Petri	SPL, Kore	10050

Hücre uyarımları veya transfeksiyon deneylerini takiben hücrelerden RNA ve protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinden cDNA çevrimi sonrasında, gen ifadeleri gerçek zamanlı PZR metodu ile ölçülmüştür. Hücrelerden izole edilen total RNA ve bu RNA'lar ile yapılan deneylerde kullanılan malzemeler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. RNA deneylerinde kullanılan malzemeler

	Malzemeler	Firma	Katalog numarası
Malzemeler	Purelink RNA mini kit	Invitrogen, ABD	12183018A
	cDNA sentez kiti	ThermoFisher, ABD	K1622
	PowerUP SyberGreen Master Mix	ThermoFisher, ABD	A25741

Hücrelerden izole edilen protein örneklerinin ise konsantrasyon ölçümlerinin ardından western blot metodu ile protein ifadeleri incelenmiştir. Tez kapsamında protein örnekleri ile gerçekleştirilen deneylerde kullanılan malzemeler Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Protein deneylerinde kullanılan malzemeler

	Malzemeler	Firma	Katalog numarası
Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	RIPA liziz Tamponu	Amresco, ABD	N653-100ML
	BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher, ABD	23225
	Proteaz inhibitör kokteyli	GLP BIO, ABD	GK10014
	Fosfataz inhibitör kokteyli	GLP BIO, ABD	GK10012
Western Blot	Akrilamid/Bis Solüsyonu	Serva, Russian	10687.01
	TEMED	Serva, Russian	35930.01
	Amonyum persülfat	VWR Chemicals, ABD	21300.260
	Sodyum dodesil sülfat	Merck, ABD	822050
	Tween-20	BioShop, Kanada	TWN508.100
	Hidroklorik Asit	Merck, ABD	1.00317
	İzopropanol Alkol	Carlo Erba, İtalya	415156
	Methanol	Sigma, ABD	32213
	Tris Baz	Amresco, ABD	0826-1KG
	Glisin	Carlo Erba, İtalya	453807
	Süt Tozu	Serva, Russian	42590.01
	Tris-Glisin Transfer Buffer	Life Technologies, ABD	LC3675
	Protein Ladder	GangNam-Stain, Kore	24052
	4x- leammli Buffer	BioRad, ABD	1610747
	2-Mercaptoethanol	Amresco, ABD	M431
	Sodyum Klorid	Amresco, ABD	0241-1KG
	ECL Substrat	BioRad, ABD	170-5061
	Nitroselüloz Membran	Serva, Rusya	71224.01

Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Western blot deneylerinde kullanılan antikorlar

	Malzemeler	Firma	Katalog numarası
Antikorlar	p-STAT-6 Primer Antikoru	SantaCruz, Bolivya	Sc-136019
	STAT-6 Primer Antikoru	SantaCruz, Bolivya	Sc-374021
	PDEF Primer Antikoru	SantaCruz, Bolivya	Sc-166846
	LC3 Primer Antikoru	SantaCruz, Bolivya	Sc-398822
	SERPINB3 Primer Antikoru	Abcam, İngiltere	Ab55733
	MUC5B Primer Antikoru	SantaCruz, Bolivya	Sc-21768
	MUC5AC Primer Antikoru	Abcam, İngiltere	Ab24070
	Beta-actin Primer Antikoru	Sigma, ABD	A5441

3.2 Ekspresyon Vektörünün Çoğaltılması Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler

3.2.1. Kompetan Bakterilerin Elde Edilmesi

Kompetan bakterilerin elde edilmesi amacıyla *Escherichia coli* bakterileri kalsiyum klorid yöntemi ile kompetan hale getirilmesinde aşağıdaki protokol izlenmiştir [147];

1. Deneyden 1 gün önce kompetan çözeltisi ve bakterilerin kültürleneceği LB broth hazırlanmıştır.

Kompetan Çözeltisinin Hazırlanışı;

- 40mM Sodyum Asetat
- 100mM Kalsiyum Klorür Dihidrat
- 70mM Mangan Klorür Tetrahidrat

Çözeltinin son hacmi 200 mL ve pH=5,5 olacak şekilde hazırlanmış ve 0,2 µm çapa sahip filtreden geçirilmiştir.

2. LB Broth hazırlanışı;

2 gr tartılan LB Broth, 100 mL distile su içerisinde karıştırılıp, 15 dakika boyunca 121°C sıcaklıkta otoklavlanmıştır. Otoklav süresinin bitmesini takiben *E. coli* bakterileri gece boyunca LB broth içerisinde kültüre alınmıştır.

3. Deney gününde; kültürlenmiş bakterilerden 300 µL alınıp 30 mL hacminde iki farklı LB Broth içerisine, 1/100 oranında seyreltilerek eklenmiştir.
4. 37 °C’ de 140 rpm ayarlı çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakılan bakteri kültürlerinden her 60 dakikada bir OD600 değeri ölçülmüştür.
5. OD600 değeri 0,4 değerine geldiğinde üreme sonlandırılmış ve bakteriler buz üzerinde 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon süresi sonunda bakteriler, 4°C ve 4.000 rpm ayarlı santrifüjde 10 dakika boyunca çöktürülmüştür. Ardından süpernatant atılarak, çökelti 20 mL soğuk kompetan çözeltisi ile süspanse edilmiştir.

7. Kompetan çözeltisi içerisinde çözündürülen bakteriler 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon süresi sonunda bakteriler, 4°C ve 4.000 rpm ayarlı santrifüjde 10 dakika boyunca çöktürülmüştür. Ardından süpernatant atılmış ve çökelti 1,5 mL soğuk kompetan çözeltisi ile süspanse edilmiştir.
9. Kompetan çözeltisi ile süspanse edilen hücrelere, son oran %15 olacak şekilde %80'lik gliserol eklenmiş ve kompetan hale getirilmiş hücreler, her bir tüpte 50 µL olacak şekilde 60 adet tüpe paylaştırılarak -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.2.2. Ekspresyon Vektörü Transformasyonu

SERPINB3 ekspresyon vektörünün çoğaltılması amacıyla kompetan bakterilere ısı şoku yöntemi ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. SERPINB3 Ekspresyon vektörü içerisinde amfisilin direnç geni taşıdığından, transforme edilmiş bakteriler amfisilinli agar içerisine ekilmiştir. [147]. Kompetan bakterilerin canlılık durumlarının gözlenmesi amacıyla amfisilin içermeyen bir agar içerisine ayrıca ekilmiştir.

Transformasyon için aşağıda belirtilen protokol takip edilmiştir;

1. Deney gününden 1 gün önce; 7gr LB Agar 200 mL distile su içerisinde karıştırılıp, 15 dk boyunca dakika 121°C sıcaklıkta otoklavlanmıştır. Agarın soğumasını takiben amfisilin içermeyen plakalar için agar plakalara direkt dökülmüş, amfisilin içeren plakalar için agarın içerisine son oran 1/1.000 olacak şekilde amfisilin eklenip, plakalara dökülmüştür.
2. -80°C'den çıkarılan kompetan hücreler buz üstünde çözündürülmüştür.
3. 50 µL kompetan hücre içine 2 µL SERPINB3 vektör DNA eklenip, tüpün altına nazikçe vurularak karıştırılmıştır.
4. Kompetan Hücre/vektör DNA karışımı 30 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edilmiştir.
5. Transformasyonun "ısı şoku" aşaması için 42°C ye ayarlı bir su banyosu içerisinde, Kompetan Hücre/vektör DNA karışımı 30 saniye boyunca inkübe edilmiştir.

6. Ardından tüpler tekrar 2 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon süresi sonunda tüplerin üzerinde Super Optimal Broth (S.O.C.) Media eklendikten sonra tüpler, 37 °C’de 200 rpm ayarlı çalkalayıcı inkübatörde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon süresi sonunda Kompetan ve SERPINB3 vektörü ile transfekte olan bakteriler Amfisilin içeren ve içermeyen LB agar plakalar üzerine ekilmiştir.
9. Bakteriler gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bakterilerin üremesi kontrol edilmiştir.

3.2.3. Plazmid İzolasyonu

SERPINB3 Ekspresyon vektörünün izolasyonu amacıyla kompetan bakterilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu laboratuvar öz kaynaklarında bulunan Spin Plasmid Mini Two kiti kullanılmış ve üretici firma tarafından sağlanan aşağıdaki protokole basamakları uygulanmıştır [148].

1. LB agarda kültürlenmiş bakterilerden koloni seçilmiş ve 10 mL LB broth içerisine ekilmiştir.
2. LB broth içerisindeki bakteriler, 37°C’de 100 rpm ayarlı çalkalayıcı inkübatörde 16 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon süresi sonunda, LB broth içerisindeki bakteriler 2 mL ependorlara paylaştırılmıştır.
4. Tüpler 12.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. Pelet üzerine kit içerisinde bulunan 250 µL solüsyon A eklenip pelet çözdürülmüştür.
6. Ardından tüplerin üzerine 250 µL solüsyon B eklenip ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
7. İnkübasyon süresinin bitiminde, tüplere 250 µL solüsyon C eklenmiş ve 12.000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.

8. Santrifüj süresi sonunda, tüplerde süpernatant alınmış ve kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılmıştır. Ardından kolonlar 11.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
9. Santrifüj süresi sonunda tüplerde kalan sıvı atılmış ve kolon içerisine 500 µL yıkama tamponu eklenmiştir. Ardından tüpler 11.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
10. Santrifüj süresi sonunda tüplerde bulunan sıvı atılmış ve kolon üzerinde 50 µL elüsyon tamponu eklenip ve 11.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Elüsyon basamağı 2 kez tekrarlanmıştır ve her bir tekrar farklı tüp içerisinde saklanmıştır.
11. Santrifüj sonunda tüp içerisinde plazmid elde edilmiştir. Plazmid izolasyonu sonunda 10 adet 50'şer µL plazmid elde edilmiştir.

3.3 Hücre Kültürü Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler

3.3.1 Hücrelerin Kültürlenmesi, Tripsinizasyonu ve Ekimi

İnsan bronşiyal epitelyal hücre hattı olan Calu-3 hücreleri içerisinde 1x Penisilin/Streptomisin ve %10 FBS bulunan EMEM besiyeri kullanılarak, 75 cm² flaskta, %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de inkübatörde kültürlenmiştir. Hücre uyarımı ve transfeksiyon için çoğaltılan hücreler, %80 kaplama oranına ulaştıktan sonra, hücrelerin tripsinizasyonu için 5 mL %0,25 Trypsin-EDTA eklenerek %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de inkübe edilmiştir. 5 dakika sonra tripsinin etkisinin nötrlenmesi için hücrenin kendi besiyeri (8-9 mL) kullanılmış ve toplanan hücreler 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti uygun besiyeri ile çözülmüştür. Tripan mavisi boyama yöntemiyle hücreler thoma lamında sayılmıştır.

Hücre sayımını takiben hücreler ileriki deneyler için 24 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Transfeksiyon deneyleri için hücreler 1,2x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ve uyarım deneyleri için hücreler 1,5x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır [149].

3.3.2. siRNA ve Ekspresyon Vektörü ile Transfeksiyon

24 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler %40-70 kaplama oranına ulaştığında transfeksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon deneyleri Lipofectamine 3000 Reagent

kullanılarak lipofeksiyon metodu ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler, üretici tarafından sağlanan aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır.

1. Solüsyon A hazırlamak için, son hacim 50 µl olacak şekilde siRNA veya ekspresyon vektörü, 3 µl P3000 reaktifi ve OptiMEM (transfeksiyon besiyeri) 1,5 mL Eppendorf tüp içerisine eklenerek pipetleme yöntemi ile karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
2. Solüsyon B hazırlamak için son hacim 50 µl olacak şekilde 1,5 µl Lipofectamine 3000 reaktifi ve OptiMEM, 1,5 mL Eppendorf tüp içerisine eklenerek pipetleme yöntemi ile karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. İnkübasyon süresinin bitiminde solüsyon A ve B aynı tüp içerisinde birleştirilerek vortekslenmiştir. Elde edilen solüsyon 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sürecinde, hücrelerden eski besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuk başına 500 µl transfeksiyon işleminin zarar görmemesi ve etkinliğinin azalmaması için antibiyotiksiz besiyeri eklenmiştir.
5. Solüsyonunun inkübasyon süresi tamamlandığında kuyucuk başına 100 µl eklenmiştir.
6. Plaka hafifçe sallanarak solüsyonun homojen dağılması sağlanmış ve 37°C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında SERPINB3-MUC5AC ilişkisinin incelenmesi amacıyla, SERPINB3 ifadesinin fazla olduğu ve SERPINB3 ifadesinin az olduğu bronş epitel hücrelerinde ilişkili gen ve proteinlerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda SERPINB3 ifadesini artıran ekspresyon plazmidi ve SERPINB3 ifadesini baskılayan siRNA’lar kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. SERPINB3 siRNA transfeksiyonu için, laboratuvar öz kaynaklarında bulunan SERPINB3 siRNA 13.1, IDT (katalog no: hs.Ri.SERPINB3.13.1) ve satın alınan SERPINB3 siRNA 13.4, IDT farklı konsantrasyonlarda ve ko-transfeksiyon şeklinde kullanılmıştır.

Optimizasyon deneyinde artan konsantrasyonlarda ekspresyon vektörü ve siRNA'lar kullanılmıştır. Transfeksiyonun optimizasyonu deneylerinde dizayn edilen koşullar aşağıdaki gibidir.

SERPINB3 ekspresyon vektörü transfeksiyon koşulları;

1. Uyarılmamış
2. SERPINB3 ekspresyon vektörü (1/100), 1 μ l
3. SERPINB3 ekspresyon vektörü (1/100), 2 μ l
4. SERPINB3 ekspresyon vektörü (1/10), 1 μ l
5. SERPINB3 ekspresyon vektörü (1/10), 2 μ l
6. SERPINB3 ekspresyon vektörü 1 μ l
7. SERPINB3 ekspresyon vektörü 2 μ l

SERPINB3 siRNA transfeksiyonu deneylerinde, siRNA'lar üretici firmanın talimatları doğrultusunda 1/10 seyreltilerek kullanılmıştır. SERPINB3 siRNA 13.1 ve SERPINB3 siRNA 13.4 olmak üzere 2 farklı siRNA hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanılarak etkinliklerinin gözlenmesi amaçlanmıştır.

SERPINB3 siRNA transfeksiyon koşulları;

1. Uyarılmamış
2. SERPINB3 siRNA 13.1, 1 μ l
3. SERPINB3 siRNA 13.1, 2 μ l
4. SERPINB3 siRNA 13.4, 1 μ l
5. SERPINB3 siRNA 13.4, 2 μ l
6. SERPINB3 siRNA 13.1, 1 μ l + SERPINB3 siRNA 13.4, 1 μ l (ko-transfeksiyon)
7. SERPINB3 siRNA 13.1, 2 μ l + SERPINB3 siRNA 13.4, 2 μ l (ko-transfeksiyon)

3.3.3. Hücre Uyarımı

24 Kuyucuklu plakaya ekilen hücrelerin %80-90 kaplama oranına ulaşmasını takiben hücre uyarımları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında hücreler IL-13 insan rekombinant proteini ile uyarılmıştır. Rekombinant protein 100 µM konsantrasyonda bulunmaktadır. Deney koşulları kapsamında, dozlar taze olarak rekombinant proteinden dilüsyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Uyarılmamış hücreler, içerisinde rekombinant protein bulunmayan normal besiyeri ile inkübe edilmiştir [150, 151].

3.4. Gen İfadesinin İncelenmesi Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler

3.4.1. RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Hücrelerin transfeksiyon veya uyarım sürelerinin sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu PureLink RNA Mini ile gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon aşamaları üretici firmanın protokolüne uygun şekilde uygulanmıştır [151].

1. Deneye başlamadan önce içerisinde her 1 mL TRK lizis solüsyonu için 20 µL beta-merkaptoethanol bulunan, TRK liziz tamponu hazırlanmıştır.
2. Transfeksiyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 350 µL liziz tamponu eklenmiştir.
3. Pipetle kazıma işlemi ile hücrelerin liziz edilmesi sağlanmış ve üzerlerine 350 µL %70 soğuk etanol eklenmiştir.
4. Elde edilen solüsyon vortekslenip, homojen bir şekilde karıştırılmış ve kolona aktarılmıştır.
5. Kolon 10.000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve altta biriken sıvı atılmıştır.
6. 500 µL 'yıkama tamponu 1' kolona eklenmiş ve 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Biriken sıvı uzaklaştırılmıştır.
7. 500 µL 'yıkama tamponu 2' kolona eklenerek 10.000 g'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Yıkama tampon 2 ile gerçekleştirilen bu işlem iki kere uygulanmıştır.

8. Biriken sıvı uzaklaştırıldıktan sonra yıkama tamponlarının kolondan tamamen uzaklaşması için kolon boş bir şekilde maksimum hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir.
9. Kolon steril bir 1,5 mL Eppendorf tüpe alınıp ve üzerine 40 µL elüsyon tamponu (RNAz içermeyen steril su) eklenmiştir.
10. Kolon maksimum hızda 1 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve Eppendorf tüpün içerisinde kalan RNA konsantrasyonu, Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. RNA izolasyonu ve konsantrasyon ölçümleri tamamlandıktan sonra, RNA örnekleri komplementer DNA sentezi deneyine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Gen ekspresyonunun gerçek zamanlı PZR yöntemi ile tespit edilebilmesi için RNA örneklerinden Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir [150].

1. Nanodrop ölçümü ile elde edilen RNA konsantrasyonları kullanılarak her bir koşıldan 250 ng RNA ve son hacim 11 µL olacak şekilde RNA örnekleri steril su ile PZR tüpü içerisinde hazırlanmıştır.
2. Hazırlanan PZR tüplerine 1 µL Oligo d(T) eklenmiştir.
3. PZR tüpleri 65°C'de 5 dakika boyunca PZR cihazında inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi bittiğinde her bir tüpe 8 µL reaksiyon karışımı (4 µL reaksiyon tampon, 2 µL dNTP, 1 µL Ribolock RI, 1 µL Ters Transkriptaz enzimi ilave edilmiştir.
5. Tüpler PZR cihazında 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika ve 1 döngüde tutulmuştur.
6. Sentezlenen cDNA örneklerinin konsantrasyonu Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

Tez çalışması kapsamında, cNDA sentezinin ardında SERPINB3 ve MUC5AC mRNA düzeyleri qPZR yöntemi ile incelenmiştir [150]. Gerçekleştirilen deney kapsamında internal kontrol olarak Peptidylprolyl Isomerase A (PIIA) gen ifadesine bakılmıştır.

1. Deney kapsamında ilk olarak cDNA örneklerinin konsantrasyonları birbirine eşitlenmiş ve gerekli seyreltmeler steril su ile gerçekleştirilmiştir.
2. Ardından qPZR plakalarına kuyucuk başına; 3 µL seyreltilmiş cDNA örneği, 5 µL 2X PowerUP SYBR Green Master Mix, 0,1 µL ileri primer, 0,1 µL geri primer ve 1,8 µL distile sudan oluşan karışım eklenmiştir. Bu aşamada kullanılacak olan primer dizileri Çizelge 3.7’de verilmiştir.

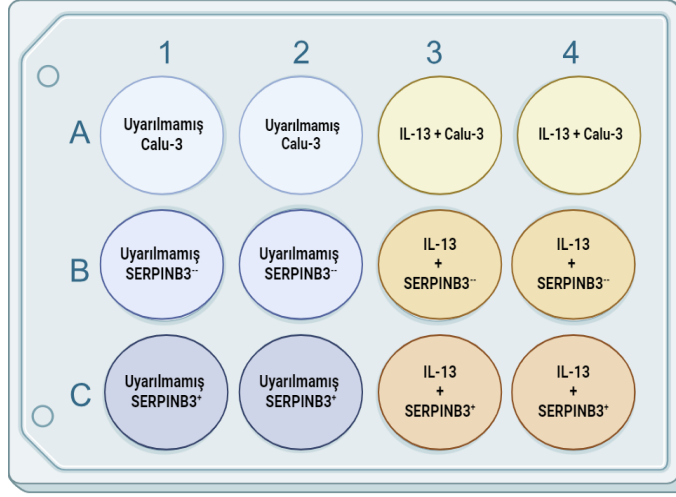
Çizelge 3.7. qPZR sırasında kullanılmış olan primer dizileri

Gen Adı	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (5'-3')
MUC5AC	TGTGCCTGCCTGTACAATGG	CCAGAACATGTGTTGGTGCAG
SERPINB3	TCCTGAAGGTAATATTGGCAGCA	TGTATTGCCTCATCATCTGTATG
PIIA	CATCCTAAAGCATACGGGTCC	TCTTTCACTTTGCCAAACACC

3. Reaksiyon koşulları 95°C’de 10 dk ısıyla aktivasyonu takiben 40 döngülük 95°C, 15 sn ve 60°C, 1 dk olacak şekilde ayarlanarak ABI 7500 Fast cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir.
4. qPZR deneyi 3 teknik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5 Transkriptom Analizi

Calu-3 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen IL-13 ve transfeksiyon koşullarının optimizasyonunu takiben hücrelerden transkriptom analizleri için RNA örnekleri elde edilmiştir. Transkriptom analizi için mRNA dizileme hizmet alımı ile GENOKS Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi firmasında gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonrası örneklere ait fasta dosyaları ve ham verilerin kalite raporları temin edilmiştir. Transkriptoma gönderilen koşullar Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Transkriptom analizinde incelenen koşullar, SERPINB3⁻: SERPINB3 ifadesi susturulmuş Calu-3, SERPINB3⁺: SERPINB3 ifadesi artırılmış Calu-3

3.5.1 Kalite Kontrolü

Ham verilerin kalite kontrolleri FASTQC yazılımı ile yapılmıştır [152]. Okumalar fastq formatında verilmiş olup, FASTQC varsayılan parametreleri ile gerçekleştirilmiştir. FASTQC ile kalite raporlarında; temel istatistikler, baz başına dizileme kalitesi, dizileme başına kalite skorları, baz başına dizileme içeriği, dizileme başına Guanine-Sitozin içeriği, baz başına N içeriği, dizileme uzunluk dağılımı, Aşırı temsil edilen diziler ve adaptör içeriği incelenmiştir.

```
$fastqc fastq/dosya_dizini/*.fastq.gz
```

3.5.2 Okumaların STAR ile Hizalanması

Okumaların referans genomu hizalanması amacıyla STAR yazılımı kullanılmıştır [153]. Hizalama için uygun referans genom ve uygun anotasyon dosyaları ENSEMBL sitesinden indirilmiştir (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index). Referans genom ve anotasyon dosyasının indirilmesini takiben, referans genom indeksi dosyası oluşturulmuştur. Oluşturulan indeks dosyası ile her örneğe ait okumalar hizalanmıştır. Hizalamada varsayılan parametreler kullanılmış ve hizalama çıktı dosyaları kaydedilmiştir.

```
STAR --runMode genomeGenerate --runThreadN 110 \  
--genomeDir /indeks/kayıt/dosyası/star_index --genomeFastaFiles /referans/genom/dosyası/  
--sjdbGTFfile /anotasyon/dosyası/anotasyon.gtf --sjdbOverhang 149
```

```
STAR \  
--runThreadN 110 \  
--outReadsUnmapped Fastx \  
--outSAMtype BAM SortedByCoordinate \  
--outSAMunmapped Within \  
--readFilesCommand zcat \  
--genomeDir $GENOME_DIR \  
--readFilesIn $R1_FILE $R2_FILE \  
--outFileNamePrefix $OUTPUT_DIR/${SAMPLE_NAME}_
```

3.5.3 FeatureCounts ile Sayım Matrisi Oluşturulması

Hizalama sonrasında, kordinatlara göre hizalanmış okumalara ait bam formatında elde edilmiştir. Hizalanmış bam dosyaları, FeatureCounts yazılımı kullanılarak gen seviyesinde sayım matrisi oluşturulmuştur [154]. FeatureCounts varsayılan parametreler kullanılarak çalıştırılmıştır. Sayım matrisi çıktısı, .txt formatında elde edilmiştir.

```
featureCounts -T 110 \  
-a /anotasyon/dosyası/anotasyon.gtf  
-o /çıkıtlı/dosyası/sayım_matrisi.txt \  
-p \  
/hizalanmış/okuma/dosyası/*.bam
```

3.5.4 DESeq2 ile Diferansiyel Gen Ekspresyon Analizi

Sayım matrisinde elde edilen ham okumaların RNA-seq analizi, DESeq2 paketi ile R’da gerçekleştirilmiştir [155]. DESeq2 paketi, her bir örneğe ait kütüphane derinliğini hesaplayarak, gen başına normalize edilmiş değerler türetir ve log2 kat değişimi, p-değeri gibi metrikleri bu normalize değerler üzerinden türetmektedir. Diferansiyel gen ekspresyon analizinde koşullar aşağıdaki gibi ikili olarak karşılaştırılmıştır.

- 1- Uyarılmamış X SERPINB3 Ekspresyon Vektörü
- 2- Uyarılmamış X SERPINB3 siRNA
- 3- Uyarılmamış X IL-13 Uyarımı

4- IL-13 Uyarımı X IL-13 Uyarımı + SERPINB3 Ekspresyon Vektörü

5- IL-13 Uyarımı X IL-13 Uyarımı + SERPINB3 siRNA

Her bir karşılaştırma için sayım matrisi içerisinde ilgili örnekler seçilmiş ve uygun metadata tabloları hazırlanmıştır.

```
metadata <- data.frame(  
  condition = factor(c("koşul1", "koşul1", "koşul2", "koşul2" )))  
rownames(metadata) <- colnames(sayım_matrisi)
```

Uygun sayım matrisi ve metadatanın oluşturulmasını takiben, DESeq2 için uygun veri formatı oluşturulmuştur. Düşük ham okuma sayısına sahip genler, <5, filtrelenmiş ve RNA-seq modeli kurulmuştur.

```
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = sayım_matrisi,  
                              colData = metadata, design = ~ condition)  
  
keep <- rowSums(counts(dds) >= 5) > 3  
dds <- dds[keep, ]  
dds <- DESeq(dds)
```

3.5.5 Temel Bileşen, Volkan ve Isı Haritası Grafikleri

Her bir karşılaştırma grubu için elde edilen RNA-seq modellerinden temel bileşen, Volkan ve ısı haritası grafikleri çizilmiştir.

Temel bileşen analizi için, varyans stabilize edici dönüşüm değerleri (VST) hesaplanmış ve grafik bu değerler üzerinden çizilmiştir. Temel bileşen analizi grafiğinde, ham okumaların normalize edilmemiş olmaları ve normalizasyon sonrasında bazı genlerin bazal koşullarda bile yüksek ifade olması sebebiyle, değişkenliği temel bileşen analizi için uygun normal dağılıma yaklaştıran VST değerleri ile çizim yapılmıştır. Grafik çizimi “ggplot” kütüphanesi ile gerçekleştirilmiştir.

```

vsd <- vst(dds, blind = FALSE)
pca_data <- plotPCA(vsd, intgroup = "condition", returnData = TRUE)
percentVar <- round(100 * attr(pca_data, "percentVar"))

ggplot(pca_data, aes(PC1, PC2, color = condition)) +
  geom_point(size = 4, alpha = 0.8) +
  xlab(paste0("PC1: ", percentVar[1], "% Variance")) +
  ylab(paste0("PC2: ", percentVar[2], "% Variance")) +
  ggtitle("Başlık") +
  theme_bw(base_size = 14) +
  theme(legend.position = "top",
        plot.title = element_text(hjust = 0.5, size = 16))

```

Volkan grafiği, RNA-seq analizi yapılmış genlerin dağılımlarını göstermek için kullanılmaktadır. Grafik çiziminde $|\text{Log2katdeğişimi}| > 1$ ve $\text{padj} < 0.05$ olan genler istatistiki olarak anlamlı artış veya azalış gösteren genler olarak belirlenmiştir. Volkan grafiği “EnhancedVolcano” kütüphanesi ile çizilmiştir.

```

EnhancedVolcano(res,
  lab = res$symbol,
  x = 'log2FoldChange',
  y = 'padj',
  xlim = c(-5,5),
  ylim = c(0,10),
  pCutoff = 0.05,
  FCcutoff = 1,
  labSize = 4.0,
  title = 'Başlık',
  subtitle = 'Differential Expression Analysis',
  caption = 'Thresholds: log2FC > 1 & padj < 0.05',
  pointSize = 2.0,
  colAlpha = 0.8,
  legendLabels = c("NS", "Log2FC", "p-adj", "Both"),
  legendPosition = "right",
  drawConnectors = TRUE,
  widthConnectors = 0.5)

```

Isı haritası, koşullar arası en fazla artan veya azalan genlerin artış miktarlarını göstermek için kullanılan bir dağılım grafiğidir. Isı haritası oluşturmada ileri filtreleme yapılmıştır. Tüm örneklerin için normalize okumalar > 5 olan, p-adj istatistiği < 0.05 olan, $\text{log2katdeğişimi} > 1$ olan genler filtrelenerek ısı haritası çizilmiştir.

3.6. Protein İfadelerinin İncelenmesi Kapsamında Gerçekleştirilen Deneyler

3.6.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Hücrelerin transfeksiyon veya uyarmı sürelerinin sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir [149].

Protein izolasyonu için aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

1. Transfeksiyon süresinin sonunda hücreler plaka ile buz üstüne alınmıştır.
2. Buz üstündeki hücreler soğuk PBS ile 3 kere yıkanmıştır.
3. Hücrelerin üzerine 1/100 oranında proteaz inhibitör kokteyli, 1/100 oranında fosfataz inhibitör kokteyli ve RIPA liziz tamponu karıştırılarak hazırlanan tampondan hücre sayısına göre uygun miktarda eklenmiştir.
4. Hücreler, buz üzerinde 15 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir.
5. Süre sonunda plakalardan örnekler kazınarak toplanmış ve ardından +4°C santrifüjde 15 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür.
6. Santrifüj sonrasında süpernatantta kalan proteinler steril bir tüpe aktarılmıştır.

İzole edilen hücrelerden protein miktar tayini BCA Protein Assay Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein izolasyonu için üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilmiştir.

1. Kit içerisinde bulunan 2 mg/mL konsantrasyona sahip stok BSA kullanılarak, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 200 µg/mL konsantrasyonda standartlar hazırlanmıştır.
2. İzole edilen protein örnekleri, kitin çalışma aralığına girebilmesi için 100 kat seyreltilmiştir. Örnek ve standart seyreltmelerinde ultra saf su kullanılmıştır.
3. Örnekler ve standartlar 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 150 µL olacak şekilde, 2 tekrarlı olarak eklenmiştir.
4. Kit içerisinden çıkan MA, MB ve MC solüsyonları 25:24:1 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
5. Çalışma solüsyonu kuyucuk başına 150 µL olacak şekilde, örneklerin ve standartların üzerine eklenmiştir.
6. Plakanın üzeri kapatılmış ve 37°C ayarlı etüvde 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.

7. İnkübasyon süresinin sonunda plaka 562 nm’de mikrolaka okuyucu kullanılarak okutulmuştur.

3.5.2. Protein İfadelerinin Western Blot ile İncelenmesi

Hücrelerden izole edilen proteinlerin miktar tayininin yapılmasını takiben, koşullar arası protein ifadeleri western blot ile analiz edilmiştir [146]. Western blot deneylerinde aşağıda belirtilen protokol takip edilmiştir;

1. Deneyin ilk aşamasında SDS-Poliakrilamid jel, ayırıcı (seperating) ve istifleyici (stacking) olmak üzere iki ayrı jel formunda hazırlanmıştır.

Ayırıcı (seperating) jel; 5 mL %30 akrilamid/%8 bisakrilamid, 3,75 mL 1,5 M Tris-HCl pH:8.8, 100 µL %10 sodyum dodesil sülfat (SDS), 30 µL %10 amonyum persülfat (APS), 15 µL tetrametiletilendiamin (TEMED) ve 6,25 mL distile su ile hazırlanmıştır.

İstifleyici (stacking) jel; 1 mL %30 akrilamid/%8 bisakrilamid, 1,25 mL 0,5 m Tris-HCl pH:6.8, 100 µL %10 SDS, 30 µL %10 APS, 15 µL TEMED ve 3,05 mL distile su ile hazırlanmıştır.

2. Western blot kaset sistemine ayırıcı jel dökülmüş, üzeri izopropanol ile kapatılmıştır. Ayırıcı jelin polimerleşmesinin ardından istifleyici jel hazırlanarak dökülmüş ve kuyucuk oluşumu için ise istifleyici jel döküldükten sonra tarak yerleştirilmiştir.

3. Yürütülecek olan örnekler, her bir kuyucuğa 10 µg olacak şekilde hesaplanmıştır ve son konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde PBS ve Boya ile karıştırılmıştır. Boya olarak, %0.01 SDS ve %10 Betamercaptoethanol içeren 4x Leammli Buffer (BioRad, 1610747) ile kullanılmıştır. Ardından örnekler 95 °C 5 dakika boyunca denatüre edilmiştir.

4. Hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra, 15 dakika boyunca 70 V’da ve yaklaşık 60 dakika 100 V’da yürütülmüştür. Yürütme sonunda jel kasetten dikkatli bir şekilde çıkarılarak membrana transfer işlemi için transfer kaset sistemine aktarılmıştır.

5. Transfer aşaması için; metanol içerisinde bekletilen süngerler, kurutma kâğıdı, jel, aktive edilmiş membran, tekrar kurutma kâğıdı ve sünger şeklinde bir sandviç hazırlanarak cihaza yerleştirilmiştir. Aktarım sistemine uygun miktarda tampon çözelti koyulmasıyla birlikte 20 V'da 1,5 saat boyunca aktarım yapılmıştır.

6. Sürenin ardından membran bir kap içerisine alınmış ve 20 mL TBS-T ile 160 rpm çalkalayıcıda 5 dakika boyunca 3 tekrarlı olarak yıkanmıştır. Ardından membran 20 mL %5 BSA içeren bloklama solüsyonu içerisinde ve 160 rpm çalkalayıcıda 1,5 saat inkübe edilmiştir.

7. Bloklama aşamasından sonra 20 mL TBS-T ile 160 rpm çalkalayıcıda 5 dakika süreyle 3 tekrarlı olarak yıkama yapılmıştır. Sonraki aşamada yıkanmış olan membran gece boyunca +4°C'de, primer antikor ile inkübe edilmiştir. Kontrol proteini olarak Beta-Aktin (1:5.000) primer antikoru kullanılmıştır.

8. Süre sonunda primer antikor ortamdan uzaklaştırılmış ve 20 ml TBS-T ile 160 rpm çalkalayıcıda 5 dakika boyunca 3 tekrarlı olarak yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrasında Anti-Mouse IgG (1:10.000) sekonder antikorunu membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 160 rpm çalkalayıcıda 1,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından sekonder antikor membrandan uzaklaştırılmış ve yıkama yapılmıştır.

Yıkamanın ardından 1:1 oranında Peroksit solüsyonu ve Luminal Enhancer Solüsyonu hazırlanarak, membranın üzerine koyulmuş ve 5 dakika beklemenin ardından, ChemiDoc™ (Bio-Rad Laboratories) görüntüleme sisteminde görüntü alınmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama olarak standart sapma ile birlikte verilmiş ve her deney grubundan elde edilen sonuçlar uygun istatistiksel analiz metodu ile GraphPad Prism 10 kullanılarak değerlendirilmiştir. Veri dağılımına bağlı olarak, ikili grupların karşılaştırılmasında Student t-testi veya Mann-Whitney U testi, üç ve fazlası grupların karşılaştırılmasında ise One-way ANOVA veya Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Zaman ve dozun birlikte etkisinin değerlendirileceği deneylerde Two-way ANOVA kullanılmıştır. İstatistiksel testlerden elde edilen $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. SERPINB3 Ekspresyon Vektörünün Çoğaltılması ve İzolasyonu

4.1.1. Kompetan Bakterilerin Elde Edilmesi

SERPINB3 ekspresyon vektörünün çoğaltılması amacıyla *E. coli* bakterileri kalsiyum klorid yöntemi ile kompetan hale getirilmiştir. Kompetan hale getirilen bakteriler, SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transfekte edilmiş ve ardından bakterilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

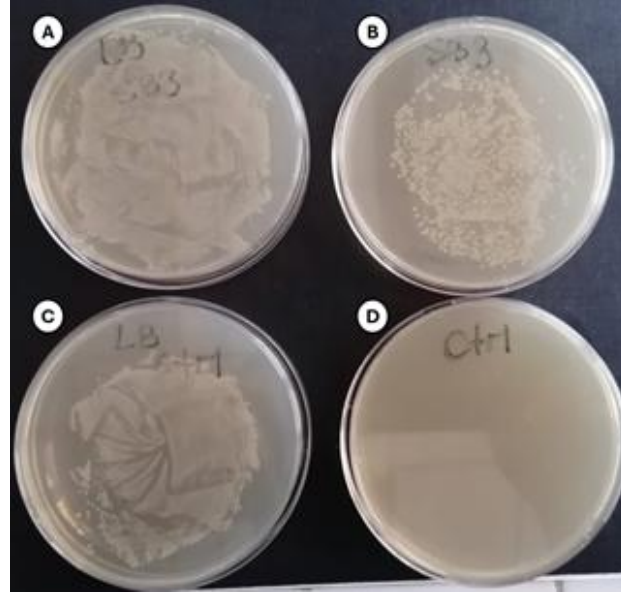
Kompetan bakterilerin elde edilmesi sürecinde *E. coli* bakterilerinin OD600 değeri 400'e ulaştığında kompetan çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Bakteriler 2'li tekrar şeklinde kültürlenmiştir. Kültürlerin kompetan çözeltisine alınmadan önce ölçülen OD değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Zamana bağlı değişen *E. coli* OD600 değerleri

	Kültür 1	Kültür 2
1. Ölçüm	132 OD	145 OD
2. Ölçüm	220 OD	285 OD
3. Ölçüm	383 OD	405 OD

4.1.2. SERPINB3 Ekspresyon Vektörü ile Transformasyon

SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme edilen kompetan bakteriler amfisilinli seçici agar ve normal agar besiyerine ekilmiştir. Ertesi gün bakterilerin üremesi kontrol edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Transformasyonun kontrolü, ekspresyon vektörü ile transforme edilmiş bakteriler, normal agar (A) ve amfisilin içeren agar (B). Transforme edilmemiş bakteriler, normal agar (C) ve amfisilinli agar (D)

Amfisilin içermeyen LB Agara ekilen ve SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme edilmiş bakteriler Şekil 4.1 (A)'da gösterilmiştir. Amfisilin içeren LB Agara ekilen ve SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme edilmiş bakteriler Şekil 4.1 (B)'de gösterilmiştir. Amfisilin içermeyen LB Agara ekilen ve herhangi bir vektör ile transforme edilmemiş kompetan bakteriler Şekil 4.1 (C) ve amfisilin içeren LB Agara ekilen ve herhangi bir vektör ile transforme edilmemiş kompetan bakteriler Şekil 4.1 (D) gösterilmiştir.

SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme edilen bakterilerin hem amfisilin içeren hem de amfisilin içermeyen ortamda çoğalması, transformasyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda hücrelerin kompetan özelliği kazandığını göstermektedir. SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme edilmeyen bakterilerin ise yalnızca amfisilin içermeyen agar ortamında çoğalması, amfisilinli agarın seçici ortam olarak başarılı olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme olan ve amfisilinli agar içerisinde çoğalma gösteren bakterilerden (Şekil 4.1 (B)) koloni seçilerek, bu kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Bakterilerden Plazmid İzolasyonu

SERPINB3 ekspresyon vektörü ile transforme edilen bakterilerde koloni seçilerek plazmid izolasyonu için LB Broth içerisinde çoğaltılmıştır. Hücrelerin çoğalmasını takiben hücrelerden Spin Plasmid Mini Two, kiti kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmid izolasyonu sonunda 10 adet 50'şer µL plazmid elde edilmiştir. Plazmid konsantrasyonları Nanodrop (Quawell, Q3000) ile ölçülmüş olup, Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. İzolasyon sonrası elde edilen plazmid konsantrasyonları

Plazmid Tüp No	Konsantrasyon(ng/mL)	A260/280	A260/230
1	39,14	1,94	1,84
2	86,64	1,76	1,59
3	120,5	1,75	1,71
4	107,66	1,88	1,60
5	354,62	1,47	0,91
6	385,59	1,34	0,98
7	104,69	1,87	1,59
8	72,13	1,54	1,44
9	35,79	1,75	1,45
10	209,64	1,46	0,75

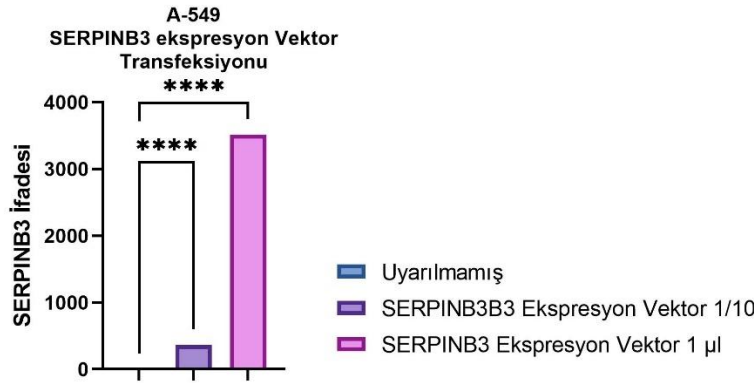
Plazmid izolasyonu ve konsantrasyon ölçümlerini takiben, tez çalışmasında kullanılacak olan SERPINB3 ekspresyon vektörü elde edilmiştir. Ekspresyon vektörünün etkinliği ileriki çalışmalarda gen ve protein seviyesinde incelenmiştir.

4.2. Gen İfadesi Değişimlerinin Analizi Kapsamında Elde Edilen Sonuçlar

4.2.1. SERPINB3 Ekspresyon Vektörünün Etkinliği

SERPINB3 ekspresyon vektörünün etkinliği ilk olarak, bronş epitel hücre hattı olan A549 hücrelerinde test edilmiştir. İzole edilen ve konsantrasyonu ölçülen plazmidlerden, konsantrasyon (104,69 ng/mL) ve saflık derecesi (A260/280=1,87 ve A260/230=1,59) göz önünde bulundurularak 7 numaralı tüp seçilmiş ve transfeksiyon denemelerinde kullanılmıştır.

Ekspresyon Vektörünün etkinliğinin ölçülmesi kapsamında, A549 hücreleri RPMI besiyeri içinde kültürlenmiş ve 24 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Ekspresyon vektörü 1/10 seyreltilmiş ve hiç seyreltilmeyen koşullarda 24 saatlik transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve SERPINB3 gen ifadesi qPZR ile tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. İzole edilen plazmidlerin etkinlik kontrolü **** $p < 0,0001$

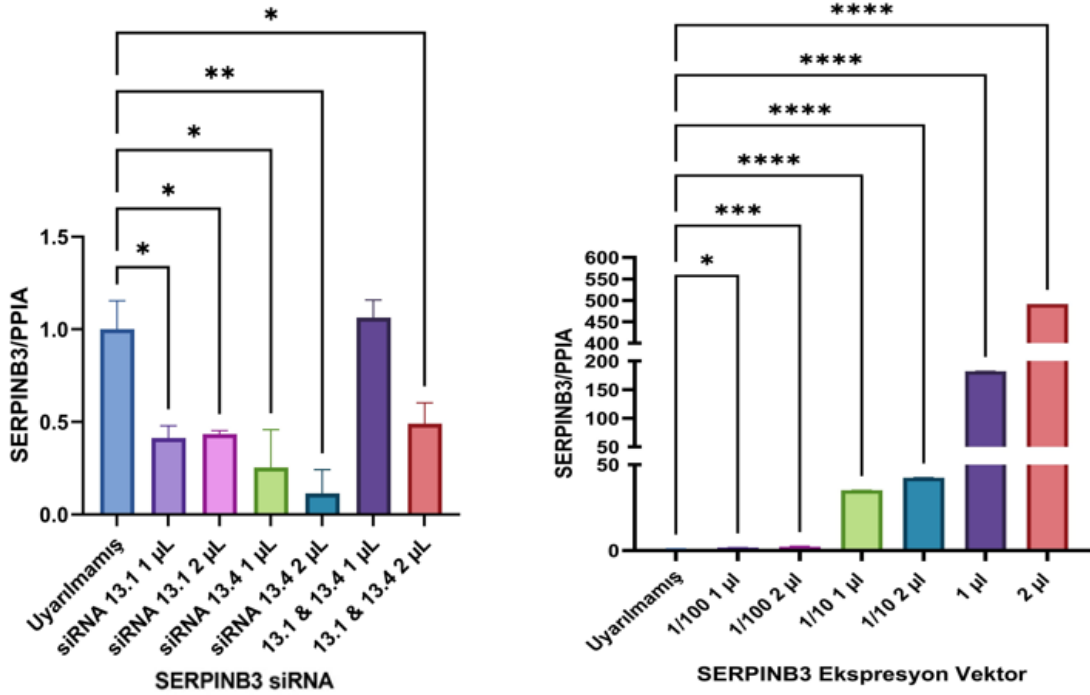
SERPINB3 vektörünün 1/10 seyreltilmiş hali yaklaşık 300 kat ve seyreltilmemiş hali yaklaşık 3,500 kat SERPINB3 gen ifadesini artırmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, izole edilen 7 numaralı plazmid tüpü tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.2.2. Transfeksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Tez çalışması kapsamında kullanılacak olan SERPINB3 ekspresyon vektör ve siRNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi amacıyla transfeksiyonun optimizasyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1 SERPINB3 Ekspresyon Vektörü ve siRNA ile Transfeksiyonun Optimizasyonu

Koşullar arası SERPINB3 ifadesinin incelendiği qPZR deneyine ait sonuçlar Şekil 4.3.’te verilmiştir.



Şekil 4.3. SERPINB3 siRNA ve ekspresyon vektörü transfeksiyonu sonucunda SERPINB3 ifadesi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$

İstatiksel olarak anlamlı değişim gözlenen koşullar incelendiğinde;

SERPINB3 siRNA transfeksiyon koşullarında;

- SERPINB3 siRNA 13.1, 1 µL ve 2 µL koşulları SERPINB3 ifadesini yaklaşık %60 ($p<0,05$),
- SERPINB3 siRNA 13.4, 1 µL koşulu SERPINB3 ifadesini yaklaşık %80 ($p<0,05$),
- SERPINB3 siRNA 13.4, 2 µL koşulu SERPINB3 ifadesini yaklaşık %85 ($p<0,01$) azaltmıştır.
- SERPINB3 siRNA 13.1 ve 13.4, 2 µL koşulu SERPINB3 ifadesini yaklaşık %50 ($p<0,05$) azaltmıştır

SERPINB3 ekspresyon vektör koşullarında;

- 1/100 1 µL ekspresyon vektörü, SERPINB3 ifadesini 1,78 kat ($p<0,05$),
- 1/100 2 µL ekspresyon vektörü, SERPINB3 ifadesini 2,24 kat ($p<0,001$),
- 1/10 1 µL ekspresyon vektörü, SERPINB3 ifadesini 35,19 kat ($p<0,0001$),
- 1/10 2 µL ekspresyon vektörü, SERPINB3 ifadesini 42,35 kat ($p<0,0001$),
- 1 µL ekspresyon vektörü, SERPINB3 ifadesini 182,28 kat ($p<0,0001$),

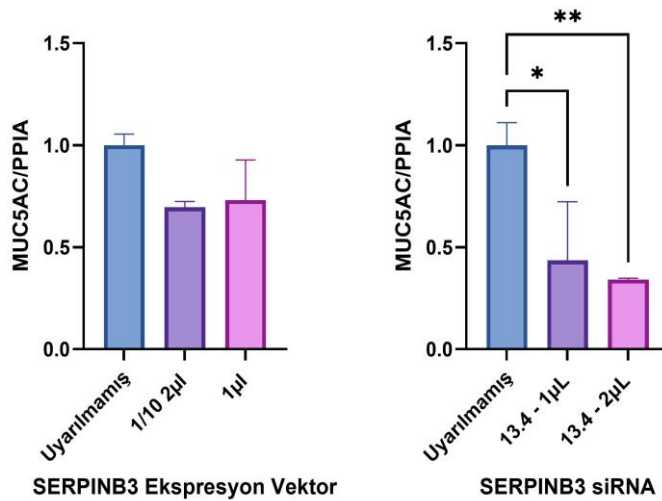
- 2 µL ekspresyon vektörü, SERPINB3 ifadesini 491,67 kat ($p<0,0001$) arttırmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde, SERPINB3 siRNA'larının birlikte kullanıldığı ko-transfeksiyon koşullarında, SERPINB3 ifadesinin değişmediği veya azalmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde SERPINB3 siRNA 13.1 ile yapılan transfeksiyon koşullarında, SERPINB3 ifadesi yaklaşık %50 düşmesine rağmen bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlılık vermemiştir. SERPINB3 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş yalnızca SERPINB3 siRNA 13.4 koşullarında (%80 ve %85) görülmüştür.

SERPINB3 ekspresyon vektörü ile yapılan transfeksiyon koşullarında ise ekspresyon vektörünün konsantrasyona bağlı olarak SERPINB3 ifadesini artırdığı görüşmüştür.

4.2.2.2 Seçilen Koşullarda MUC5AC İfadesinin İncelenmesi

Transfeksiyonun optimizasyonu kapsamında, istatistiksel olarak anlamlı SERPINB3 ifadesini baskılayan ve artıran koşullar için MUC5AC gen ifadesi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Transfeksiyon 2 seçilen koşullarda MUC5AC gen ifadesi koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * $p<0,05$, ** $p<0,01$

MUC5AC gen ifadesi incelendiğinde, SERPINB3 ifadesini sırasıyla 30 ve 139 kat artıran ekspresyon vektör 1/10 2 µL ve 1 µL koşulları, MUC5AC ifadesini yaklaşık %20 düşürmüştür. Ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. SERPINB3 ifadesini sırasıyla %60 ve %70 düşüren siRNA 13.4 1 µL ve 2 µL koşulları ise MUC5AC ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık %60 düşürmüştür.

SERPINB3 gen ifadesinin arttığı koşullarda MUC5AC gen ifadesinin azalması, laboratuvarımızda bronşiyal epitel hücre hattı olan A549 ile yapılan deneyler ile uyumlu olarak bulunmuştur. Ancak literatürde SERPINB3 ve MUC5AC ifadesinin serpinb3a- geni eksik fare modeli ile yapılan çalışma ile laboratuvarımızda yapılan öncü deneylerde A549 hücre hattının siRNA ile transfekte edildiği koşullarda MUC5AC gen ifadesinin arttığı bulunurken, tez çalışması kapsamında kullanılan bronş epitel hücre hattında bu durum gözlenmemiştir.

SERPINB3 ifadesinin baskılandığı koşullarda azalan MUC5AC ifadesi ise bronşiyal epitel hücreleri ile gerçekleştirdiğimiz öncü deneyler ile uyumlu gözükmemektedir. Tez çalışmasında karşılaşılan bu durum literatürde SERPINB3-MUC5AC arasındaki ilişkiyi inceleyen diğer bir çalışmanın sonuçları uyuşmaktadır. Literatürde fareler üzerinde yapılan çalışmada SERPINB3 geni eksik fare ırkı üzerinde alerjik astım modeli geliştirilmiş ve IL-13 uyarım koşullarında SERPINB3 geni eksik farelerde MUC5AC ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Transfeksiyonun optimizasyonu kapsamında gerçekleştirilen deney sonuçları incelendiğinde; SERPINB3 ekspresyon vektörünün konsantrasyona bağlı olarak SERPINB3 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı gösterilmiştir. SERPINB3 siRNA transfeksiyon koşullarında ise siRNA'ların (13.1 ve 13.4) ayrı ayrı transfekte edildiği koşullarda SERPINB3 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda transfeksiyonun optimizasyonu tamamlanmış olup, tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde SERPINB3 ifadesinin düşürülmesi için SERPINB3 siRNA 13.4 2 µL ve SERPINB3 ifadesinin artırılması için ekspresyon vektörü 1/10 2 µL koşullarının kullanılması kararlaştırılmıştır.

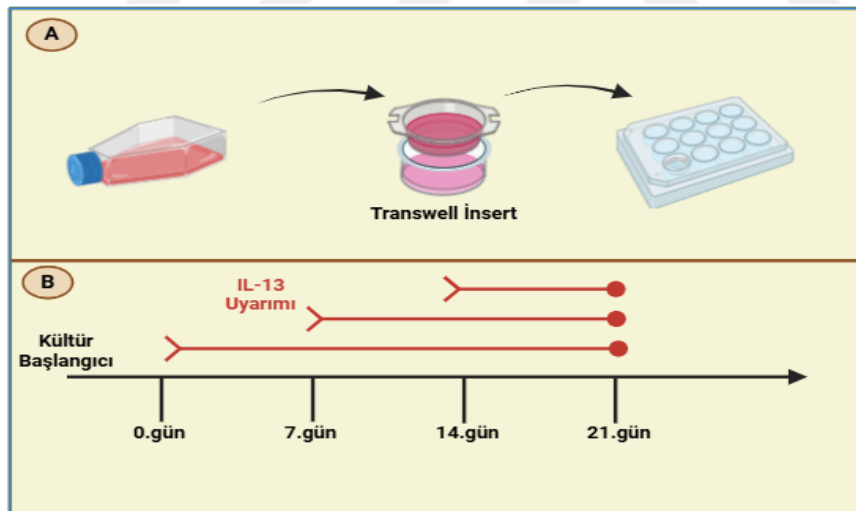
4.2.3. IL-13 Doz ve Saat Optimizasyonları

Tez çalışması kapsamında, alerjik astım fenotipinde MUC5AC ifadesini artıran IL-13 sitokini kullanılarak MUC5AC ifadesinin indüklenmesi amaçlanmıştır. Bronş epitel hücre hattı olan Calu-3 hücrelerinde, tek tabaka kültür ortamında MUC5AC ifadesini artıran IL-13 doz ve saatinin bulunması için literatür bilgisi göz önünde bulundurularak 3 farklı IL-13 doz ve saat optimizasyonu deneyi gerçekleştirilmiştir.

Literatürde, IL-13 MUC5AC ifadesini ve goblet hücre fenotipine farklılaşmayı güçlü bir şekilde indükleyen bir sitokin olarak belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı hücre

tiplerinde ve kültür modellerinde çeşitli IL-13 uyarım koşullarının MUC5AC ifadesini indüklediği raporlanmıştır. Bu koşullar arasında en yaygın olarak kullanılan model kronik IL-13 uyarım modelidir [156].

Kronik IL-13 uyarım modeli, bronş epitel hücrelerinin farklılaşmasını indüklediği bilinen 3D bir model olan hava-sıvı arayüz modelinde gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin hava-sıvı arayüz modelinde, akciğer fizyolojisine sahip bir ortamda kültürlenmesi ile sıkı bağlantılarının ve mukus üretiminin arttığı bilinmektedir. Kısaca, hücreler kültürlenip çoğaldıktan sonra transwell insert adı verilen bir membran üzerine ekilir ve hem alt hem üst taraftan besiyeri ile beslenir. Hücrelerin membran yüzeyini kaplamasını takiben, akciğerleri taklit edecek şekilde, hücrelerin apikal yüzeyinden besiyeri çekilir ve hücreler apikal taraftan hava ile karşılaşırken bazal taraftan besiyeri ile beslenir (Şekil 4.5 (A)). Bu aşama modelin 0. Günü olarak tanımlanır ve hücreler 7-14 veya 21 gün boyunca bazal taraftan beslenir. Kronik IL-13 uyarım modeli ise, hava-sıvı arayüz modeli boyunca hücrelerin belli aralıklar ile bazal taraftan IL-13 ile uyarıldığı ve goblet hücre fenotipine farklılaşmanın indüklendiği bir model olarak kullanılmaktadır (Şekil 4.5 (B)).



Şekil 4.5. Kronik IL-13 uyarım modeli

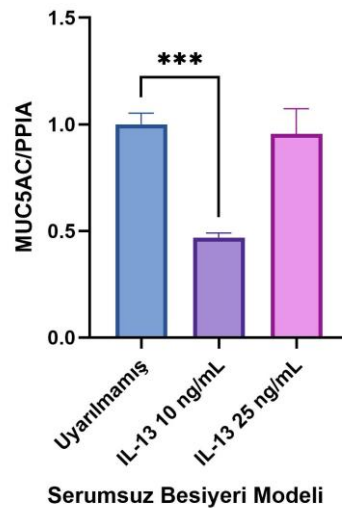
Bu model literatürde birçok farklı çalışma tarafından MUC5AC ifadesi ve ilişkili yolların incelenmesi kapsamında kullanılmasına rağmen gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında uygun bir model değildir. Tez çalışması kapsamında hücrelerin SERPINB3 ekspresyon plazmidi ve siRNA'sı ile transfekte edilmesi amaçlanmıştır. Ekspresyon vektörü veya siRNA'nın hücrelerin genomunda kalıcı bir değişikliğe sebep olmayan

transfeksiyon türleri olması sebebiyle, transfeksiyonun etkinliği 7-14 veya 21 gün gibi uzun süre devam edememektedir. Dolayısıyla tez çalışması kapsamında geçici gerçekleştirilen transfeksiyon koşulları ile kronik IL-13 modelinin kurulması uygun görülmemiştir. MUC5AC ifadesini artıran IL-13 doz ve saatinin bulunması amacıyla literatürde kullanılan diğer uyarım modelleri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.1. IL-13 Doz ve Saat Optimizasyon için Serumsuz Besiyeri Modeli

Literatürde kullanılan ve MUC5AC ifadesini etkili bir şekilde artırdığı belirtilen diğer bir model ise hücrelerin IL-13 uyarımından önce serumsuz besiyeri ile 24 saat inkübe edildiği serumsuz besiyeri modelidir [96, 157]. Serum içerisinde bulunan EGF gibi büyüme faktörlerinin MUC5AC ifadesini artırdığı bilinmektedir. EGF'in MUC5AC ifadesi üzerine olan etkisinin sınırlandırılması ve bazal seviyede MUC5AC ifadesinin elde edilmesi amacıyla hücreler FBS içermeyen besiyeri ile inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda, hücreler IL-13 ile belirlenen dozlar ile uyarılır.

Bu doğrultuda Calu-3 hücreleri kültüre alınıp çoğaltıldıktan sonra 24 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Hücreler %80-90 kaplama oranına ulaştığında, FBS içermeyen besiyeri ile 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Sürenin sonunda hücreler, IL-13 10 ng/mL ve IL-13 25 ng/mL konsantrasyonlarında 24 saat boyunca uyarılmıştır. Koşullar arası MUC5AC gen ifadesi değişimi Şekil 4.6.'da verilmiştir.



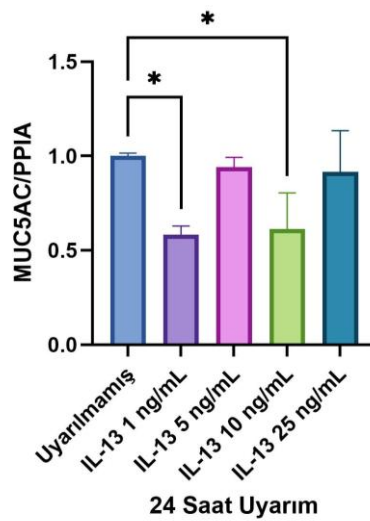
Şekil 4.6. Serumsuz Besiyeri Modeli MUC5AC gen ifadesi, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. *** p<0,001

IL-13 doz ve saat optimizasyonları kapsamında gerçekleştirilen, serumsuz besiyeri modelinde literatür bilgisinin aksine 24 saat boyunca FBS içermeyen besiyeri ile inkübe edilen hücrelerde IL-13 uyarımı sonrası MUC5AC ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşmüştür. Literatürde bu model ile MUC5AC ifadesinin 12 kata kadar arttığı rapor edilmiş olmasına rağmen, tez çalışması kapsamında herhangi bir artış gözlenmemiştir. Ayrıca serumsuz besiyeri modeli iki farklı IL-13 stoğu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve uyumlu sonuçlar bulunmuştur. Bu sebeple burada yalnızca tek bir stoğa ait sonuçlar verilmiştir.

Literatürde 12 katlık artış, farklı bir bronş epitel hücre hattı olan 16HBE14o⁻ hücre hattında gözlenmiştir. Bu doğrultuda laboratuvarımızda yaygın kullanılan 16HBE14o⁻ hücre hattı ile de serumsuz besiyeri modeli ile MUC5AC ifadesi incelenmiştir. Ancak Calu-3 hücrelerine benzer sonuçlar elde edildiğinden dolayı, sonuçlar burada verilmemiştir. Özetle, 16HBE14o⁻ ile yapılan deneylerde IL-13 10 ng/mL uyarımı MUC5AC ifadesini yaklaşık %60 azaltmış ($p < 0.05$), IL-13 25 ng/mL uyarımı ise MUC5AC ifadesini yaklaşık %10 düşürmüştür ($p > 0.05$).

4.2.3.2. IL-13 Doz ve Saat Optimizasyon için 24 Saatlik Uyarım

IL-13 doz ve saat optimizasyonları kapsamında, tez çalışmasında literatürde MUC5AC ifadesini indüklediği bilinen diğer bir uyarım modeli denenmiştir. Hücrelerin 24 kuyucuklu plaka ekiminin ardından hücreler artan dozlarda IL-13 ile 24 saat boyunca uyarılmıştır. Koşullar arası MUC5AC gen ifadesi değişimi Şekil 4.7.'de verilmiştir.



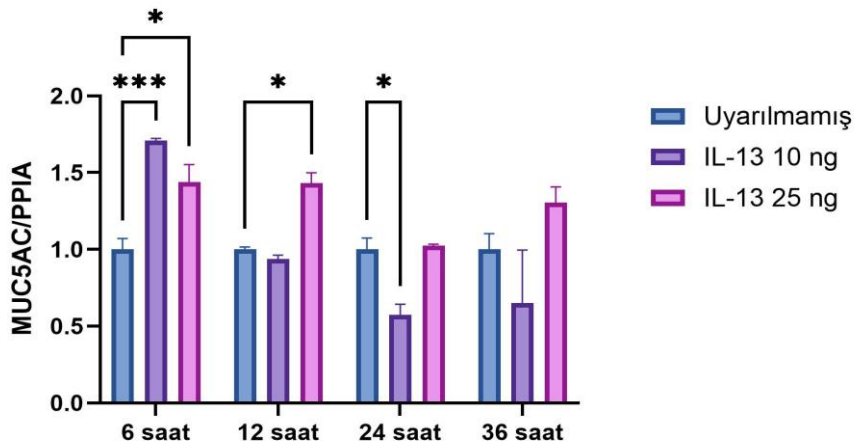
Şekil 4.7. 24 Saatlik Uyarım Sonrası MUC5AC gen ifadesi, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * $p < 0,05$

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 24 saatlik uyarım boyunca IL-13'ün artan dozlarının MUC5AC ifadesini artırmadığı gözlenmiştir. Aynı deney koşulları iki farklı IL-13 stoğu kullanılarak tekrarlanmış ancak alınan sonuçlar değişmemiştir. Bu sebeple burada yalnızca tek bir IL-13 stoğundan alınan sonuçlar verilmiştir.

4.2.3.3. IL-13 Doz ve Saat Optimizasyon için Farklı Uyarım Sürelerinin Denenmesi

IL-13 doz ve saat optimizasyonu kapsamında; literatür bilgisi takip edilerek gerçekleştirilen deneylerde, tez çalışması kapsamında kullanılan hücre hattında MUC5AC ifadesini artıran herhangi bir doz tespit edilememiştir. Bu sebeple literatürde sık kullanılan IL-13 dozları, 10 ve 25 ng/mL, farklı uyarım sürelerince denenmiştir.

Bu kapsamda Calu-3 hücreleri, 6-12-24 ve 36 saat boyunca IL-13 10 ng/mL ve IL-13 25 ng/mL konsantrasyonlarında uyarılmıştır. Koşullar arası MUC5AC gen ifadesi değişimi Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı uyarım saatlerinde MUC5AC gen ifadesi, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * $p<0,05$, *** $p<0,001$

İstatiksel olarak anlamlı değişim gözlenen koşullar incelendiğinde;

IL-13 uyarım koşullarında;

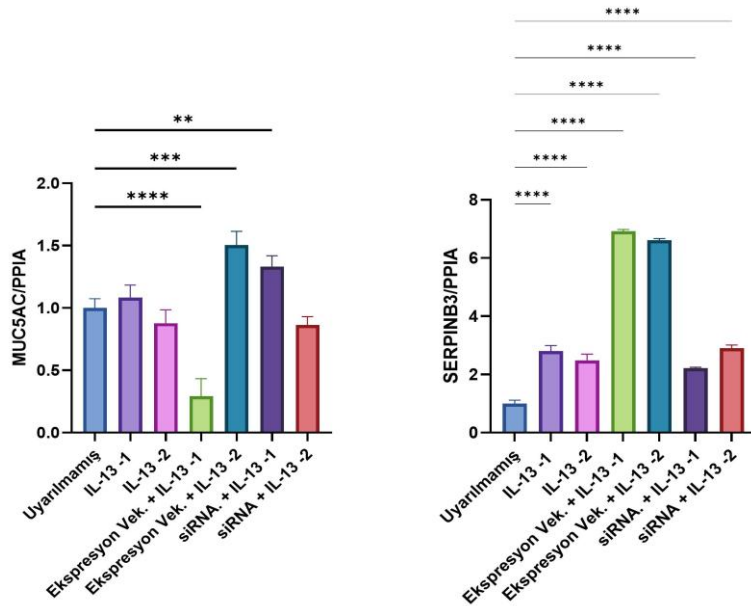
- 6 saatlik uyarımda, 10 ng/mL dozun MUC5AC ifadesini yaklaşık 2 kat artırdığı ($p<0,001$),
- 6 saatlik uyarımda, 25 ng/mL dozun MUC5AC ifadesini yaklaşık 1.5 kat artırdığı ($p<0,05$),
- 12 saatlik uyarımda, 25 ng/mL dozun MUC5AC ifadesini yaklaşık 1.5 kat artırdığı ($p<0,05$),

- 24 saatlik uyarımda, 10 ng/mL dozun MUC5AC ifadesini yaklaşık yarım kat azalttığı (p<0,05)tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda tez çalışması kapsamında, literatür bilgisinin aksine IL-13 uyarımlarında 24 saatten daha az uyarım sürelerinde gen ifadesinin arttığı görülmüştür. Optimizasyon deneyleri kapsamında gerçekleştirilen 24 saatlik uyarımlarda birbirine çok benzer sonuçların görülmesi, elde edilen sonuçların güvenilir olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda tez çalışmasının devamında MUC5AC ifadesini artıran koşul olarak 6 saatlik IL-13 10 ng/mL uyarımı kullanılmıştır.

4.2.4. Transkriptom Analizi için Örneklerin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında; uygun transfeksiyon koşulları ile IL-13 uyarımının dozu ve süresinin bulunmasını takiben, transkriptoma gönderilecek örnekler hazırlanmıştır. Bu doğrultuda Calu-3 hücrelerinin 24 kuyucuklu plakaya ekilmesinin ardından SERPINB3 ekspresyon vektörü ve siRNA'sı ile 24 saatlik transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon süresinin bitiminde hücreler IL-13 ile uyarılmıştır. Tüm koşullar iki biyolojik tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır. Koşullar arası MUC5AC ve SERPINB3 gen ifadesi değişimleri Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Transkriptoma gönderilen örneklere ait MUC5AC ve SERPINB3 gen ifadesi değişimleri, Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001

Transkriptoma gönderilecek örneklerin SERPINB3 ifadesi incelendiğinde, tüm koşulların SERPINB3 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı görülmüştür. Tüm koşulların ikili tekrarları birbirleriyle uyumlu olarak SERPINB3 ifadesini etkilemiştir. IL-13 uyarımı SERPINB3 gen ifadesini artırmış ve ekspresyon vektörü ile birlikte IL-13 uyarımının olduğu koşullarda SERPINB3 gen ifadesi beklenildiği gibi daha fazla artmıştır. Ancak SERPINB3 siRNA koşulları ile IL-13 uyarımının olduğu koşullarda, SERPINB3 ifadesi IL-13 uyarım koşullarındaki SERPINB3 ifadesi ile aynı çıkmıştır. Bu durum SERPINB3 siRNA'sının etkin bir şekilde çalışmadığı veya IL-13 uyarımı ile birlikte siRNA etkinliğinin azaldığını düşündürmektedir. Karşılaşılan bu durumun üstesinden gelebilmek adına, farklı bir deney olarak hücreler SERPINB3 siRNA'sı ile transfekte edilmiş ve transfeksiyon süresinin sonunda IL-13 uyarımı ile birlikte siRNA transfeksiyonu tazelenmiştir. Ancak elde edilen sonuçlar yukarıda verilen sonuçlar ile uyumlu olduğundan dolayı burada verilmemiştir.

Transkriptoma gönderilecek örneklerin MUC5AC ifadesi incelendiğinde; IL-13 uyarımlarının MUC5AC ifadesini artırmadığı ve yalnızca ekspresyon vektörü + IL-13 ile siRNA + IL-13 koşullarından yalnızca 1 biyolojik tekrarlarda MUC5AC ifadesinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. Tüm ikili biyolojik tekrarların SERPINB3 ifadesinde uyumlu sonuç gösterirken, MUC5AC ifadesinde farklılıklar göstermesi dikkat çekmiştir.

4.3. Transkriptom Analiz Sonuçları

Transkriptom analizine gönderilen örneklerin dizilemesi hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin RNA konsantrasyonları Çizelge 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4. 3 Transkriptom analizine gönderilen örneklerin RNA konsantrasyonları

Koşullar	Konsantrasyon (ng/mL)	A260/280	A260/230
Uyarılmamış -1	45,94	2,03	1,39
Uyarılmamış -2	32,96	1,96	0,86
Ekspresyon Vek. -1	45,05	2,03	1,76
Ekspresyon Vek. -2	39,1	2,1	0,76
siRNA -1	43,45	1,98	1,75
siRNA -2	33,49	1,97	0,83
IL-13 -1	44,4	1,95	1,61
IL-13 -2	43,06	1,96	1,32
Ekspresyon Vek + IL-13 -1	41,21	1,98	1,47
Ekspresyon Vek + IL-13 -2	57,36	1,89	1,67
siRNA + IL-13 -1	53,44	1,94	1,58
siRNA + IL-13 -2	56,07	2,04	1,88

4.3.1. Okumaların Kalite Kontrolü ve Hizalama Başarısı

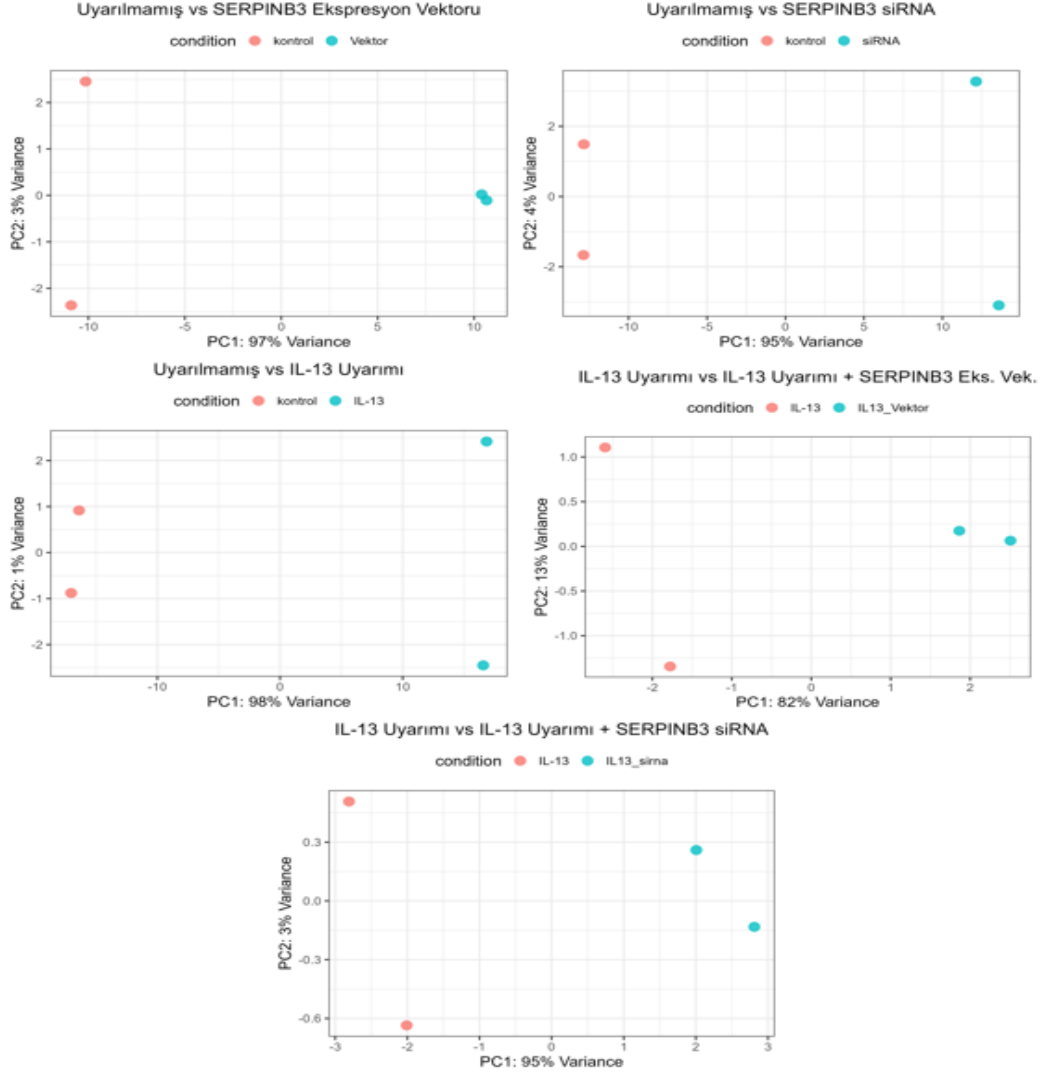
Okumalara ait kalite skorları, Guanin-Sitozin oranı ve adaptör içeriğine ait grafikler ek-1’de verilmiştir. Örneklere ait okuma derinliği, ortalama okuma uzunluğu ve hizalama başarı oranı Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Okuma Kaliteleri ve Hizalama Başarısı

Örnek Adı	Okuma Derinliği	Okuma Uzunluğu	Hizalama Başarısı (%)
Uyarılmamış -1	65060904	150	83.76
Uyarılmamış -2	7258549	150	84.04
Ekspresyon Vek. -1	46367794	150	82.62
Ekspresyon Vel. -2	65628502	150	81.87
siRNA -1	77787581	150	82.40
siRNA -2	78899088	150	84.85
IL-13 -1	88898059	150	85.44
IL-13 -2	54144212	150	84.79
Ekspresyon Vek + IL-13 -1	93507914	150	82.55
Ekspresyon Vek + IL-13 -2	93658415	150	83.44
siRNA + IL-13 -1	93574709	150	83.78
siRNA + IL-13 -2	21931207	150	83.65

4.3.2. Temel Bileşen Analizi, Volkan ve Isı Haritası Grafikleri

Koşullara ait temel bileşen grafikleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Her bir koşula ait 2’li tekrarlar aynı renkte noktalar ile temsil edilmiştir. Koşullar arası örnek dağılımları uyumlu bulunmuştur.

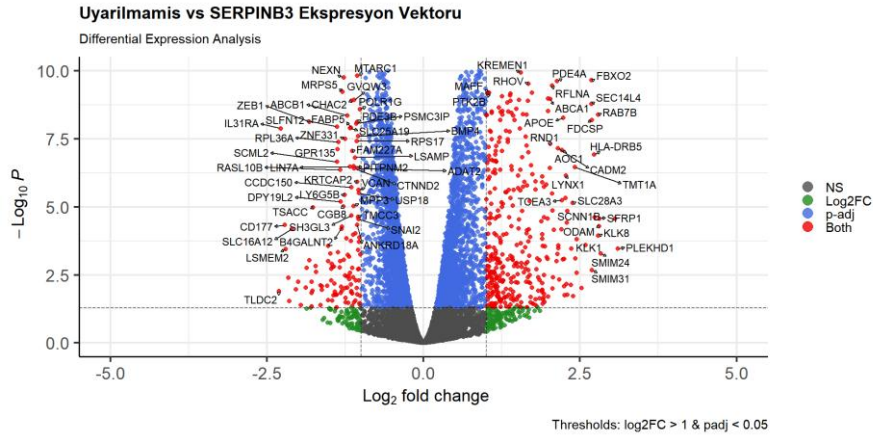


Şekil 4. 10. Koşullar arası temel bileşen analizi grafikleri

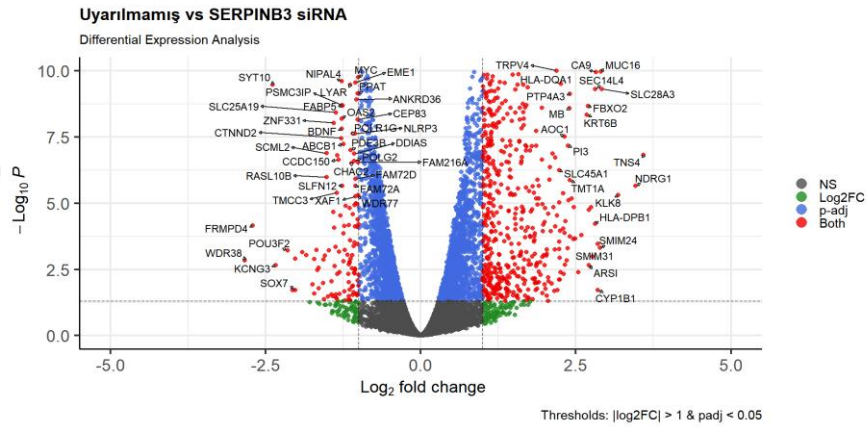
Koşullar arası gen dağılımları volkan grafikleri ile verilmiştir. Koşullar arası gerçekleştirilen RNA-seq analizinde, $p\text{-adj} < 0.05$ ve $|\log_2\text{katdeğişimi}| > 1$ olan;

- 1- Uyarılmamış X SERPINB3 Ekspresyon Vektörü koşulunda, 740 artan ve 208 azalan,
- 2- Uyarılmamış X SERPINB3 siRNA koşulunda, 875 artan ve 214 azalan,
- 3- Uyarılmamış X IL-13 Uyarımı koşulunda, 1133 artan ve 453 azalan,
- 4- IL-13 Uyarımı X IL-13 Uyarımı + SERPINB3 Ekspresyon Vektörü koşulunda, 256 artan ve 255 azalan,

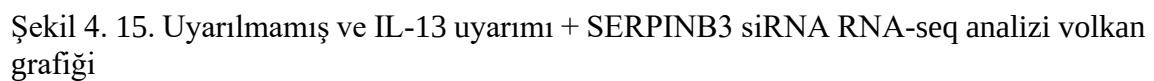
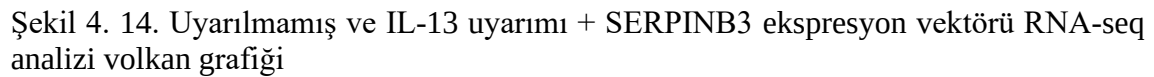
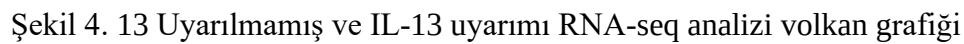
5- IL-13 Uyarımı X IL-13 Uyarımı + SERPINB3 siRNA koşulunda, 448 artan ve 150 azalan gen tespit edilmiştir.



Şekil 4. 11. Uyarılmamış ve SERPINB3 ekspresyon vektörü RNA-seq analizi volkan grafiği

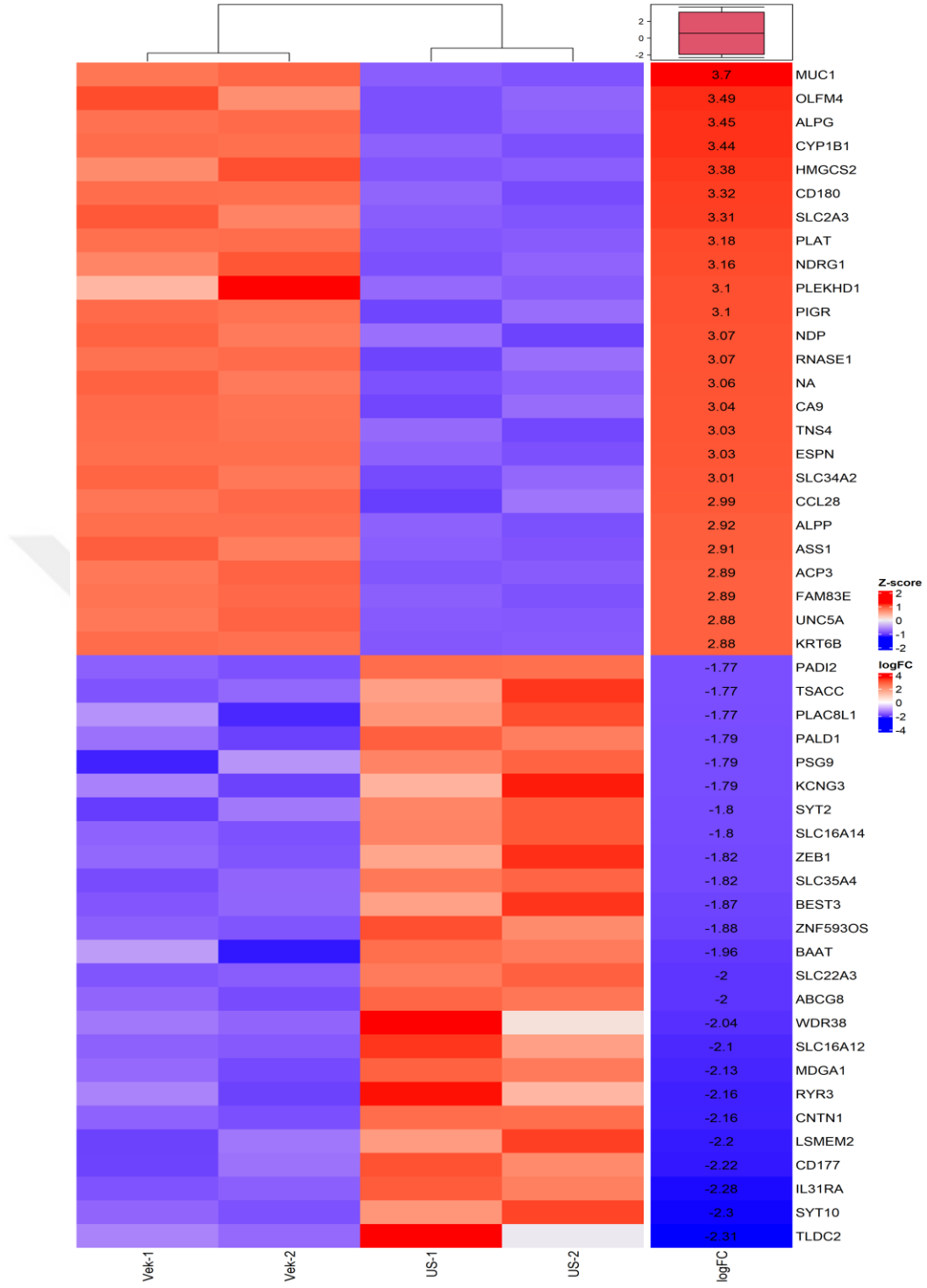


Şekil 4. 12. Uyarılmamış ve SERPINB3 siRNA RNA-seq analizi volkan grafiği

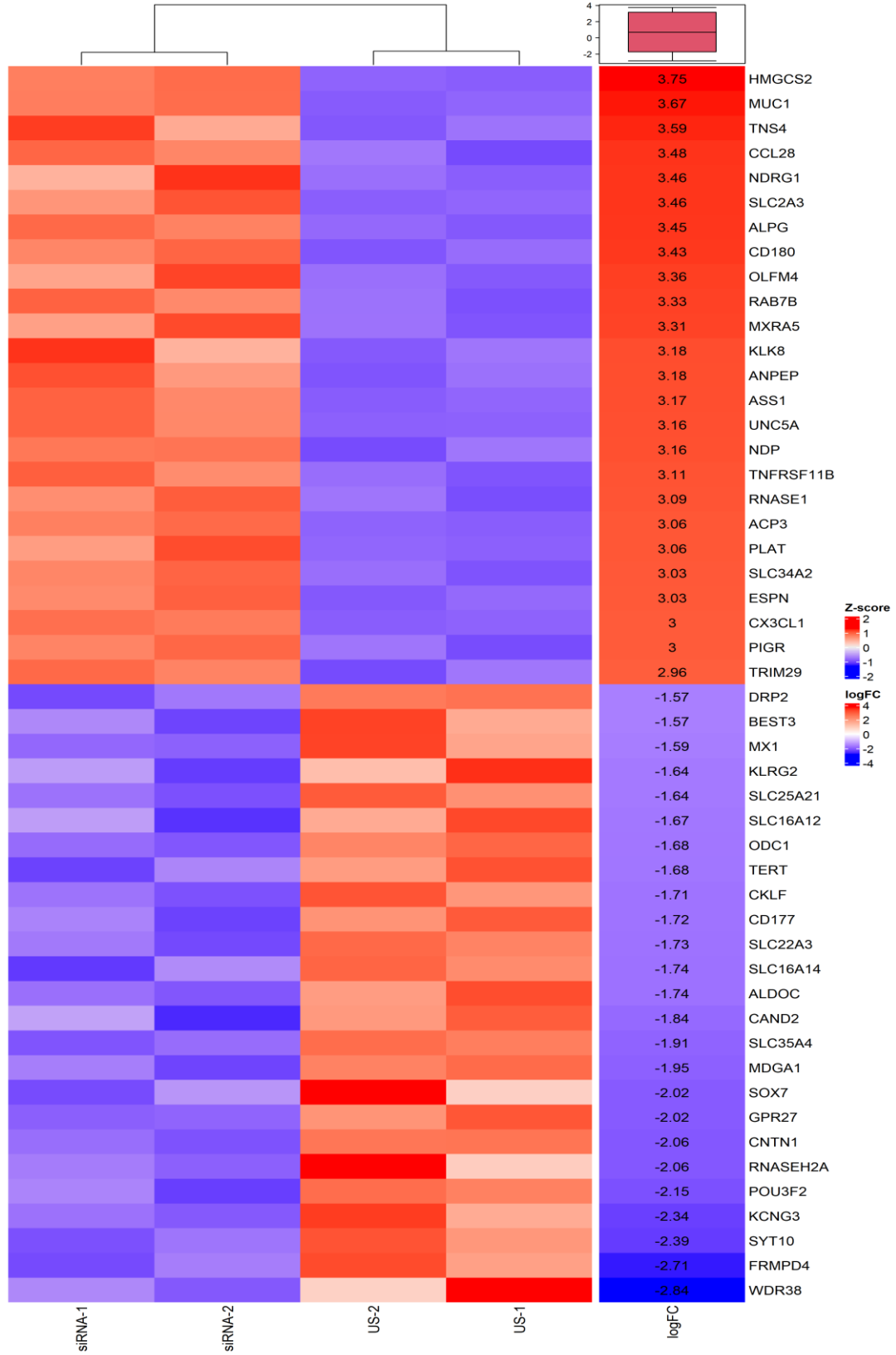


Koşullar arası en fazla artan ve azalan genler ısı haritası ile gösterilmiştir. Isı haritalarında görsel açıdan okunaklı olunması sebebiyle artan ve azalan 25 gen listelenmiştir. Her karşılaştırmada $p\text{-adj} < 0.05$ olan ve $|\log_2 \text{katdeğişimi}| > 1$ olan genler ısı haritası için seçilmiştir.

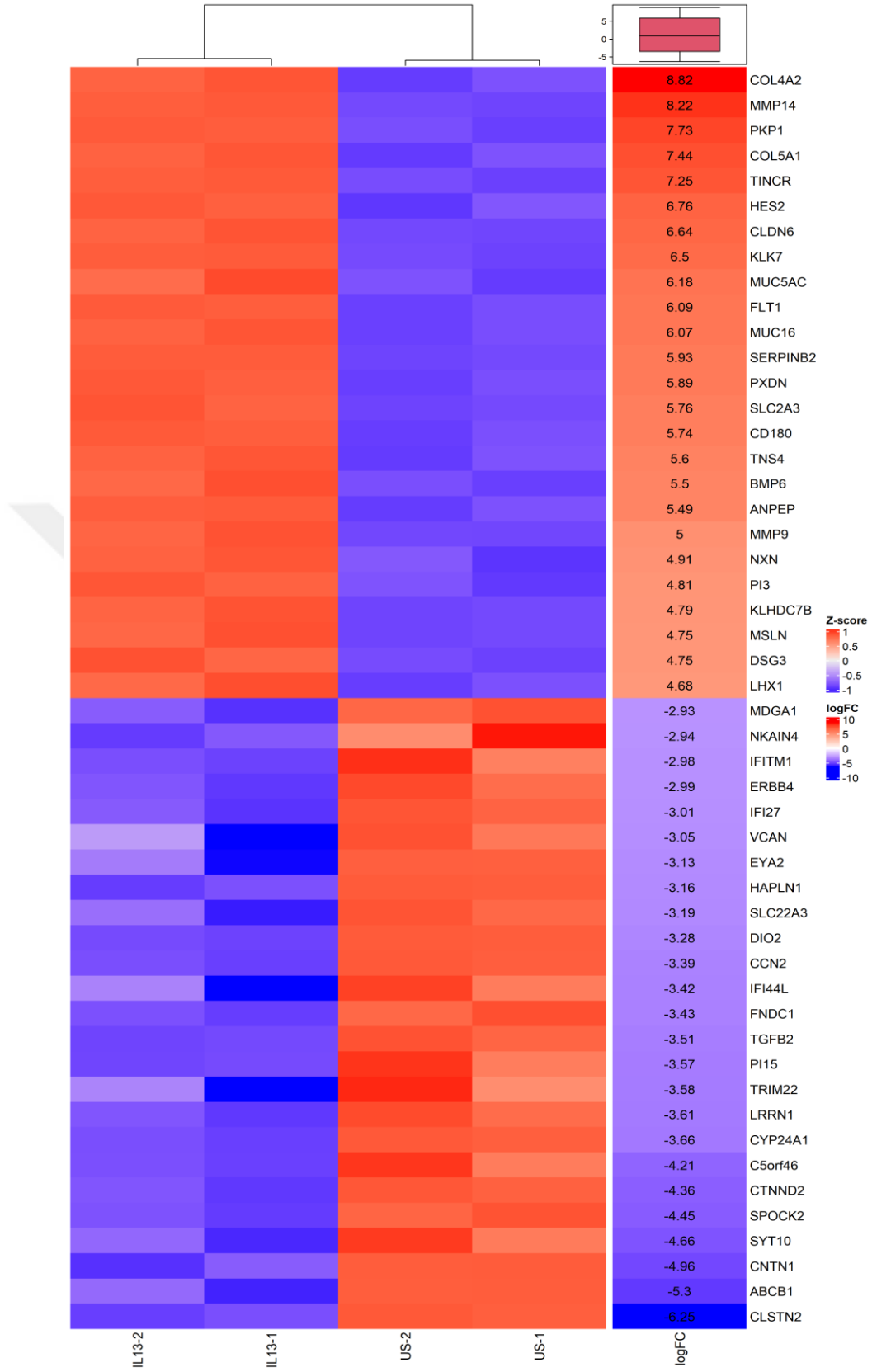




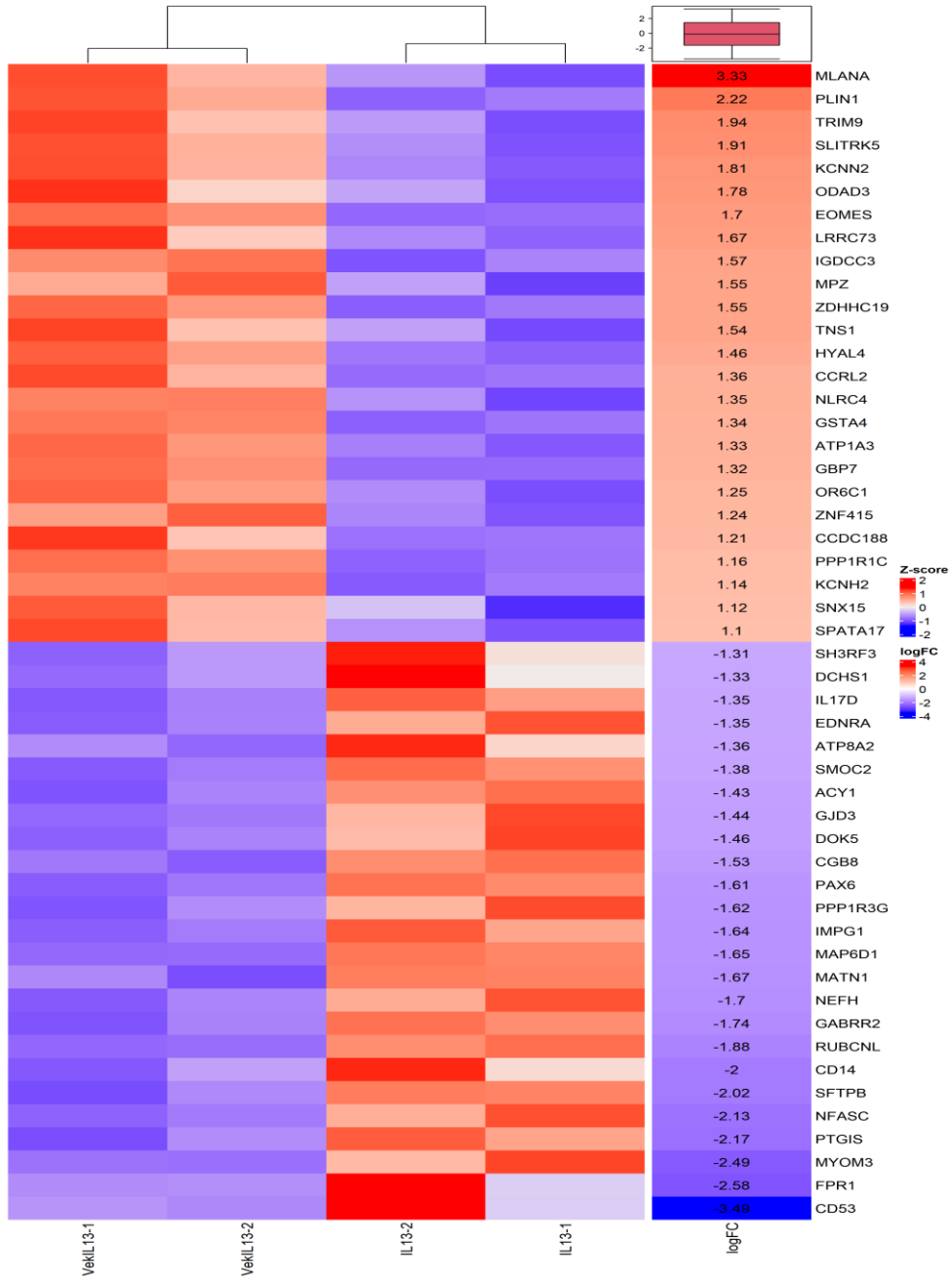
Şekil 4. 16. Uyarılmamış ve SERPINB3 ekspresyon vektörü ısı haritası



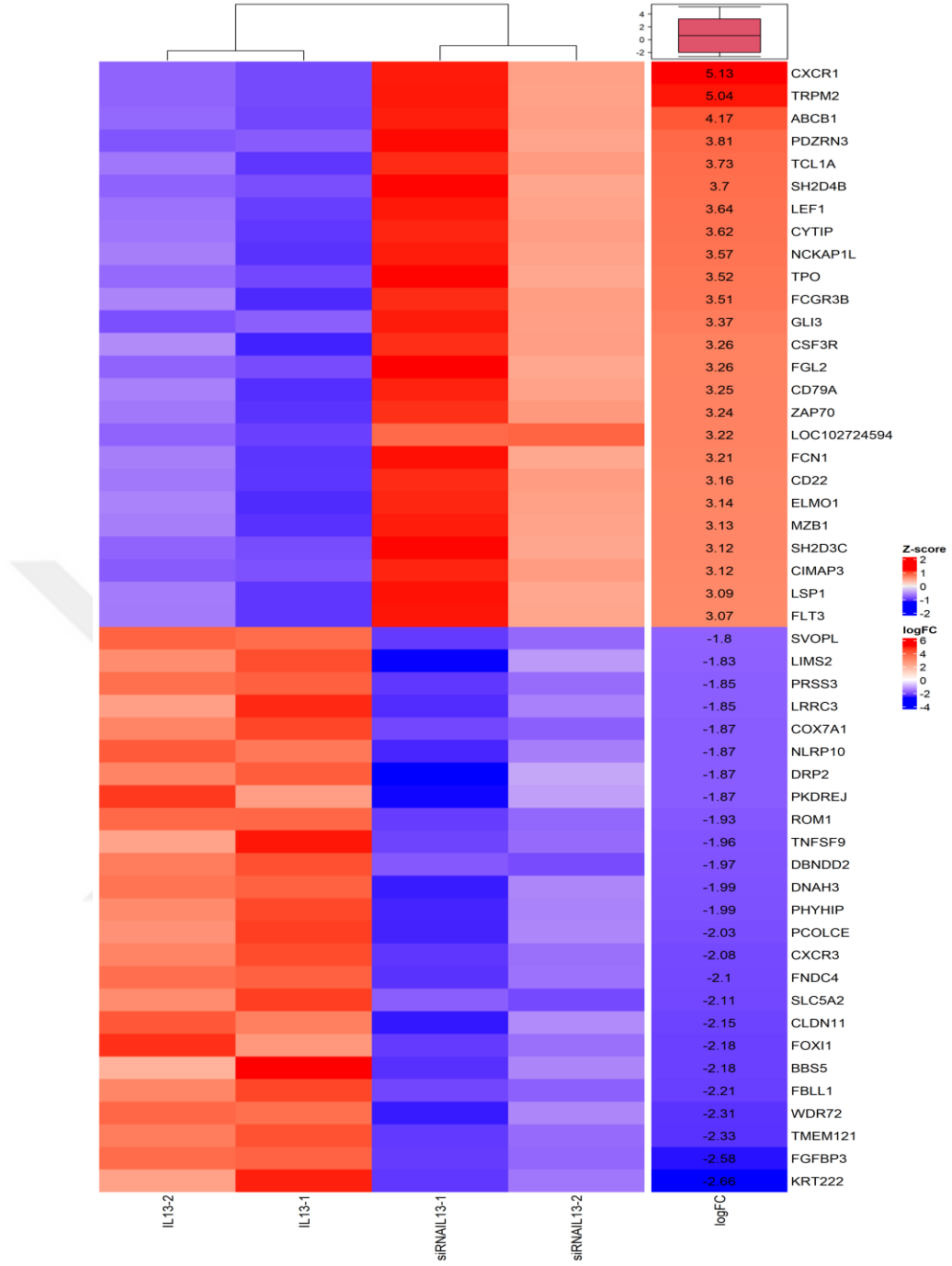
Şekil 4. 17. Uyarılmamış ve SERPINB3 siRNA ısı haritası



Şekil 4. 18. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı ısı haritası



Şekil 4. 19. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı + SERPINB3 ekspresyon vektörü ısı haritası



Şekil 4. 20. Uyarılmamış ve IL-13 uyarımı + SERPINB3 siRNA RNA-seq analizi volkan grafiği

Tez çalışması kapsamında, iki biyolojik tekrar olarak gerçekleştirilen transkriptom analizinde, yolak, protein-protein etkileşimi gibi ileri analizlerin güvenilirliğinin artırması amacıyla biyolojik tekrar sayıları artırılarak ileri analizlere devam edilecektir.

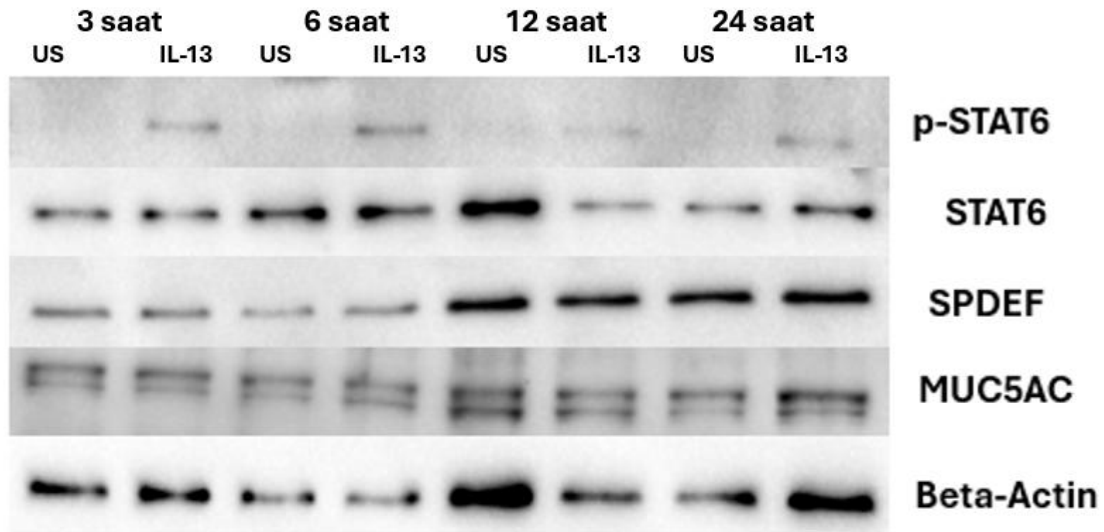
4.4. Protein İfadesi Değişimlerinin Analizi Kapsamında Elde Edilen Sonuçlar

4.4.1. MUC5AC İfadesinin Arttığı Uyarım Süresinin Tespit Edilmesi

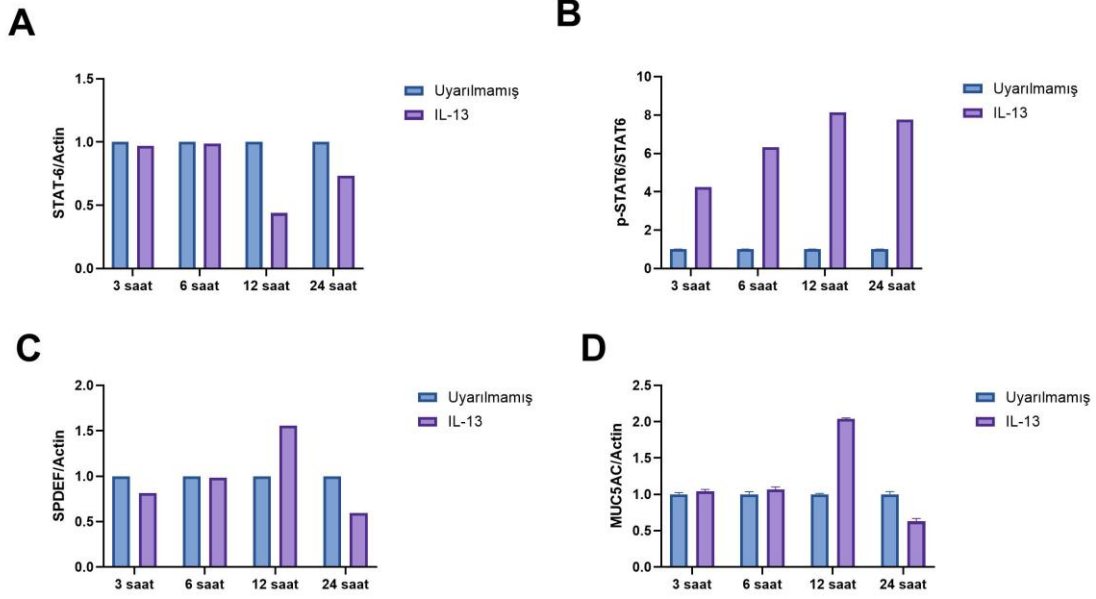
Tez çalışması kapsamında, SERPINB3-MUC5AC arasındaki ilişkinin IL-13 uyarım koşullarında protein düzeyinde incelenmesi hedeflenmiştir. IL-13 ile gen seviyesinde gerçekleştirilen deneyler sonucunda, IL-13 10 ng/mL dozunun 6 saatlik uyarım süresinde MUC5AC ifadesini artırdığı tespit edilmiştir. IL-13 uyarım koşullarında SERPINB3-MUC5AC ilişkisinin protein düzeyinde aydınlatılabilmesi için MUC5AC proteininin arttığı uyarım süresinin bulunması gerekmektedir. Bu doğrultuda Calu-3 hücreleri IL-13 ile 3-6-12 ve 24 saat boyunca uyarılmıştır. Uyarım süresi sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

MUC5AC ifadesinin protein düzeyinde artışı, IL-13 reseptöründe alt yolak proteinleri olan STAT-6, p-STAT-6, SPDEF proteinlerinin ifadeleri ile birlikte incelenmiştir. Protein ifadeleri western blot ile tespit edilmiştir.

Western blot deneylerine ait membran görüntüleri Şekil 4.22’te verilmiştir.



Şekil 4.21. MUC5AC protein ifadesi optimizasyonu membran görüntüleri



Şekil 4. 22. MUC5AC protein ifadesi optimizasyonu western blot protein ifadesi değişimleri, Koşullar arası STAT6 protein ifadesi değişimi (A), p-STAT6 miktarı değişimi (B), SPDEF ifade değişimi (C) ve MUC5AC ifade değişimi (D).

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, STAT6 protein miktarı 3 ve 6. Saatlerde sabit kalmış ancak 12 ve 24 saatlik uyarımlarda düşüş göstermiştir. STAT-6 fosforilasyonu ise, IL-13 uyarım süresine bağlı olarak 12.saate kadar artış göstermiş ve 24 saatlik uyarım koşulunda sabit kalmıştır. STAT6 ifade değişimleri ve fosforilasyonuna ait sonuçlar, protein fosforilasyonunun sabit kaldığı saatlerde, 12 ve 24, STAT-6 ifadesinin düşmesi ile uyumlu gözükmemektedir. SPDEF ifadesi ise, 3 ve 6 saatlik uyarım süreleri boyunca sabit kalmış ve 12.saatte 1.5 katlık artış göstermiştir. Bu artışın ardından SPDEF ifadesi 24 saatlik uyarımda yaklaşık %40 düşmüştür. SPDEF ifadesi ile uyumlu olarak MUC5AC ifadesi de yalnızca 12 saatlik uyarımda 2 kat artış göstermiş ve 24 saatlik uyarımda yaklaşık %30 düşmüştür.

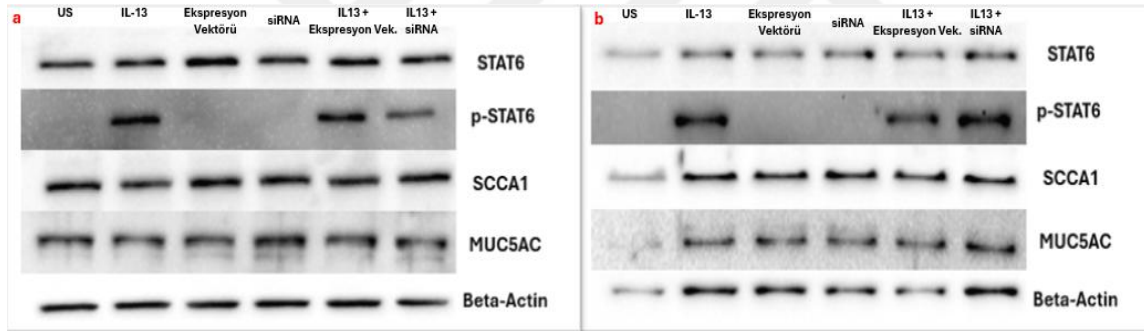
Bu sonuçlar doğrultusunda, IL-13 uyarım koşullarında MUC5AC ifadesinin incelenmesi için 12 saatlik uyarım koşulu seçilmiş ve tez çalışması kapsamında IL-13 reseptörü ilişkili proteinler 6 ve 12 saatlik uyarım koşullarında incelenmiştir.

4.4.2. IL-13 İlişkili Yolakların İncelenmesi

Tez çalışması kapsamında, IL-13'ün MUC5AC ifadesini artıran dozunun bulunmasını takiben IL-13 ilişkili proteinlerin ifadelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. IL-13 ilişkili yolaklar, 5 koşulda incelenmiştir. Koşullar aşağıda belirtilmiştir.

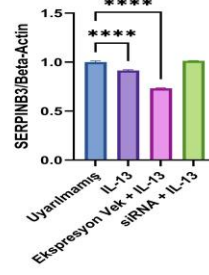
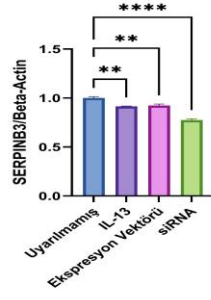
- 1- Uyarılmamış X SERPINB3 Ekspresyon Vektörü
- 2- Uyarılmamış X SERPINB3 siRNA
- 3- Uyarılmamış X IL-13 Uyarımı
- 4- IL-13 Uyarımı X IL-13 Uyarımı + SERPINB3 Ekspresyon
- 5- IL-13 Uyarımı X IL-13 Uyarımı + SERPINB3 siRNA

Western blot deneylerine ait bant görüntüleri Şekil 4.26'da verilmiştir.

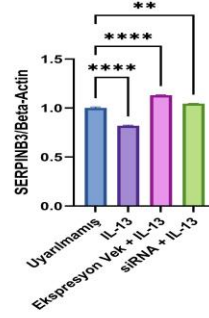
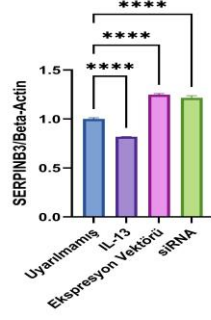


Şekil 4. 23. IL-13 İlişkili proteinlerin incelenmesine dair bant görüntüleri. A) 6 saatlik IL-13 uyarımına ait, b) 12 saatlik IL-13 uyarımına ait

6 saat

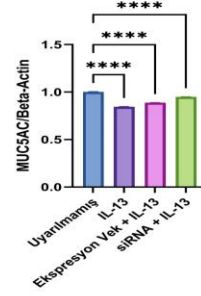
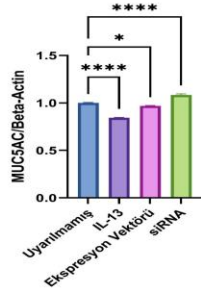


12 saat

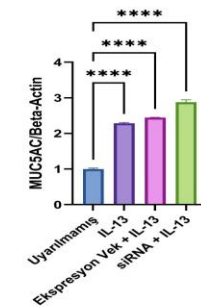
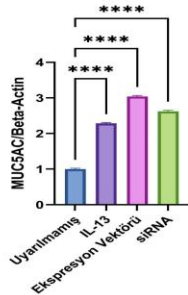


Şekil 4. 24. IL-13 ile 6 ve 12 saat uyarım sonrası tüm koşullara ait SERPINB3 ifadesi değişimi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

6 saat

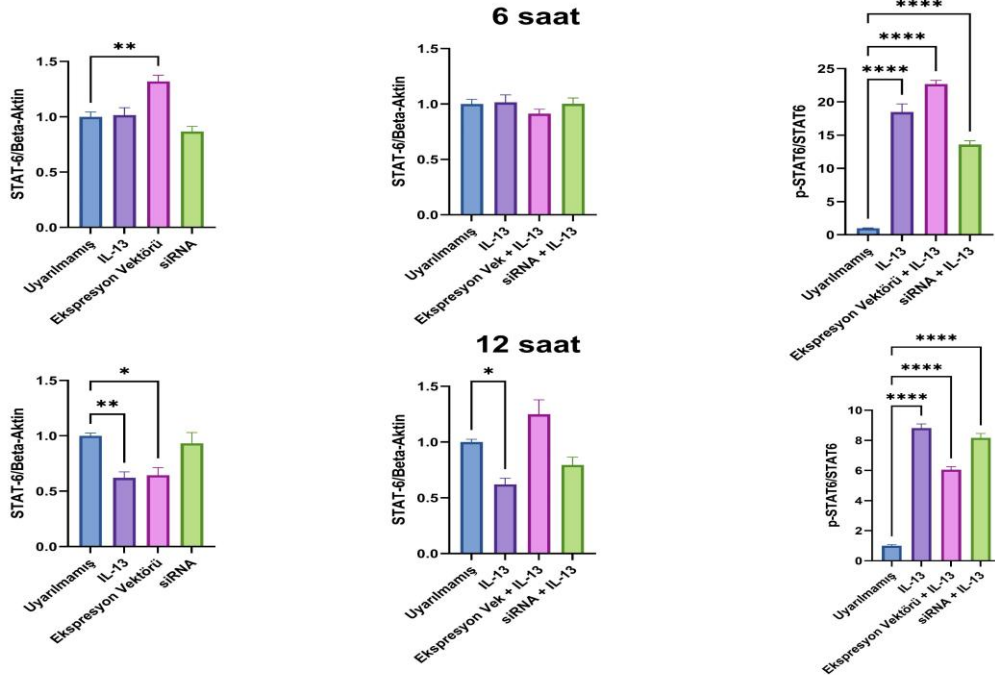


12 saat



Şekil 4. 25. IL-13 ile 6 ve 12 saat uyarım sonrası tüm koşullara ait MUC5AC ifadesi değişimi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür.

* $p < 0,1$, **** $p < 0,0001$



Şekil 4. 26. IL-13 ile 6 ve 12 saat uyarım sonrası tüm koşullara ait STAT6 ifadesi ve p-STAT6 değişimi. Koşullar arası anlamlılık düzeyi, One-way ANOVA testi ile ölçülmüştür. * $p<0.1$, ** $p<0,01$, **** $p<0,0001$

Gerçekleştirilen western blot deneyleri sonucunda, 6 saatlik IL-13 uyarımında SERPINB3 ifadesi hiçbir koşulda artış göstermemiştir. 12 saatlik uyarımlarda ise yalnızca Ekspresyon vektörü ve siRNA uyarımlarında artış göstermiştir. (Şekil 4.25). MUC5AC ifadesi ise, 6 saatlik uyarım koşullarının hiçbirinde anlamlı bir değişiklik göstermezken, 12 saatlik uyarımlarda tüm koşullarda istatistiksel olarak anlamlı en az 2 kat artış göstermiştir (Şekil 4.26). IL-13 uyarımına bağlı olarak STAT-6 ifadesi ve STAT-6 fosforilasyonunun incelendiği deneylerde ise, STAT-6 ifadesinin 6 saatlik uyarımlarda herhangi bir değişik göstermediği ancak STAT-6 fosforilasyonunun IL-13 uyarımının bulunduğu koşullarda 20 kata kadar istatistiksel olarak arttığı tespit edilmiştir. 12 saatlik uyarımlarda ise STAT6 ifadesi istatistiksel olarak yaklaşık %40 kadar azalmış ve buna bağlı olarak fosforilasyon seviyeleri 20 kattan yaklaşık 8 kata kadar azalmıştır.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda listelenmiştir;

- Kompetan bakterilerde çoğaltılan SERPINB3 ekspresyon vektörü, konsantrasyona bağlı olarak bronş epitel hücre hattı olan Calu-3 hücrelerinde ve alveolar hücre hattı olan A549 hücrelerinde SERPINB3 gen ifadesini artırmıştır.
- SERPINB3 siRNA transfeksiyonu sonucunda Calu-3 hücrelerinde SERPINB3 ifadesi en az %50 oranında susturulmuştur.
- Literatürde MUC5AC ifadesini artıran IL-13 uyarım koşulların denenmesinde;
 - Calu-3 hücrelerinin 24 saat boyunca serumsuz besiyeri ile inkübe edilmesini takiben yapılan IL-13 uyarımlarında MUC5AC gen ifadesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.
 - Calu-3 hücrelerinin 24 saat boyunca artan IL-13 dozları ile uyarılması sonucunda MUC5AC gen ifadesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.
- Calu-3 hücrelerinde MUC5AC gen ifadesinde artış yalnızca IL-13 10 ng/mL ile 6 ve 12 saatlik uyarım sürelerinde gözlenmiştir.
- Gerçekleştirilen transkriptom analizlerinde, $p\text{-adj} < 0.05$ ve $|\log_2\text{katdeğişimi}| > 1$;
 - Uyarılmamış ve SERPINB3 ekspresyon vektörü koşulunda 948,
 - Uyarılmamış ve SERPINB3 siRNA koşulunda 1089,
 - Uyarılmamış ve IL-13 Uyarım koşulunda 1586,
 - IL-13 Uyarımı ve IL-13 + SERPINB3 Ekspresyon Vektörü koşulunda 511,
 - IL-13 Uyarımı ve IL-13 + SERPINB3 siRNA koşulunda 598 gen ifadesinin değişimi görülmüştür.
- Calu-3 hücrelerinin IL-13 10 ng/mL ile 3-6 saat uyarımı sonucunda STAT6 protein seviyeleri uyarılmamış hücrelere oranla değişmemiştir. 12 ve 24 saatlik uyarım sürelerinde STAT6 protein ifadesi uyarılmamış hücrelere oranla düşmüştür.
- Calu-3 hücrelerinin IL-13 10 ng/mL ile 3-6 ve 12 saat uyarımı sonucunda STAT6 fosforilasyonu uyarılmamış hücrelere oranla artmıştır. 12 ve 24 saatlik uyarım sürelerinde STAT6 fosforilasyonu sabit kalmıştır.

- Calu-3 hücrelerinin IL-13 10 ng/mL ile 3-6-12-24 saat uyarımlarında yalnızca 12 saatlik uyarım süresinde, SPDEF protein ifadesi uyarılmamış hücrelere kıyasla artmıştır.
- Calu-3 hücrelerinin IL-13 10 ng/mL ile 3-6-12-24 saat uyarımlarında yalnızca 12 saatlik uyarım süresinde, MUC5AC protein ifadesi uyarılmamış hücrelere kıyasla artmıştır.
- Calu-3 hücrelerinde IL-13 reseptörü aracılı proteinlerin incelenmesinde 6 saatlik IL-13 10 ng/mL uyarım koşullarında;
 - Optimizasyon deneyleriyle uyumlu olarak, STAT6 ifadesi yalnızca ekspresyon vektörü transfeksiyon koşullarında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş ve diğer uyarım koşullarında herhangi bir değişim göstermemiştir.
 - Optimizasyon deneyleriyle uyumlu olarak, STAT6 fosforilasyonu IL-13 uyarım koşullarında istatistiksel olarak anlamlı en az 12 katlık bir artış göstermiştir.
 - SERPINB3 ifadesi, herhangi bir uyarım koşulunda artış göstermemiş olup yalnızca ekspresyon vektörünün IL-13 ile birlikte kullanıldığı koşulda yaklaşık %15 oranında azalmıştır.
 - Optimizasyon deneyleriyle uyumlu olarak, MUC5AC ifadesi herhangi bir uyarım koşulunda artış göstermemiştir.
- Calu-3 hücrelerinde IL-13 reseptörü aracılı proteinlerin incelenmesinde 12 saatlik IL-13 10 ng/mL uyarım koşullarında;
 - Optimizasyon deneyleriyle uyumlu olarak, IL-13 ve ekspresyon vektörü uyarım koşullarında STAT6 ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yaklaşık %40 azalmıştır. Bu durum 6. saatte artan fosforilasyona bağlı olarak STAT6 etkinliğinin hücre içi mekanizmalar aracılığıyla baskılanması yorumlanmıştır.
 - STAT6 fosforilasyonu tüm IL-13 uyarım koşullarında istatistiksel olarak anlamlı olarak en az 6 katlık artış göstermiş olmasına rağmen, 6 saatlik uyarımlara göre fosforilasyon seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Bu durumun 12. saatte azalan STAT6 ifadesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

- SERPINB3 ifadesi yalnızca ekspresyon vektörü ve siRNA transfeksiyonlarının gerçekleştirildiği koşullarda istatistiksel olarak anlamlı 1.2 katlık bir artış göstermiştir. IL-13 uyarım koşullarında 12.saatte SERPINB3 protein ifadesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.
- MUC5AC ifadesi, optimizasyon deneyleriyle uyumlu olarak, tüm IL-13 uyarımının bulunduğu koşullarda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde en az 2 katlık bir artış göstermiştir.
- Bronş epitel hücre hattı olan Calu-3 hücrelerinde, tez çalışmasının hipotezinin oluşturulmasında yararlanılan, alveolar epitel hücre hattı A549 hücrelerinde gerçekleştirilen deneyler ile uyumlu olmayan sonuçlar elde edilmiştir.
 - A549 hücrelerinin SERPINB3 ekspresyon vektörü ve siRNA'sı ile transfekte edildiği koşullarda, SERPINB3 ve MUC5AC gen ifade profilleri arasında negatif yönde bir ilişki tespit edilmiştir (Şekil 2.9). Ancak Calu-3 hücrelerinde SERPINB3 ekspresyon vektörü ve siRNA'sı ile gerçekleştirilen deneylerde, SERPINB3 ifadesinin baskılandığı koşullarda MUC5AC ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılandığı tespit edilmiştir.

Tez çalışması, A549 hücrelerinde elde edilen SERPINB3 ve MUC5AC gen ifadelerinin ters bir şekilde değişmesi üzerine aralarındaki olası ilişkinin gen ve protein düzeyinde aydınlatılmasını amaçlayarak tasarlanmıştır. Bu doğrultuda akciğerlerde mukus üretiminin en yoğun olduğu bölge olan bronş bölgelerine ait Calu-3 hücrelerinde bu ilişkinin incelenmesi hedeflenmiştir. Ancak bronş epitel hücrelerinde, alveolar epitel hücrelerinde olduğu gibi bir SERPINB3-MUC5AC gen ifadesi ilişkisi tespit edilememiştir. Elde edilen bu sonuçların, bronş ve alveolar hücrelerinin fizyolojik ve metabolik farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] M.G. Levitzky, Pulmonary Physiology, 2022.
- [2] H. Aung, A. Sivakumar, S. Gholami, S. Venkateswaran, B. Gorain, An overview of the anatomy and physiology of the lung, Nanotechnology-based targeted drug delivery systems for lung cancer, (2019) 1-20.
- [3] K. Katrivesis, J. Elia, B. Etiz, K. Cooley-Rieders, S. Hosseinian, S. Melucci, An Overview of Lung Anatomy and Physiology, Mechanical Ventilation Amid the COVID-19 Pandemic: A Guide for Physicians and Engineers, (2022) 5-24.
- [4] D.F. Rogers, Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion, Respiratory care, 52 (2007) 1134-1149.
- [5] R.G. Crystal, S.H. Randell, J.F. Engelhardt, J. Voynow, M.E. Sunday, Airway epithelial cells: current concepts and challenges, Proceedings of the American Thoracic Society, 5 (2008) 772-777.
- [6] M. Weitnauer, V. Mijošek, A. Dalpke, Control of local immunity by airway epithelial cells, Mucosal immunology, 9 (2016) 287-298.
- [7] R.J. Hewitt, C.M. Lloyd, Regulation of immune responses by the airway epithelial cell landscape, Nature Reviews Immunology, 21 (2021) 347-362.
- [8] K.J. Travaglini, A.N. Nabhan, L. Penland, R. Sinha, A. Gillich, R.V. Sit, S. Chang, S.D. Conley, Y. Mori, J. Seita, A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing, Nature, 587 (2020) 619-625.
- [9] M. Deprez, L.-E. Zaragosi, M. Truchi, C. Becavin, S. Ruiz García, M.-J. Arguel, M. Plaisant, V. Magnone, K. Lebrigand, S. Abelanet, A single-cell atlas of the human healthy airways, American journal of respiratory and critical care medicine, 202 (2020) 1636-1645.
- [10] K.C. Goldfarbmuren, N.D. Jackson, S.P. Sajuthi, N. Dyjack, K.S. Li, C.L. Rios, E.G. Plender, M.T. Montgomery, J.L. Everman, P.E. Bratcher, Dissecting the cellular specificity of smoking effects and reconstructing lineages in the human airway epithelium, Nature communications, 11 (2020) 2485.

- [11] L.W. Plasschaert, R. Žilionis, R. Choo-Wing, V. Savova, J. Knehr, G. Roma, A.M. Klein, A.B. Jaffe, A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte, *Nature*, 560 (2018) 377-381.
- [12] M.V. Surve, B. Lin, J.L. Reedy, A.J. Crossen, A. Xu, B.S. Klein, J.M. Vyas, J. Rajagopal, Single-cell transcriptomes, lineage, and differentiation of functional airway microfold cells, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 69 (2023) 698-701.
- [13] B. Lin, V.S. Shah, C. Chernoff, J. Sun, G.G. Shipkovenska, V. Vinarsky, A. Waghray, J. Xu, A.D. Leduc, C.A. Hintschich, Airway hillocks are injury-resistant reservoirs of unique plastic stem cells, *Nature*, (2024) 1-9.
- [14] R.G. Crystal, Airway basal cells. The “smoking gun” of chronic obstructive pulmonary disease, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 190 (2014) 1355-1362.
- [15] J.R. Rock, S.H. Randell, B.L. Hogan, Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling, *Disease models & mechanisms*, 3 (2010) 545-556.
- [16] J.R. Rock, M.W. Onaitis, E.L. Rawlins, Y. Lu, C.P. Clark, Y. Xue, S.H. Randell, B.L. Hogan, Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 12771-12775.
- [17] K.U. Hong, S.D. Reynolds, S. Watkins, E. Fuchs, B.R. Stripp, In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286 (2004) L643-L649.
- [18] R. Hajj, T. Baranek, R. Le Naour, P. Lesimple, E. Puchelle, C. Coraux, Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties, *Stem cells*, 25 (2007) 139-148.
- [19] J.E. Boers, A.W. Ambergen, F.B. Thunnissen, Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157 (1998) 2000-2006.
- [20] Y. Xing, C. Li, A. Li, S. Sridurongrit, C. Tiozzo, S. Bellusci, Z. Borok, V. Kaartinen, P. Minoo, Signaling via Alk5 controls the ontogeny of lung Clara cells, *Development*, 137 (2010) 825-833.

- [21] P.R. Tata, H. Mou, A. Pardo-Saganta, R. Zhao, M. Prabhu, B.M. Law, V. Vinarsky, J.L. Cho, S. Breton, A. Sahay, Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo, *Nature*, 503 (2013) 218-223.
- [22] J.E. Boers, A.W. Ambergen, F.B. Thunnissen, Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 159 (1999) 1585-1591.
- [23] M. Guo, Y. Du, J.J. Gokey, S. Ray, S.M. Bell, M. Adam, P. Sudha, A.K. Perl, H. Deshmukh, S.S. Potter, Single cell RNA analysis identifies cellular heterogeneity and adaptive responses of the lung at birth, *Nature communications*, 10 (2019) 37.
- [24] M. Morimoto, R. Nishinakamura, Y. Saga, R. Kopan, Different assemblies of Notch receptors coordinate the distribution of the major bronchial Clara, ciliated and neuroendocrine cells, *Development*, 139 (2012) 4365-4373.
- [25] Y. You, T. Huang, E.J. Richer, J.-E.H. Schmidt, J. Zabner, Z. Borok, S.L. Brody, Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286 (2004) L650-L657.
- [26] J.A. Whitsett, Airway epithelial differentiation and mucociliary clearance, *Annals of the American thoracic society*, 15 (2018) S143-S148.
- [27] X.M. Bustamante-Marin, L.E. Ostrowski, Cilia and mucociliary clearance, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9 (2017) a028241.
- [28] J. Wang, K. Edeen, R. Manzer, Y. Chang, S. Wang, X. Chen, C.J. Funk, G.P. Cosgrove, X. Fang, R.J. Mason, Differentiated human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype in vitro, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 36 (2007) 661-668.
- [29] A. Frey, L.P. Lunding, J.C. Ehlers, M. Weckmann, U.M. Zissler, M. Wegmann, More than just a barrier: the immune functions of the airway epithelium in asthma pathogenesis, *Frontiers in immunology*, 11 (2020) 761.
- [30] S. Mehta, A. Nijhuis, T. Kumagai, J. Lindsay, A. Silver, Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease, *Cell and tissue research*, 360 (2015) 749-760.

- [31] D. Günzel, M. Fromm, Claudins and other tight junction proteins, *Comprehensive Physiology*, 2 (2012) 1819-1852.
- [32] K.M. McCarthy, I.B. Skare, M.C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R.A. Rogers, R.D. Lynch, E.E. Schneeberger, Occludin is a functional component of the tight junction, *Journal of cell science*, 109 (1996) 2287-2298.
- [33] J.M. Anderson, B.R. Stevenson, L.A. Jesaitis, D.A. Goodenough, M.S. Mooseker, Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells, *The Journal of cell biology*, 106 (1988) 1141-1149.
- [34] H. Yuksel, M. Ocalan, O. Yilmaz, E-cadherin: an important functional molecule at respiratory barrier between defence and dysfunction, *Frontiers in physiology*, 12 (2021) 720227.
- [35] J. Li, K. Wang, B. Huang, R. Li, X. Wang, H. Zhang, H. Tang, X. Chen, The receptor for advanced glycation end products mediates dysfunction of airway epithelial barrier in a lipopolysaccharides-induced murine acute lung injury model, *International immunopharmacology*, 93 (2021) 107419.
- [36] K. Ogi, M. Ramezanpour, S. Liu, J. Ferdoush Tuli, C. Bennett, M. Suzuki, S. Fujieda, A.J. Psaltis, P.-J. Wormald, S. Vreugde, Der p 1 disrupts the epithelial barrier and induces IL-6 production in patients with house dust mite allergic rhinitis, *Frontiers in allergy*, 2 (2021) 692049.
- [37] R.C. Boucher, Muco-obstructive lung diseases, *New England Journal of Medicine*, 380 (2019) 1941-1953.
- [38] B. Button, L.-H. Cai, C. Ehre, M. Kesimer, D.B. Hill, J.K. Sheehan, R.C. Boucher, M. Rubinstein, A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia, *Science*, 337 (2012) 937-941.
- [39] R. Hamed, J. Fiegel, Synthetic tracheal mucus with native rheological and surface tension properties, *Journal of biomedical materials research Part A*, 102 (2014) 1788-1798.
- [40] M.C. Rose, J.A. Voynow, Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease, *Physiological reviews*, 86 (2006) 245-278.
- [41] R. Tarran, B. Button, M. Picher, A.M. Paradiso, C.M. Ribeiro, E.R. Lazarowski, L. Zhang, P.L. Collins, R.J. Pickles, J.J. Fredberg, Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis: the effects of phasic shear

stress and viral infections, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 35751-35759.

[42] L.R. Bonser, D.J. Erle, Airway mucus and asthma: the role of MUC5AC and MUC5B, *Journal of clinical medicine*, 6 (2017) 112.

[43] J.W. Messer, G.A. Peters, W.A. Bennett, Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma, *Diseases of the Chest*, 38 (1960) 616-624.

[44] L.M. Kuyper, P.D. Paré, J.C. Hogg, R.K. Lambert, D. Ionescu, R. Woods, T.R. Bai, Characterization of airway plugging in fatal asthma, *The American journal of medicine*, 115 (2003) 6-11.

[45] J. Sweeter, K. Kudrna, K. Hunt, P. Thomes, B. Dickey, S. Brody, J. Dickinson, Autophagy of mucin granules contributes to resolution of airway mucous metaplasia, *Scientific reports*, 11 (2021) 13037.

[46] M.A. Seibold, R.W. Smith, C. Urbanek, S.D. Groshong, G.P. Cosgrove, K.K. Brown, M.I. Schwarz, D.A. Schwartz, S.D. Reynolds, The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium, *PloS one*, 8 (2013) e58658.

[47] M.E. Lachowicz-Scroggins, S. Yuan, S.C. Kerr, E.M. Dunican, M. Yu, S.D. Carrington, J.V. Fahy, Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 194 (2016) 1296-1299.

[48] D.J. Erle, D. Sheppard, The cell biology of asthma, *Journal of Cell Biology*, 205 (2014) 621-631.

[49] S.T. Holgate, Epithelium dysfunction in asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (2007) 1233-1244.

[50] J.-S. Zhou, Y. Zhao, H.-B. Zhou, Y. Wang, Y.-F. Wu, Z.-Y. Li, N.-X. Xuan, C. Zhang, W. Hua, S.-M. Ying, Autophagy plays an essential role in cigarette smoke-induced expression of MUC5AC in airway epithelium, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310 (2016) L1042-L1052.

[51] D. Parker, A. Prince, Innate immunity in the respiratory epithelium, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45 (2011) 189-201.

- [52] R. Bals, P. Hiemstra, Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens, *European Respiratory Journal*, 23 (2004) 327-333.
- [53] Q. Wang, D.R. Nagarkar, E.R. Bowman, D. Schneider, B. Gosangi, J. Lei, Y. Zhao, C.L. McHenry, R.V. Burgens, D.J. Miller, Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses, *The Journal of Immunology*, 183 (2009) 6989-6997.
- [54] J. Parkin, B. Cohen, An overview of the immune system, *The Lancet*, 357 (2001) 1777-1789.
- [55] P.S. Hiemstra, P.B. McCray Jr, R. Bals, The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease, *European respiratory journal*, 45 (2015) 1150-1162.
- [56] J.D. Davis, T.P. Wypych, Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium, *Mucosal immunology*, 14 (2021) 978-990.
- [57] V.O. Millien, W. Lu, J. Shaw, X. Yuan, G. Mak, L. Roberts, L.-Z. Song, J.M. Knight, C.J. Creighton, A. Luong, Cleavage of fibrinogen by proteinases elicits allergic responses through Toll-like receptor 4, *Science*, 341 (2013) 792-796.
- [58] H. Hammad, M. Chieppa, F. Perros, M.A. Willart, R.N. Germain, B.N. Lambrecht, House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells, *Nature medicine*, 15 (2009) 410-416.
- [59] C.M. Lloyd, S. Saglani, Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation, *Current opinion in immunology*, 34 (2015) 52-58.
- [60] K.R. Bartemes, H. Kita, Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma, *Clinical immunology*, 143 (2012) 222-235.
- [61] J.V. Fahy, Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many, *Nature Reviews Immunology*, 15 (2015) 57-65.
- [62] G.I.F. ASTHMA, Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2024.

- [63] M.E. Kuruvilla, F.E.-H. Lee, G.B. Lee, Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease, *Clinical reviews in allergy & immunology*, 56 (2019) 219-233.
- [64] Z.I. Komlósi, W. van de Veen, N. Kovács, G. Szűcs, M. Sokolowska, L. O'Mahony, M. Akdis, C.A. Akdis, Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma, *Molecular aspects of medicine*, 85 (2022) 100995.
- [65] N. Akar-Ghibril, T. Casale, A. Custovic, W. Phipatanakul, Allergic endotypes and phenotypes of asthma, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 8 (2020) 429-440.
- [66] P.G. Woodruff, B. Modrek, D.F. Choy, G. Jia, A.R. Abbas, A. Ellwanger, J.R. Arron, L.L. Koth, J.V. Fahy, T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180 (2009) 388-395.
- [67] A. Licari, R. Castagnoli, I. Brambilla, A. Marseglia, M.A. Tosca, G.L. Marseglia, G. Ciprandi, Asthma endotyping and biomarkers in childhood asthma, *Pediatric allergy, immunology, and pulmonology*, 31 (2018) 44-55.
- [68] A.H.L. Abul K. Abbas, Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, 10th Edition, 2021.
- [69] W. Al-Ramli, D. Préfontaine, F. Chouiali, J.G. Martin, R. Olivenstein, C. Lemièrre, Q. Hamid, TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123 (2009) 1185-1187.
- [70] M. Raundhal, C. Morse, A. Khare, T.B. Oriss, J. Milosevic, J. Trudeau, R. Huff, J. Pilewski, F. Holguin, J. Kolls, High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans, *The Journal of clinical investigation*, 125 (2015) 3037-3050.
- [71] H. Yu, J. Yang, Q. Xiao, Y. Lü, X. Zhou, L. Xia, D. Nie, Regulation of high glucose-mediated mucin expression by matrix metalloproteinase-9 in human airway epithelial cells, *Experimental Cell Research*, 333 (2015) 127-135.
- [72] Y. Wang, Y. Shen, K. Li, P. Zhang, G. Wang, L. Gao, C. Bai, Role of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-induced mucin production in human airway epithelial cells, *Archives of biochemistry and biophysics*, 486 (2009) 111-118.

- [73] S. Kanoh, T. Tanabe, B. Rubin, IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells, *Clinical & Experimental Allergy*, 41 (2011) 1747-1756.
- [74] L. Qi, Z. Xiangdong, Y. Hongmei, N. Xiaohong, X. Xiaoyan, Regulation of neutrophil elastase-induced MUC5AC expression by nuclear factor erythroid-2 related factor 2 in human airway epithelial cells, *Journal of Investigative Medicine*, 58 (2010) 730-736.
- [75] B.M. Fischer, J.A. Voynow, Neutrophil elastase induces MUC 5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 26 (2002) 447-452.
- [76] C. Radermecker, R. Louis, F. Bureau, T. Marichal, Role of neutrophils in allergic asthma, *Current opinion in immunology*, 54 (2018) 28-34.
- [77] M. Lommatzsch, P. Julius, M. Kuepper, H. Garn, K. Bratke, S. Irmscher, W. Luttmann, H. Renz, A. Braun, J.C. Virchow, The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma, *Journal of allergy and clinical immunology*, 118 (2006) 91-97.
- [78] S. Lavinskiene, I. Bajoriuniene, K. Malakauskas, J. Jeroch, R. Sakalauskas, Sputum neutrophil count after bronchial allergen challenge is related to peripheral blood neutrophil chemotaxis in asthma patients, *Inflammation Research*, 63 (2014) 951-959.
- [79] M. Toussaint, D.J. Jackson, D. Swieboda, A. Guedán, T.-D. Tsourouktsoglou, Y.M. Ching, C. Radermecker, H. Makrinioti, J. Aniscenko, N.W. Bartlett, Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation, *Nature medicine*, 23 (2017) 681-691.
- [80] R.J. Martin, L.C. Cicutto, H.R. Smith, R.D. Ballard, S.J. Szeffler, Airways inflammation in nocturnal asthma, *American Review of Respiratory Disease*, 143 (1991) 351-357.
- [81] J. FAHY, Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation, *J Allergy Clin Immunol*, 95 (1995) 853-852.
- [82] J. Nadel, K. Takeyama, C. Agusti, Role of neutrophil elastase in hypersecretion in asthma, *European Respiratory Journal*, 13 (1999) 190-196.

- [83] M. Cundall, Y. Sun, C. Miranda, J.B. Trudeau, S. Barnes, S.E. Wenzel, Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids, *Journal of allergy and clinical immunology*, 112 (2003) 1064-1071.
- [84] I. Ventura, A. Vega, P. Chacon, C. Chamorro, R. Aroca, E. Gomez, V. Bellido, Y. Puente, M. Blanca, J. Monteseirín, Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens, *Allergy*, 69 (2014) 898-905.
- [85] J.L. Simpson, K.J. Baines, M.J. Boyle, R.J. Scott, P.G. Gibson, Oncostatin M (OSM) is increased in asthma with incompletely reversible airflow obstruction, *Experimental lung research*, 35 (2009) 781-794.
- [86] M.C. McKelvey, R. Brown, S. Ryan, M.A. Mall, S. Weldon, C.C. Taggart, Proteases, mucus, and mucosal immunity in chronic lung disease, *International journal of molecular sciences*, 22 (2021) 5018.
- [87] S. Chakraborti, J. Sarkar, P.K. Pramanik, T. Chakraborti, Role of proteases in lung disease: a brief overview, *Proteases in human diseases*, (2017) 333-374.
- [88] A.M. Vignola, A. Bonanno, A. Mirabella, L. Riccobono, F. Mirabella, M. Profita, V. Bellia, J. Bousquet, G. Bonsignore, Increased levels of elastase and α 1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157 (1998) 505-511.
- [89] A.L. MacDowell, S.P. Peters, Neutrophils in asthma, *Current allergy and asthma reports*, 7 (2007) 464-468.
- [90] A.M. Vignola, J. Kips, J. Bousquet, Tissue remodeling as a feature of persistent asthma, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105 (2000) 1041-1053.
- [91] R.E. Vandembroucke, E. Dejonckheere, C. Libert, A therapeutic role for matrix metalloproteinase inhibitors in lung diseases?, *European Respiratory Journal*, 38 (2011) 1200-1214.
- [92] M.J. Kesic, M. Hernandez, I. Jaspers, Airway protease/antiprotease imbalance in atopic asthmatics contributes to increased influenza A virus cleavage and replication, *Respiratory Research*, 13 (2012) 1-3.

- [93] M. Samsuzzaman, M.S. Uddin, M.A. Shah, B. Mathew, Natural inhibitors on airway mucin: Molecular insight into the therapeutic potential targeting MUC5AC expression and production, *Life sciences*, 231 (2019) 116485.
- [94] K. Takeyama, K. Dabbagh, H.-M. Lee, C. Agustí, J.A. Lausier, I.F. Ueki, K.M. Grattan, J.A. Nadel, Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (1999) 3081-3086.
- [95] Z. Zhu, R.J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G.P. Geba, J. Wang, Y. Zhang, J.A. Elias, Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production, *The Journal of clinical investigation*, 103 (1999) 779-788.
- [96] H. Yu, Q. Li, V.P. Kolosov, J.M. Perelman, X. Zhou, Interleukin-13 induces mucin 5AC production involving STAT6/SPDEF in human airway epithelial cells, *Cell communication & adhesion*, 17 (2010) 83-92.
- [97] S. Goenka, M.H. Kaplan, Transcriptional regulation by STAT6, *Immunologic research*, 50 (2011) 87-96.
- [98] N. Yuyama, D.E. Davies, M. Akaiwa, K. Matsui, Y. Hamasaki, Y. Suminami, N.L. Yoshida, M. Maeda, A. Pandit, J.L. Lordan, Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma, *Cytokine*, 19 (2002) 287-296.
- [99] J.D. Dickinson, J.M. Sweeter, K.J. Warren, I.M. Ahmad, X. De Deken, M.C. Zimmerman, S.L. Brody, Autophagy regulates DUOX1 localization and superoxide production in airway epithelial cells during chronic IL-13 stimulation, *Redox biology*, 14 (2018) 272-284.
- [100] J.D. Dickinson, Y. Alevy, N.P. Malvin, K.K. Patel, S.P. Gunsten, M.J. Holtzman, T.S. Stappenbeck, S.L. Brody, IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cells, *Autophagy*, 12 (2016) 397-409.
- [101] G. Zhen, S.W. Park, L.T. Nguyenvu, M.W. Rodriguez, R. Barbeau, A.C. Paquet, D.J. Erle, IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 36 (2007) 244-253.
- [102] C.A. Hewson, M.R. Edbrooke, S.L. Johnston, PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF- α , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms, *Journal of molecular biology*, 344 (2004) 683-695.

- [103] M. Perrais, P. Pigny, M.-C. Copin, J.-P. Aubert, I. Van Seuning, Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 32258-32267.
- [104] E. Gensch, M. Gallup, A. Sucher, D. Li, A. Gebremichael, H. Lemjabbar, A. Mengistab, V. Dasari, J. Hotchkiss, J. Harkema, Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 39085-39093.
- [105] R.H. Law, Q. Zhang, S. McGowan, A.M. Buckle, G.A. Silverman, W. Wong, C.J. Rosado, C.G. Langendorf, R.N. Pike, P.I. Bird, An overview of the serpin superfamily, *Genome biology*, 7 (2006) 1-11.
- [106] C. Heit, B.C. Jackson, M. McAndrews, M.W. Wright, D.C. Thompson, G.A. Silverman, D.W. Nebert, V. Vasiliou, Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily, *Human genomics*, 7 (2013) 1-14.
- [107] K. Izuhara, S. Ohta, S. Kanaji, H. Shiraishi, K. Arima, Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family, *Cellular and molecular life sciences*, 65 (2008) 2541-2553.
- [108] D.A. Lomas, D. Li-Evans, J.T. Finch, R.W. Carrell, The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver, *Nature*, 357 (1992) 605-607.
- [109] G.A. Silverman, P.I. Bird, R.W. Carrell, F.C. Church, P.B. Coughlin, P.G. Gettins, J.A. Irving, D.A. Lomas, C.J. Luke, R.W. Moyer, The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 33293-33296.
- [110] P. Pemberton, P. Stein, M. Pepys, J. Potter, R. Carrell, Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation, *Nature*, 336 (1988) 257-258.
- [111] H. Kato, T. Torigoe, Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma, *Cancer*, 40 (1977) 1621-1628.
- [112] H. KATO, T. NAGAYA, T. TORIGOE, Heterogeneity of a tumor antigen TA-4 of squamous cell carcinoma in relation to its appearance in the circulation, *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, 75 (1984) 433-435.

- [113] S.L. Smith, S.G. Watson, D. Ratschiller, M. Gugger, D.C. Betticher, J. Heighway, Maspin—the most commonly-expressed gene of the 18q21. 3 serpin cluster in lung cancer—is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions, *Oncogene*, 22 (2003) 8677-8687.
- [114] S.S. Schneider, C. Schick, K.E. Fish, E. Miller, J.C. Pena, S.D. Treter, S.M. Hui, G.A. Silverman, A serine proteinase inhibitor locus at 18q21. 3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (1995) 3147-3151.
- [115] R.C. Barnes, D.M. Worrall, Identification of a novel human serpin gene; cloning sequencing and expression of leupin, *FEBS letters*, 373 (1995) 61-65.
- [116] Y. Suminami, F. Kishi, K. Sekiguchi, H. Kato, Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors, *Biochemical and biophysical research communications*, 181 (1991) 51-58.
- [117] A. Takeda, T. Yamamoto, Y. Nakamura, T. Takahashi, T. Hibino, Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L, *FEBS letters*, 359 (1995) 78-80.
- [118] C. Schick, P.A. Pemberton, G.-P. Shi, Y. Kamachi, S. Çataltepe, A.J. Bartuski, E.R. Gornstein, D. Brömme, H.A. Chapman, G.A. Silverman, Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis, *Biochemistry*, 37 (1998) 5258-5266.
- [119] Y. Sakata, K. Arima, T. Takai, W. Sakurai, K. Masumoto, N. Yuyama, Y. Suminami, F. Kishi, T. Yamashita, T. Kato, The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 5081-5087.
- [120] C. Schick, D. Brömme, A.J. Bartuski, Y. Uemura, N.M. Schechter, G.A. Silverman, The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (1998) 13465-13470.
- [121] S. Gomes, P.I. Marques, R. Matthiesen, S. Seixas, Adaptive evolution and divergence of SERPINB3: a young duplicate in great Apes, *PLoS One*, 9 (2014) e104935.
- [122] B. Zheng, Y. Matoba, T. Kumagai, C. Katagiri, T. Hibino, M. Sugiyama, Crystal structure of SCCA1 and insight about the interaction with JNK1, *Biochemical and biophysical research communications*, 380 (2009) 143-147.

- [123] I. Schechter, Reprint of “on the size of the active site in proteases. I. Papain”, *Biochemical and biophysical research communications*, 425 (2012) 497-502.
- [124] Y. Sun, N. Sheshadri, W.-X. Zong, *SERPINB3 and B4: From biochemistry to biology*, *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier, 2017, pp. 170-177.
- [125] M. Al-Khunaizi, C.J. Luke, Y.S. Askew, S.C. Pak, D.J. Askew, S. Cataltepe, D. Miller, D.R. Mills, C. Tsu, D. Brömme, The serpin SQN-5 is a dual mechanistic-class inhibitor of serine and cysteine proteinases, *Biochemistry*, 41 (2002) 3189-3199.
- [126] D.J. Askew, Y.S. Askew, Y. Kato, C.J. Luke, S.C. Pak, D. Brömme, G.A. Silverman, The amplified mouse squamous cell carcinoma antigen gene locus contains a serpin (Serpnb3b) that inhibits both papain-like cysteine and trypsin-like serine proteinases, *Genomics*, 84 (2004) 166-175.
- [127] S. Cataltepe, E.R. Gornstein, C. Schick, Y. Kamachi, K. Chatson, J. Fries, G.A. Silverman, M.P. Upton, Co-expression of the squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in normal adult human tissues and squamous cell carcinomas, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48 (2000) 113-122.
- [128] S. Cagnin, P. Pontisso, A. Martini, *SerpinB3: A Multifaceted Player in Health and Disease—Review and Future Perspectives*, *Cancers*, 16 (2024) 2579.
- [129] J.M. Duk, H.W. de Bruijn, K.H. Groenier, H. Hollema, K.A. ten Hoor, M. Krans, J.G. Aalders, Cancer of the uterine cervix: sensitivity and specificity of serum squamous cell carcinoma antigen determinations, *Gynecologic oncology*, 39 (1990) 186-194.
- [130] Y. Suminami, S. Nagashima, A. Murakami, S. Nawata, T. Gondo, H. Hirakawa, F. Numa, G.A. Silverman, H. Kato, Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells, *Cancer research*, 61 (2001) 1776-1780.
- [131] C. Katagiri, J. Nakanishi, K. Kadoya, T. Hibino, Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase, *Journal of Cell Biology*, 172 (2006) 983-990.

- [132] S. Cannito, C. Turato, C. Paternostro, A. Biasiolo, S. Colombatto, I. Cambieri, S. Quarta, E. Novo, E. Morello, G. Villano, Hypoxia up-regulates SERPINB3 through HIF-2 α in human liver cancer cells, *Oncotarget*, 6 (2014) 2206.
- [133] F. Ciscato, M. Sciacovelli, G. Villano, C. Turato, P. Bernardi, A. Rasola, P. Pontisso, SERPINB3 protects from oxidative damage by chemotherapeutics through inhibition of mitochondrial respiratory complex I, *Oncotarget*, 5 (2013) 2418.
- [134] S. Cannito, B. Foglia, G. Villano, C. Turato, T. C Delgado, E. Morello, F. Pin, E. Novo, L. Napione, S. Quarta, SerpinB3 differently up-regulates hypoxia inducible factors-1 α and-2 α in hepatocellular carcinoma: mechanisms revealing novel potential therapeutic targets, *Cancers*, 11 (2019) 1933.
- [135] K. Mitsuishi, T. Nakamura, Y. Sakata, N. Yuyama, K. Arima, Y. Sugita, H. Suto, K. Izuhara, H. Ogawa, The squamous cell carcinoma antigens as relevant biomarkers of atopic dermatitis, *Clinical & Experimental Allergy*, 35 (2005) 1327-1333.
- [136] H. Kawashima, S. Nishimata, Y. Kashiwagi, H. Numabe, M. Sasamoto, H. Iwatsubo, K. Takekuma, A. Hoshika, Squamous cell carcinoma-related antigen in children with atopic dermatitis, *Pediatrics International*, 42 (2000).
- [137] U. Sivaprasad, K.G. Kinker, M.B. Ericksen, M. Lindsey, A.M. Gibson, S.A. Bass, N.S. Hershey, J. Deng, M. Medvedovic, G.K.K. Hershey, SERPINB3/B4 contributes to early inflammation and barrier dysfunction in an experimental murine model of atopic dermatitis, *Journal of Investigative Dermatology*, 135 (2015) 160-169.
- [138] C. Bürgler, D. Dutoit, S. Radonjic-Hoesli, K. Thormann, M. Lehmann, S. Yousefi, H.U. Simon, D. Simon, Dupilumab normalizes correlates of lysosomal function in atopic dermatitis, *JEADV Clinical Practice*, 3 (2024) 478-486.
- [139] S. Tian, J.G. Krueger, K. Li, A. Jabbari, C. Brodmerkel, M.A. Lowes, M. Suárez-Fariñas, Meta-analysis derived (MAD) transcriptome of psoriasis defines the “core” pathogenesis of disease, (2012).
- [140] A. Takeda, D. Higuchi, T. Takahashi, M. Ogo, P. Baciú, P.F. Goetinck, T. Hibino, Overexpression of serpin squamous cell carcinoma antigens in psoriatic skin, *Journal of investigative dermatology*, 118 (2002) 147-154.

- [141] C. Katagiri, T. Iida, J. Nakanishi, M. Ozawa, S. Aiba, T. Hibino, Up-regulation of serpin SCCA1 is associated with epidermal barrier disruption, *Journal of dermatological science*, 57 (2010) 95-101.
- [142] O.-J. Iversen, H. Lysvand, G. Slupphaug, Pso p27, a SERPINB3/B4-derived protein, is most likely a common autoantigen in chronic inflammatory diseases, *Clinical Immunology*, 174 (2017) 10-17.
- [143] K. Izuhara, The role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis, (2003).
- [144] N. Nishi, M. Miyazaki, K. Tsuji, T. Hitomi, E. Muro, M. Zaitzu, S. Yamamoto, S. Inada, I. Kobayashi, T. Ichimaru, Squamous cell carcinoma-related antigen in children with acute asthma, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 94 (2005) 391-397.
- [145] U. Sivaprasad, D.J. Askew, M.B. Ericksen, A.M. Gibson, M.T. Stier, E.B. Brandt, S.A. Bass, M.O. Daines, J. Chakir, K.F. Stringer, A nonredundant role for mouse Serpinb3a in the induction of mucus production in asthma, *Journal of allergy and clinical immunology*, 127 (2011) 254-261. e256.
- [146] C. Karaaslan, E. Birben, O. Keskin, U. Sahiner, C. Sackesen, O. Kalayci, The role of SCCA1 in asthma related physiological events in the airway epithelium and the effect of promoter variants on asthma and gene function, *Respiratory medicine*, 107 (2013) 368-379.
- [147] A.Y. Chang, V. Chau, J.A. Landas, Y. Pang, Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation, *JEMI methods*, 1 (2017).
- [148] M. Pilarek, E. Brand, F. Hillig, M. Krause, P. Neubauer, Enhanced plasmid production in miniaturized high-cell-density cultures of *Escherichia coli* supported with perfluorinated oxygen carrier, *Bioprocess and biosystems engineering*, 36 (2013) 1079-1086.
- [149] H.A. Bilgic, B. Kilic, B.D. Kockaya, B.E. Sarac, A.K. Suloglu, O. Kalayci, C. Karaaslan, Oxidative stress stimulation leads to cell-specific oxidant and antioxidant responses in airway resident and inflammatory cells, *Life sciences*, 315 (2023) 121358.
- [150] D. Karaguzel, B.E. Sarac, H. Akel Bilgic, G.Y. Summak, M.A. Unal, O. Kalayci, C. Karaaslan, House dust mite-derived allergens effect on matrix metalloproteases in airway epithelial cells, *Experimental lung research*, 47 (2021) 436-450.

- [151] C. Karaaslan, D. Karaguzel, B.E. Sarac, C. Sucularli, H.A. Bilgic, O. Kalayci, The expression profile of protease inhibitors in the airway epithelial cells after allergen (Der p 1) stimulation, *International Archives of Allergy and Immunology*, 183 (2022) 25-33.
- [152] S.W. Wingett, S. Andrews, FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control, *F1000Research*, 7 (2018) 1338.
- [153] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, 29 (2013) 15-21.
- [154] Y. Liao, G.K. Smyth, W. Shi, featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, 30 (2014) 923-930.
- [155] M.I. Love, W. Huber, S. Anders, Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome biology*, 15 (2014) 1-21.
- [156] J. Zhao, B. Maskrey, S. Balzar, K. Chibana, A. Mustovich, H. Hu, J.B. Trudeau, V. O'Donnell, S.E. Wenzel, Interleukin-13–induced MUC5AC is regulated by 15-lipoxygenase 1 pathway in human bronchial epithelial cells, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179 (2009) 782-790.
- [157] Y. Qin, Y. Jiang, A.S. Sheikh, S. Shen, J. Liu, D. Jiang, Interleukin-13 stimulates MUC5AC expression via a STAT6-TMEM16A-ERK1/2 pathway in human airway epithelial cells, *International Immunopharmacology*, 40 (2016) 106-114.

EKLER

EK-1 Okuma Kaliteleri

