

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GRAM POZİTİF BAKTERİYEL TOKSİNLERİN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDEKİ TOLL BENZERİ RESEPTÖRLERE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Melek YAMAN

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Turgut İMİR

ANKARA

Ağustos 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller Dizini	VI
Grafikler Dizini	VII
Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. a. Doğal İmmünite	3
2. b. Toll Benzeri Reseptörler	4
2. b.1.a. TLR-1, TLR-2 ve TLR-6	6
2. b.1.b. TLR-2'nin TLR-1 ve TLR-6 İle İşbirliği	6
2. b.2.a. TLR-3	8
2. b.2.b. Virüslerin TLR 3 Aracılığı ile Tanınması	8
2. b.3.a. TLR-4	9
2. b.3.b. TLR 4'ün Diğer Ligantları	12
2. b.4 TLR-5	14
2. b.5. TLR-7 ve TLR-8	14
2. b.6. TLR – 9	17
2. b.7. En Son Keşfedilen Toll Benzeri Reseptörler	
	II

TLR-10 ve TLR-11	18
2. c. TLR' lerin Sinyal İletim Yolu	19
2. d. TLR ve Edinsel İmmünite	21
2. e. Kök Hücre Nedir?	23
2. e.1. Embriyonik Kök Hücreler	24
2. e.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	25
2. e.2.a. Mezenkimal Kök Hücreler	25
2. f. Stafilokokal Enterotoksin B	28
2. g. Difteri Toksini	29
2. h. MTT Testi	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3. a. Gereçler	32
3. a. 1. Cihazlar	32
3. a. 2. Kimyasallar	33
3. a. 3. Diğerleri	34
3. b Yöntemler	35
3. b. 1 Mezenkimal Kök Hücre Serisi	35
3. b.1. a. Hücrelerin Pasajı	35
3. b. 1. b. Hücre Sayımı ve Canlılığın Belirlenmesi	36
3. b. 2. MTT Testi	37
3. b. 2. a. MTT Test Yöntemi	37
3. b. 3. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Toksinler İle Uyarılmasından PE (Fikoeritrin) İle İşaretli Anti- Human Toll Like Antikorları İle Boyanması	38

3. b. 3. a Mezenkimal Kök Hücrelerinin Difteri Toksini İle Uyarılması ve PE (Fikoeritrin) İle İşaretli Anti- Human Toll Like Antikorları İle Boyanması	38
3. b. 3. b. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılması ve PE (Fikoeritrin) İle İşaretli Anti- Human Toll Like Antikorları İle Boyanması	40
3. c. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. MTT Testi Sonuçları	41
4.1. a. Difteri Toksinin Hücre Canlılığına Etkisi	41
4.1. b. Stafilokokal Enterotoksin B'nin Hücre Canlılığına Etkisi	42
4.2. a. Difteri Toksininin TLR İfadelenmesine Etkisi	43
4. 2. b. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-1 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	44
4. 2. c. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-2 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	45
4. 2. d. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-3 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	46
4. 2. e. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-4 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	47
4. 2. f. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-8 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	48
4. 2. g. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-9 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	49

4. 3. a. Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR İfadelenmesine Etkisi	50
4. 3.b. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-1 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	51
4. 3. c. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-2 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	52
4. 3. d. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-3 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	53
4. 3. e. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-4 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	54
4. 3. f. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-8 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	55
4. 3. g. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-9 İfadelenmesinin Karşılaştırılması	56
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	61
7. ÖZET	62
8.SUMMARY	63
9. KAYNAKÇA	64
10.ÖZGEÇMİŞ	73
TEŞEKKÜR	74

ŞEKİLLER

Şekil 1: İnsan Toll Benzeri Reseptörünün Yapısı	5
Şekil 2: LPS'nin Yapısı	10
Şekil 3: TLR 4'ün LPS ile Aktive Edilmesi	11
Şekil 4: TLR-7 ve TLR-8'in Doğal Ligantları	16
Şekil 5: Toll Benzeri Reseptörlerin Sinyal İletim Yolu	20
Şekil 6: Toll Benzeri Reseptörler ve Edinsel İmmünite	22
Şekil 7 : Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşması İle Oluşan Hücreler	26
Şekil 8: Kemik İliğinden Meydana Gelen Hücreler	26
Şekil 9: Difteri Toksininin TLR-1 İfadelenmesine Etkisi	44
Şekil 10: Difteri Toksininin TLR-2 İfadelenmesine Etkisi	45
Şekil 11: Difteri Toksininin TLR-3 İfadelenmesine Etkisi	46
Şekil 12: Difteri Toksininin TLR-4 İfadelenmesine Etkisi	47
Şekil 13: Difteri Toksininin TLR-8 İfadelenmesine Etkisi	48
Şekil 14: Difteri Toksininin TLR-9 İfadelenmesine Etkisi	49
Şekil 15: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-1 İfadelenmesine Etkisi	50
Şekil 16: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-2 İfadelenmesine Etkisi	51
Şekil 17: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-3 İfadelenmesine Etkisi	52
Şekil 18: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-	

İfadelenmesine Etkisi	53
Şekil 19: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-8	
İfadelenmesine Etkisi	54
Şekil 20: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-9	
İfadelenmesine Etkisi	55

GRAFİKLER

Grafik 1: Difteri Toksini ile Uyarılan MKH'lerdeki Canlılık Oranı	41
Grafik 2: Stafilokokal Enterotoksin B ile Uyarılan	
MKH'lerdeki Canlılık Oranı	42

KISALTMALAR

ASH	Antijen Sunucu Hücreler
cDC	Konvensiyonel Dentritik Hücre
CD	Ayırım Kümesi (Cluster Of Differentiation)
CFU-F	Fibroblast Kolonisi Yapan Ünit
CTL	Sitolitik T Lenfositleri
CpG	Sitidin –Fosfat –Guanozin
ds RNA	Çift İplikli RNA
GPI	Anchor Glikosilfosfotidil İnositol
HSP	Isı Şok Proteini
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
LAM	Lipoarabinomannan
LBP	LPS Bağlayıcı Protein
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteikoik Asit
LRR	Lösinden Zengin Tekrar Bölgeleri
MD-2	Myeloid Differentiation Protein 2
MHC	Majör Histokompatibilite
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
MPH	Mezenkimal Progenitör–Öncül Hücreler
NF-kB	Sitozolik Nükleer Faktör kB
ODN	Oligodeoksinükleotitler
PAMP	Patojen İle İlişkili Moleküler Yapılar
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu

PDC	Plazmasitoid Dentritik Hücreler
PRR	Patern Tanıyan Reseptörler
PGN	Peptidoglikan
Poly I: C	Polyinosinic: Polycytidylic Acid
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Rreaksiyonu
S.E.B	Stafilokokal Enterotoksin B
si RNA	Small İnterfering RNA
ss RNA	Tek İplikli RNA
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
TNF	Tümör Nekrozis Faktör

1.GİRİŞ

Toll benzeri reseptörler (TLR) doğal immün sistemde, patern tanıyan reseptörler (PRR) olarak görev yapan bir reseptör ailesidir. Bu reseptörler, monosit, makrofaj, nötrofiller, dentritik hücreler, endotel hücreleri gibi pek çok hücrede ifadelenmektedirler.¹ Bu reseptörler patojen ile ilişkili moleküler yapıları (PAMP) tanır ve bir dizi hücre içi sinyal basamağı oluşturarak immün sistemi aktive ederler.^{2,3,4,5}

İnsanlarda TLR ailesinin 10 adet aktif üyesi (TLR1–TLR10) farelerde ise 13 üyesi tanımlanmıştır. TLR'ler hücrede buldukları yere göre sınıflandırılabilir. TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9 hücre içerisindeki endozomlarda ifadelenirken (ekspresse olurken), TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 ve TLR-6 genellikle hücre yüzeyinde ifadelenirler.^{6,7}

Hücre içerisindeki TLR'ler genellikle virüs kaynaklı nükleik asitleri tanırlar. Örneğin TLR-3 virüs kaynaklı (ds)RNA ve RNA'nın sentetik bir analogu olan Poly (I:C) molekülünü tanır. Hücre yüzeyinde bulunan TLR'ler ise lipopolisakkarit (TLR-2 ve TLR4), lipoprotein, peptidoglikan (TLR-1, TLR-2, TLR-6), flagella (TLR-5) gibi pek çok mikrobiyal yapıyı tanırlar.⁸

Kök hücreleri, kendini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. 1970'lerde Friedenstein ve arkadaşlarının tanımladığı mezenkimal kök hücreler daha çok kemik iliğinde bulunsalar da, periferik kan, adipoz doku, deri dokusu, Kemik trabeküler dokusu, kordon kanı, plasenta, Wharton jeli, amnion mayi, snovyal membran, karaciğer ve diğten de elde edilebilmektedir.^{9,10}

Kemik iliği öncü hücrelerinden olan MKH'lerin hematopoezi desteklediği bilinmekte fakat bu hücrelerin doğal immünite ve inflamasyon ile ilgisi henüz kanıtlanamamıştır. Bu ilişkinin açıklanabilmesi için kök hücrelerin reseptörleri, farklılaşma mekanizmaları özellikle MKH'lerin ifade ettiği Toll Benzeri Reseptörler araştırmacıların ilgisini çekmektedir. ^{1,10} Ayrıca kök hücrelerde ifadelenen TLR'lerin bu hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynadığı düşünölmektedir.¹¹

Çalışmamızın amacı difteri toksini ve Stafilokokal Enterotoksin B'nin insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri canlılığına etkisini araştırmak ve bu toksinlerin hücrelerdeki TLR ifadelenmesine herhangi bir etkisi olup olmadığını, özgül antikolar kullanarak akış sitometrisi yöntemi ile incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2. a. Doğal İmmünite

İmmünite, vücudun hastalıklara karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem adı verilir, bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroplara karşı düzenli olarak verdikleri tepkiye de immün yanıt denir.^{12,13}

Konak savunma mekanizması, enfeksiyonlara karşı ilk koruyucu engeli oluşturan 'doğal immünite' ve sonrasında daha yavaş olarak devreye giren ancak enfeksiyonlara karşı daha etkili savunma sağlayan 'edinsel (adaptif) immüniteyi' kapsar. Doğal immünite (doğuştan immünite) terimi, mikropların girişini engelleyen ve konak dokulara girmeyi başaran mikropları yok eden konak savunmasının sağlıklı bireylerde her zaman bulunduğunu belirtir. Edinsel immünite (adaptif, özgül veya kazanılmış immünite) dokuları istila eden mikroplarla harekete geçen bir tip savunma mekanizmasıdır, bu nedenle istilacı mikroplara göre uyarılmaktadır.^{12,13,14,15}

Doğal bağışıklığın yapıtaşları, konak hücrede bulunmayan, buna karşın farklı mikroorganizmalar üzerinde ortak olarak bulunan yapıları tanırlar. Doğal bağışıklığın tüm yapı taşları çok çeşitli bakteri, virüs veya mantarları tanıma özelliğine sahiptirler. Örneğin fagositik hücreler, birçok bakteri hücrelerinin ortak olarak sahip olduğu ancak memeli hücrelerinde bulunmayan bakteri lipopolisakkaritleri (LPS veya endotoksin) için reseptörler taşırlar. Fagositik hücreler, memeli hücrelerinin sahip olmadığı ancak birçok virüste görülen çift zincirli RNA yapısını; ayrıca yine memelilerin DNA'sında görülmeyen ancak bakteri DNA'sının yapısında yer alan metillenmiş CpG nükleotidlerini tanırlar.^{5,16,17}

Doğal bağışıklığın hedefi olan mikrobiyal moleküllere, aynı tip mikroorganizmalar üzerinde bulunmaları nedeni ile 'moleküler örgüler' (pattern) adı verilir.

Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, virüsler ve funguslar 'patojen ile ilişkili moleküler örgüler' (PAMP) olarak adlandırılan özgün, oldukça korunmuş (sabit) hücre duvarı moleküllerine veya nükleik asit dizilerine sahiptir.

Mikroorganizmadaki PAMP'ler başta antijen sunan hücreler olmak üzere doğal immün sistem içerisinde yer alan hücrelerin yüzeyinde bulunan 'patern tanıyan reseptörler' (pattern recognition receptors [PRRs]) olarak adlandırılan reseptörler tarafından tanınır ve bu reseptörlere bağlanır.^{2,3,5,4,18,19}

Mikroorganizmaların PAMP'leri doğal immün sistem hücrelerindeki PRR'ler tarafından tanındığında doğal immün sistem cevabı gelişir. PRR'ler yapısal olarak farklı proteinlerdir ve birkaç reseptör ailesini oluştururlar.²⁰

Bu reseptörler üç gruba ayrılmaktadır

1-Endositik

2-Sekrete edilen

3-Sinyal ileten²⁰

2. b. Toll Benzeri Reseptörler

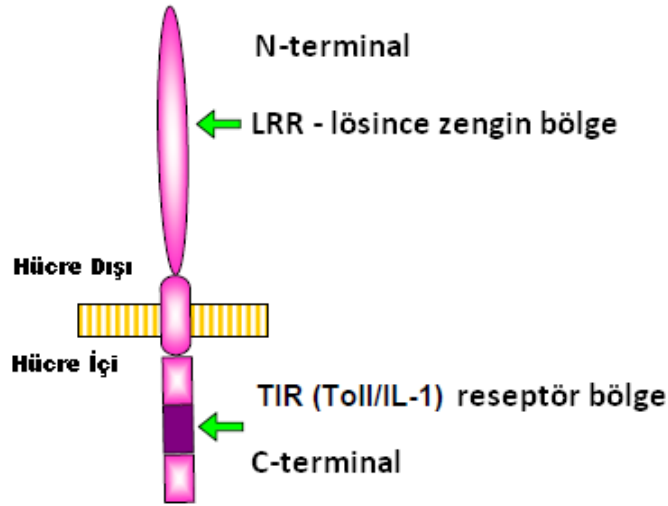
Toll Benzeri Reseptör (TLR) ailesi sinyal ileten reseptör grubudur. TLR'ler, PAMP'ler ile bağlandığında, TLR'lerin intrasitoplazmik domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenir. Dendritik

hücrelerin maturasyonu ve antijen sunum kapasitesindeki artışla da doğal immün sistem adaptif immün sistemi uyarır.^{2,4,21,22}

İlk kez *Drosophila* türünde, embriyonal gelişim basamaklarında rol aldığı bilinen bir reseptör olarak tanımlanan ve daha sonra mutant olan sineklerde fungal enfeksiyonlara yatkınlık oluşturduğu fark edilerek, immün sistem cevabında fonksiyonu olduğu düşünülen reseptöre 'toll' adı verilmiştir.

Ancak 1997 yılında insan homoloğu tariflenmiş ve şaşırtıcı bir şekilde doğal immün sistemin parçası olduğu görülmüştür.^{6,16,23,24}

Bir grup PRR olan ve patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahip olan TLR'ler karakteristik olarak ekstraselüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler toll/interlökin (IL)-1 reseptör (TIR) domaininden oluşur. Bazı TLR'ler hücre yüzeyinde ifade olunurken, bazıları da endositik veziküllerin membranlarında ya da intraselüler organellerin yüzeyinde ifade olurlar.^{6,22,23,25,26,27}



Şekil 1: İnsan Toll Benzeri Reseptörünün Yapısı

Günümüzde, memelilerde 13 tane TLR (insanlarda ifadelenen 10 adet) tanımlanmıştır. Her bir TLR'nün ligand özgüllüğü farklıdır. İlk tanımlanan TLR-1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden insanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR-4 olmuştur. ²⁴

2. b. 1. a. TLR-1, TLR-2 ve TLR-6

TLR-2, farklı mikroorganizmalardaki çok sayıda bileşeni tanımaktadır. Çeşitli patojenlerin lipoproteinlerini, lipopeptitlerini, Gram pozitif bakterilerde bulunan peptidoglikan (PGN) ve lipoteikoik asit (LTA), mikobakterideki lipoarabinomannan (LAM), *Trypanosoma cruzi*'de glikosilfosfotidillinositol (GPI anchor), maya hücre duvarından zimosan, *Staphylococcus epidermidis*'de modulin, *Treponema maltophilum*'da glikolipitleri tanımaktadır. Ayrıca son yapılan araştırmalarda TLR-2'nin *Leptospira interrogans* ve *Helicobacter pylori* gibi non-enterik bakterilerdeki lipopolisakkariti (LPS) tanıdığı rapor edilmiştir. Bu bakterilerde bulunan LPS Gram negatif bakterilerde bulunan ve TLR-4 tarafından tanınan tipik LPS'den yapısal olarak farklıdır. Bu LPS'nin lipit A bileşkenindeki açıl zincirleri sayısı farklıdır. ^{21,26,28,29,30}

2. b. 1. b. TLR-2 'nin TLR-1 ve TLR-6 İle İşbirliği

TLR-2'nin bu kadar çok mikrobiyal yapıyı tanıması ile ilgili çeşitli görüşler vardır. TLR-2 ile ilgili bir görüş şöyle demektedir. TLR-2 'nin ligantlarını tanıması TLR ailesinin diğer üyelerinden TLR-1 ve TLR-6 ile heterofilik dimerler oluşturmasıyla gerçekleşmektedir. ¹³

TLR-6'nın rolü RAW264.7 makrofaj hücre kültüründe yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Peptidoglikan ve *S.aureus* tarafından salgılanan modulin RAW264.7 makrofaj kültüründe TNF- α salınımını

uyarmaktadır. Fakat bu salınım, dominant negatif TLR-6 olan RAW264.7 makrofaj kültüründe baskılanmaktadır.

TLR-6 geni baskılanmış farelerdeki çalışmalar göstermiştir ki mikrobiyal lipopeptitlerin tanınmasında TLR-2 ve TLR-6 fonksiyonel olarak iş birliği yapmaktadır.

TLR-6 geni baskılanmış farelerin makrofajlarında, mycoplasmadan kaynaklı diaçil lipopeptitlerden dolayı meydana gelmesi gereken sitokinler üretilmemektedir. Oysaki bu hücreler Gram negatif bakterilerin triaçil lipopeptitlerinden dolayı kaynaklanan inflamasyon sitokinlerini normal olarak üretmektedirler. Karşıt olarak TLR-1 geni baskılanmış farelerin makrofajlarında mycoplasmanın diaçil lipopeptitlerinde dolayı meydana gelmesi gereken inflamasyon sitokinleri üretilmiş fakat triaçil lipopeptitten kaynaklanan enfeksiyonda normal olarak meydana gelmesi gereken cevap gerçekleşmemiştir. TLR-2 geni baskılanmış farelerin makrofajlarında ise bu iki lipopeptide karşı hiçbir yanıt meydana gelmemiştir.

Bu sonuç göstermektedir ki TLR-1 ve TLR-6 diaçil ve triaçil lipopeptitlerin ayırımı için fonksiyonel olarak TLR-2 ile ilişkilidir.^{6,13,21,31,32}

TLR-2 ile ilgili başka bir görüşte şöyledir. Bu ikinci görüş TLR-2'nin fungal komponentleri tanınması ile ilgilidir. Bu modelde TLR-2, dektin-1, a lektin ailesi reseptörleri ile fonksiyonel olarak iş birliği yapmakta ve fungal hücre duvarı komponenti olan β -glukan'ı tanımaktadır.

Böylece TLR-2'nin bu kadar çok çeşit mikrobiyal yapıyı tanınmasının, farklı proteinler ile iş birliği yapmasından kaynaklandığı gösterilmiştir.^{6,13}

2. b. 2. a. TLR-3

Çift iplikli (ds) RNA, tek iplikli (ss) RNA, DNA gibi virüs nükleik asitleri pek çok PRR tarafından tanınmaktadır. Bu viral nükleik asitlerin PRR'ler tarafından tanınmasından sonra hücre içerisinde bir dizi sinyal iletim sistemi aktif hale gelerek, içlerinde IFN α , IFN β , IFN ω , IFN ϵ , IFN κ gibi Tip I interferon içeren pek çok sitokin sentezlenmektedir. Ayrıca bu uyarım sonunda IL-6, TNF α , L-12 gibi inflamatuvar sitokinler de sentezlenmektedir. Özellikle Tip I interferon virüslerin elimine edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. ^{33,34}

Virüslerin tanınması ile ilgili olarak en iyi karakterize edilmiş PRR ailesi Toll Benzeri Reseptör ailesidir.

2. b. 2. b. Virüslerin TLR 3 Aracılığı ile Tanınması

(ds)RNA'nın TLR-3 aracılığı ile tanındığını gösteren çalışmalar TLR-3 olmayan fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Yapılan bu çalışmalar TLR-3 eksik farelerde, virüsten kaynaklı (ds) RNA ve (ds) RNA'nın bir sentetik analogu olan PolyIC'den dolayı meydana gelmesi gereken tip I interferon ve inflamatuvar sitokinlerinin üretiminde düşüş olduğu gösterilmiştir. ^{33,35,36,37,38}

Ayrıca TLR-3'ün solunum sinsityal virüs (RSV), ansefalomiyokardit virüs (EMCV) ve Batı Nil Virüsü (WNV) gibi (ss)RNA virüslerinin replikasyonları sırasında meydana gelen (ds) RNA moleküllerini tanımakla ilişkili olduğu söylenmektedir. Son çalışmalar sonucunda TLR-3'un (si)RNA'nın (small interfering RNA) tanınmasında da ilişkili olduğu gösterilmiştir. ^{13,21,33,39}

TLR-3 konvensiyonel dentritik hücreler (cDCs), makrofajlar gibi immün hücrelerde ifadenmelerinin yanı sıra fibroblastlar, epitel hücreleri gibi non-immün hücrelerde de ifade olurlar.

Yapılan son çalışmalardan birinde gösterilmiştir ki TLR-3 santral sinir sisteminde de bulunmaktadırdır. Santral sinir sistemindeki glial hücrelerinde yüksek miktarda TLR-3 ifade edilmektedir. TLR-3'n santral sinir sisteminde bulunmasının nöral yaralanmalarda ve viral enfeksiyonlara karşı önemli bir rol oynadığı dşnlmektedir. (34) TLR-3 dentritik hücreler, fibroblastlar, epitel hücrelerde intraselüler veziküllerde lokalize olmaktadır. Nöral hücrelerde de TLR-3 intraselüler kısımdadır fakat intraselüler lokalizasyonu kesin olarak bilinmemektedir. ^{33,35}

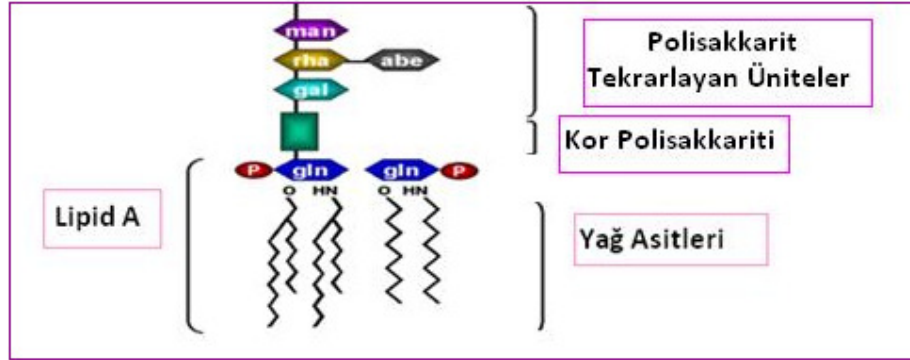
2. b. 3. a. TLR-4

İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR olan TLR-4 LPS'nin tanınmasında rol almaktadır. TLR-4 Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS'nin tanınmasında işlevi olan esas reseptördür. Gram negatif hücre duvarında bulunan LPS 3 bölümden meydana gelmiştir.²¹

Lipit A: Uzun zincirli yağ asitlerine tutunmuş, fosfor bağları taşıyan glikozamin disakkarit ünitelerinden oluşmuştur. Lipit A'da on dört karbonlu yağ asidi olan - hidroksimiristik asit daima bulunur. Diğer yağ asitleri bakteri türüne göre değişir.

Kor: Polisakkarit yapısında olup tüm gram negatif bakterilere göre değişiklik gösterir.

Polisakkarit: Lineer trisakkarit, dallı tetrasakkarit ya da pentasakkarit yapısında tekrarlayan ünitelerden oluşur ve kora bağlanır. Polisakkaritler tre özgüdürler ve bakterinin zgl O antijenini (somatik antijen) oluştururlar.



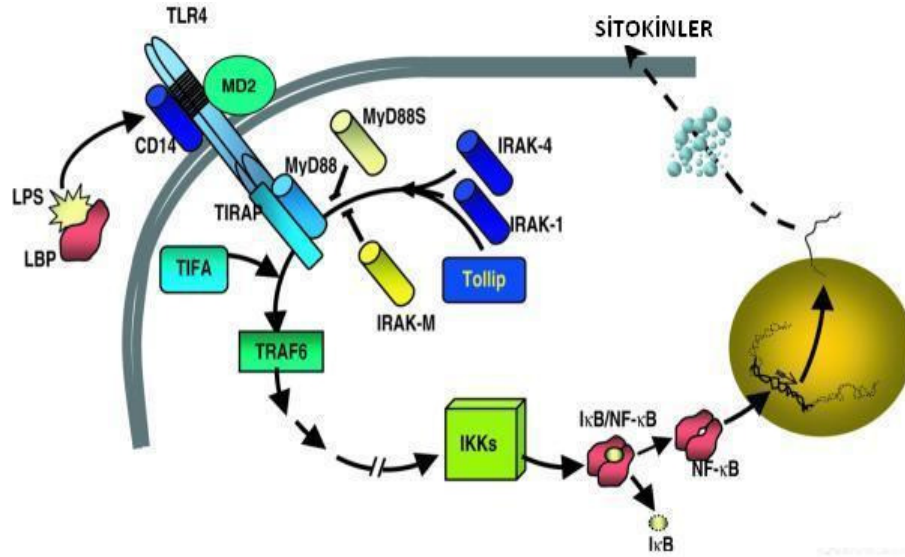
Şekil 2: LPS'nin Yapısı

LPS insanlar ve hayvanlar için oldukça toksiktir ve gram negatif bakterilerin endotoksini olarak isimlendirilir. Çünkü hücre yüzeyine sıkıca bağlanır ve yalnızca hücre parçalandığında açığa çıkar. Endotoksinler ateş, şok ve ölüm tablolarına neden olabilirler.

LPS, Lipit A ve polisakkaritlere ayrıştığında toksisitenin tümü Lipit A kısmına aittir. Polisakkarit bölüm ise bakterinin O antijen olarak isimlendirilen majör yüzey antijenidir.⁴⁰

2 fare türü C3H / HeJ ve C57BL / ScCr' nin LPS'nin tanınmasında çok düşük duyarlı olduğu bilinmektedir. İki farklı araştırmacı grubun çalışmaları sonucu, bu düşük duyarlılığa *Tlr4* genindeki bir mutasyonun neden olduğu gösterilmiştir. C3H / HeJ türünde *Tlr4* genindeki bir nokta mutasyon sonucunda prolin histidinle yer değiştirmiş bu değişim de TLR4'ün intraselüler kısmında değişikliğe neden olmuştur. Bu mutasyonun sonucunda dominant negatif alleller meydana gelmiş ve LPS'nin neden olduğu ve TLR-4 aracılığı ile meydana gelen sinyal iletimi baskılanmıştır. Diğer tür C57BL / ScCr de ise *Tlr4* geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu (null mutasyon) gen işlevini tamamen kaybetmiştir.^{13,21,29,32,41}

LPS'nin, TLR-4 aracılı ile tanınmasında 3 farklı ekstraselüler protein de iş görmektedir. Bu proteinler LPS bağlayıcı protein (LBP), CD14, MD-2 (myeloid differentiation protein 2) proteinleridir. TLR-4 fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD-2 ve LPS-bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturmakta ve bu moleküllerden herhangi birisi eksik olan farelerde LPS'ye karşı gelişen immün cevabının da eksik olduğu gözlenmektedir. Kanda bulunan LPS hemen LBP ile yakalanır. LPS-LPB kompleksi makrofajların yüzeyinde lokalize olmuş CD14 molekülüne bağlanır. CD14, MD-2 molekülü ile kopleks oluşturur. MD-2 kompleks TLR-4'e bağlanır ve TLR-4'ü aktive eder.^{6,32,42}



Şekil 3 : TLR-4'ün LPS ile Aktive Edilmesi

Böylece hücre içi sinyal iletim yollarını aktive edilerek sitozolik nükleer faktör kB (NF-kB)'nin aktivasyonunu sağlar. Aktive NF-kB sitoplazmadan nükleusa giderek sitokinlerin transkripsiyonu başlatan

bölgelere bağlanır, tümör nekrozis faktör-a (TNF-a) ve interlökin-1b (IL-1b) gibi proenflamatuar sitokinlerin ve IL-10 gibi antienflamatuar sitokinlerin transkripsiyonunu artırır. TNF-a ve IL-1b adaptif immün cevabı aktive ederler ancak konakta direkt ve indirekt hasara da neden olurlar Proenflamatuar sitokinler, nötrofiller ve endotel hücreleri üzerindeki adezyon moleküllerinin de ifadelenmesini artırır. ⁴³

2. b. 3. b. TLR 4 'ün Diğer Ligantları

TLR-4'ün LPS'nin dışında, birçok molekülü tanıyabildiği bilinmektedir.

TLR-4, *Taxus brevifolia* (pasifik porsuğu) tarafından üretilen Taxol denilen bir molekülü tanımaktadır. Taxol, insanlarda anti-tümoral aktiviteye sahip bir maddedir. Taxol'un anti-mitotik aktivitesi mikrotübüllere bağlanması ve onları stabil hale getirerek mitozu durdurması ile gerçekleşmektedir. LPS'nin tanınmasında olduğu gibi Taxol, farelerde TLR-4 ve MD2 işbirliği ile tanınmaktadır. İnsanlarda bu tanıma gerçekleşmez. ^{16,21}

TLR-4 tarafından tanınan diğer bir yabancı molekül respiratuar sinsityal virüsün füzyon proteini (F protein)'dir. Füzyon proteininin tanınmasında CD14'de iş görmektedir. TLR-4 tarafından mutant olan C3H/HeJ ve C57BL /10ScNcr fare türlerinde respiratuar sinsityal virüslere karşı inflammatuar yanıtın düşük olduğu gösterilmiştir. Fare meme tümör virüsü gibi faregillere ait olan bazı virüslerden kaynaklı olarak meydana gelen B hücrelerinin aktivasyonunda da TLR-4'un etkili olduğu söylenmektedir. Bu sonuçlar göstermektedir ki belli bir grup virüsün tanınmasında TLR-4 iş görmektedir. ^{13,21}

TLR-4 bazı endojen kaynaklı ligantları da tanımaktadır. Örneğin hem endojen hem de mikrobiyal kaynaklı ısı şok protein 60 ve ısı şok

proteini 70'i [(HSP60) (HSP70)] TLR-4'ün tanınması sonucunda inflamatuvar sinyal oluşturduğu gösterilmiştir. Isı şok proteinleri çeşitli stres uyarılarına cevap olarak bütün canlıların hücreleri tarafından üretilen bir grup proteindir. Bu proteinler evrimsel süreçte bakterilerden memelilere kadar korunmuş proteinlerdir. Isı şok proteinlerinin, ortak özellikleri, hücrelerin ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri, glukoz düzeylerinde değişiklik, ultraviyole radyasyon, bakteriyel ve viral enfeksiyon gibi çeşitli stres koşullarına maruz kaldıkları zaman üretilmeleridir. Isı şok proteinleri makrofaj ve dentritik hücreleri aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin ve ko-sitimülator moleküllerin ifadelmelerini artırırlar. Başlangıçta bakteri ısı şok proteinlerine karşı oluşan immün cevap, zaman içinde konağın kendisine yönlenebilir.

İmmün sistemi en iyi aktive eden ısı şok proteini HSP60'dır. HSP60 bu aktivitesini TLR-4 aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu TLR-4 bakımından eksik olan farelerde ısı şok proteini 60 yüzünden meydana gelmesi gereken inflamasyon stokinlerinin üretiminin yetersiz olduğu gösterilmiştir. ^{6,13,31,32}

TLR-4 üzerinden sinyal ileten bir başka endojen ürün fibronektinin ekstra domain A (EDA) bölgesidir. Ayrıca hiyalüronik asitteki düşük moleküler ağırlıklı oligosakkaritlerin de dentritik hücreleri TLR-4 aracılığı ile aktive ettiği, heparan sülfatın polisakkarit fragmentlerinin, dentritik hücrelerin maturasyonunu TLR-4 aracılığı ile uyardığı rapor edilmiştir. Fakat şu vurgulanmalıdır ki yukarıda belirtilen bütün endojen TLR-4 ligantlarının immün sistem hücrelerini aktive edebilmesi için çok yüksek konsantrasyonlarda olması gerekmektedir. Düşük konsantrasyonlarda aktivasyon gerçekleşmemektedir. ^{13,15,21}

2. b. 4. TLR-5

TLR-5, bakteriyel flajellanın, temel yapısal bir komponenti olan bakteriyel flajellini tanımaktadır. Flajellin, proteini 'H antijeni' olarak adlandırılır ve bakteri türüne göre değişiklik gösterir.⁴⁰

TLR-5 ifade eden hücreler flagellin ile uyarıldıktan sonra, hücre içerisinde gerçekleşen bir dizi reaksiyon sonucu inflamatuvar sitokinlerin üretimi uyarılır.

TLR-5 epitel hücrelerde, endotel hücrelerde, makrofaj ve dentritik hücrelerde ifade olmaktadır. İntestinal epitel hücrelerinde basolateral kısımda ifade olurken apikal kısımda ekspresse olmaz. Ayrıca akciğer epitel hücrelerini, bakteriyel flagellinin aktive ettiği ve inflamatuvar sitokinlerin üretiminin uyarıldığı bilinmektedir. Bu bilgiler göstermektedir ki TLR-5 mukozal yüzeylerde önemli bir mikrobiyal komponent tanıyıcısıdır. TLR-5'in ligant bağlanan kısmında meydana gelen bir mutasyonun *Legionella pneumophila*'nın neden olduğu pnömoni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{40,44,45}

2. b. 5. TLR-7 ve TLR-8

TLR-7 ve TLR-8 yapısal olarak korunmuş ve birbirine benzer proteinlerdir. TLR-7'nin ifadesi plazmasitoid dentritik hücreler (PDC) ve B hücreleri ile kısıtlıdır. TLR-8 monositler, miyeloid dentritik hücreler ve makrofajlar gibi miyeloid kökenli hücrelerde ifade olurlar.^{46,47}

Bu iki reseptör de hemen hemen aynı ligantları tanımaktadırlar. TLR-7 eksik farelerde yapılan bazı çalışmalar, farelere ait TLR-7'nin bazı sentetik bileşikleri tanıdığını göstermektedir. Bu bileşiklere imidazoquinoline denilmektedir ve Human papillomavirüsünün neden olduğu genital siğillerin tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle bir imidazoquinoline olan R-848, tekrarlayan genital herpes ve hepatit C

infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan güçlü etkiye sahip bir bileşiktir. Bu küçük sentetik birleşikler immün sistemde görev alan hücrelerin Tip I İnterferen (IFN) ve IL-12 salgılamasını uyarmaktadır.^{33,47,48}

Imiquimod hem insan hem de farede TLR-7'nin doğal ligantıdır. R-848 murinler ve insanlarda TLR-7'yi ayrıca insanlarda TLR-8'i aktive etmektedir.

Guanin analogu olan bir başka sentetik bileşik loxoribini ve pirimidin analogu olan broprimine hem insan hem de murin de bulunan TLR-7 yi aktive etmektedir. Loxoribininin hem antiviral hem de anti-tümoral aktiviteye sahip bir bileşik olduğu mürinler ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bileşik NK hücreleri ve B hücrelerini uyarmakla birlikte çeşitli sitokinlerin üretimini uyarmaktadır. Broprimine ise oral yolla immün sistemi aktive etmekte ve IFN- α üretimini uyarmaktadır ve mesane kanserinde kullanılmaktadır.^{21,33,47,49}

TLR-7 ve TLR-8'in doğal ligantları olan bu sentetik bileşiklerin ssRNA ile yapısal olarak benzemeleri TLR -7 ve TLR-8'in virüsler ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştü ve bunun üzerinde pek çok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucu, ssRNA virüslerinin bu reseptörleri aktive ettiği gösterilmiştir.^{46,50}

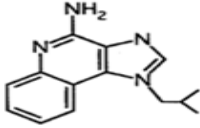
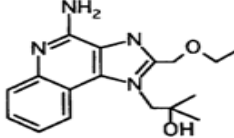
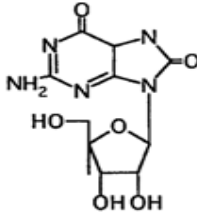
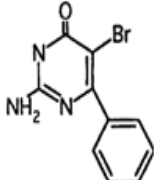
TLR-7, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV), vesiküler somatit virüsü (VSV) influenza virüsü, Newcastle hastalık virüsü (NDV) gibi ssRNA virüslerini ve poly-U RNA'yı tanımaktadır.³³

İnsanda bulunan TLR-8 ise guanozin / adonozin ve üridin bakımında zengin olan ssRNA virüslerinden coxsackie B virüs ve insan parechovirus 1'i tanımaktadır.^{21,33}

Son yapılan araştırmalara göre siRNA TLR-7 ve TLR-8 tarafından tanınmaktadır. siRNA Dicer denilen bir RNAse III enziminin, dsRNA 'yı

parçalaması ile oluştuğu için bu iki reseptörün sadece ssRNA'yı değil ayrıca dsRNA'yı da tanıdığını olası hale getirmektedir.⁵¹

Yapılan bu çalışmalar TLR-7 aracılığı ile TNF α üretimi için guanozin ve üridin gerekli olduğu görülmektedir. Ayrıca guanozin ve üridin bakımından zengin ssRNA'nın TLR-7 ve TLR-8 aracılığı ile TNF α ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyardığı gösterilmiştir.^{46,49,52}

<u>TLR AKTİVİTESİ</u>	<u>BİLEŞİK</u>	<u>YAPI</u>
mTLR7, hTLR7	Imiquimod	
mTLR7, hTLR7, hTLR8	Resiquimod (R-848)	
mTLR7, hTLR7 hTLR8	Loxoribine	
TLR7	Bropirimine	

Şekil 4: TLR-7 ve TLR-8'in Doğal Ligantları

2. b. 6. TLR – 9

TLR-9 'ü olamayan fareler üzerinde yapılan araştırmalara göre CpG (sitidin –fosfat –guanozin) DNA TLR-9 tarafında tanınmaktadır. Bakteriyel DNA'larda immün sistemi aktive eden metillenmemiş CpG yapıları bulunmaktadır. Bu yapılara omurgalılarda nadir olarak rastlanmaktadır.
33,48,52

Metillenmemiř CpG yapıları içeren sentetik oligodeoksinükleotitler de (ODN) immün sistemi uyaran bir başka bileşiklerdir. ODN'ler biyolojik aktivitelere göre 3 gruba ayrılmaktadır. A/D-tip ODN'ler, plazmasitoid dentritik hücreler aracılığı ile Tip I IFN sekresyonunu indüklemektedir fakat B hücrelerini ve IL-12 sekresyonunu uyarma yetenekleri dūřüktür. B/ K tip ODN'ler B hücrelerini ve IL-12 üretimini uyarırlar fakat Tip I IFN sekresyon uyarımı dūřüktür. C-tip ODN'ler ise hem Tip I INF sekresyonunu hem de B hücre aktivasyonunu sağlarlar.³³

İnsanda bulunan TLR-9 sadece hafıza B hücreleri ve plazmasitoid dentritik hücrelerde ifade olmaktadır. Murin TLR-9 ise B ve Plazmasitoid dentritik hücrelerin yanı sıra monosit, makrofaj ve dentritik hücrelerde de ifade edilmektedir.⁴⁷

Plazmasitoid dentritik hücrelerde bulunan TLR-9 reseptörleri bakteriyel CpG DNA 'ları tanımasını yanı sıra virüs kaynaklı CpG DNA 'ları da tanımaktadır. İn vivo koşullarda TLR-9 inflamatuvar sitokinlerin ve Tip I IFN'ların üretilmesine neden olan murine cytomegalovirus (MCMV), herpes-simplex virüs 1 ve 2 (HSV-1/HSV-2) gibi DNA virüslerini de tanımaktadır.^{47,48,52}

2. b. 7. En Son Keşfedilen Toll Benzeri Reseptörler TLR-10 ve TLR-11

En son keşfedilen insan toll benzeri reseptörü TLR-10'dur. TLR-10 bütün insan toll benzeri reseptörleri arasında en çok TLR-1 ve TLR-6 ile benzeşmektedir. İnsanda bulunan TLR-10 811 aminoasit içermektedir. Amino grup asit dizilerine göre TLR-1 ile % 50, TLR-6 ile %49 benzerlik göstermektedir. TLR-10'un mRNA'sı daha çok dalak, lenf nodülleri, tonsiller ve timüs gibi lenfoid dokularda bulunmaktadır. TLR-10 B hücrelerinde yüksek derecede ekspresse olurken plazmositoid dentritik hücrelerde daha azdır. TLR-10 'un ligantları henüz bulunamamıştır fakat TLR-1 ve TLR-6 'da olduğu gibi TLR-10'un da başka bir protein ile (TLR2 ?) birlikte hareket ettiği düşünülmektedir.^{6,53}

TLR-11 farede bulunmaktadır. Böbrek ve karaciğer epitel hücrelerinde ekspresse olduğu bilinmektedir. TLR-11 olmayan farelerin üropatojenik *E.coli*'nin neden olduğu intra-üretral infeksiyonlara daha duyarlı olduğu gösterilmiştir.²⁹

Nörosistisarkozis fare modellerinde yapılan bir çalışmaya göre TLR11, TLR-12 ve TLR-13 mRNA'ları beyinde bulunmaktadır. Sinir dokusu hücrelerinden en çok nöronlarda TLR-11 ve TLR-13 proteinine rastlanmıştır.⁵⁴

En son olarak bir prozoon olan *Toxoplasma gondii*'den kaynaklı profilin benzeri bir proteinin TLR-11'in ligantı olduğu ve dentritik hücreleri MyD88 yolu ile IL-12 salgılamak için aktive ettiği bulunmuştur.⁵⁵

2. c. TLR'lerin Sinyal İletim Yolu

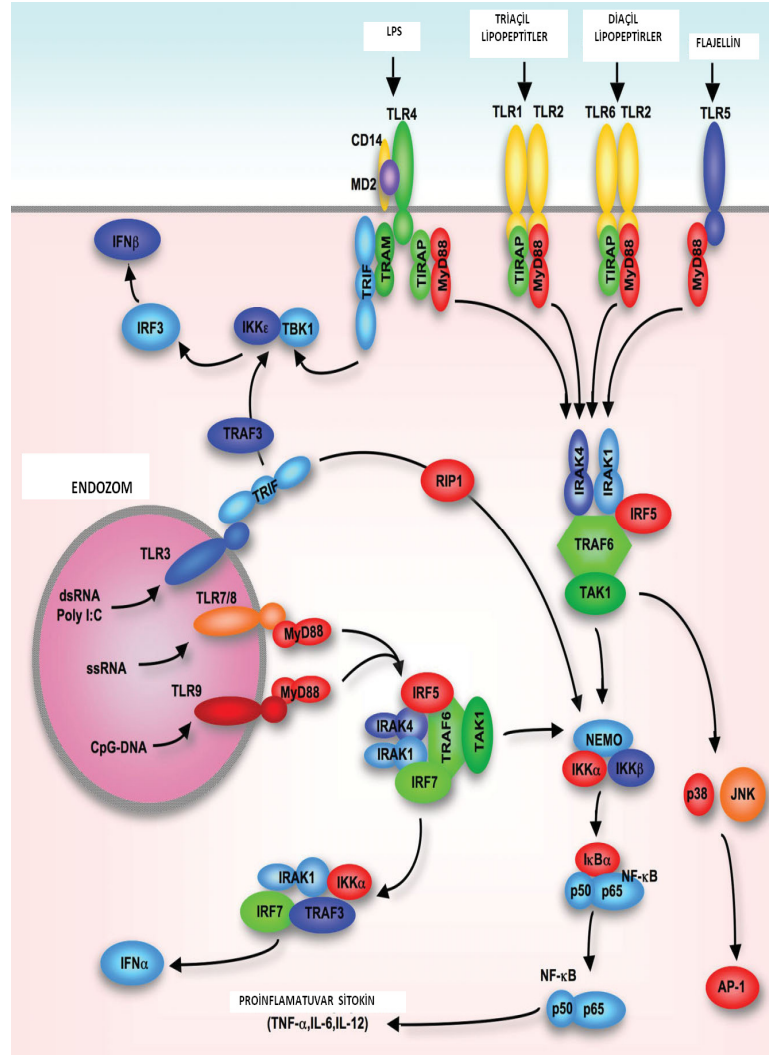
TLR'ler doğal ligantlarının buldukları yerlerle uyumlu olarak hücrelerin farklı yerlerinde lokalize olmuşlardır. TLR'lerden lipit ve proteinleri tanıyanlar TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 ve TLR-6 plazma membranında ifade olurken, viral nükleik asitleri tanıyan TLR-3, TLR-7, TLR-8 ve TLR-9 hücre içindeki endozomlarda ifade edilirler . TLR'ler doğal ligantları ile bağlandıktan sonra hücre içerisinde meydana gelen bir dizi sinyal iletimi sonunda sitokinlerin salınımı uyarılır. ³

TLR'ler sinyal iletimi sırasında MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β [IFN β] ayrıca TICAM-1 olarak da bilinmektedir), TIRAP (ayrıca Mal olarak da bilinmektedir) ve TRAM (TICAM -2 olarak bilinir) gibi TLR'lerin TIR domainleri ile ilişkide olan adaptör molekülleri kullanırlar. Bu adaptör moleküller aracılığı ile oluşan sinyaller NF-KB, JUN N-termin kinaz (JNK), p38 ve IRF3 ve IRF7 (interferon regulatin factor) gibi molekülleri aktive eder. Bu sinyaller sayesinde konaktaki doğal ve edinsel immünite arasındaki ilişki düzenlenir. ^{3,56,57}

TLR-3 hariç TLR ailesinin tüm üyeleri TIR domainler ile etkileşimde bulunan adaptör molekül olan, MyD88, ile sinyal iletir ve inflamasyonu tetiklerler. TLR-3 ve TLR-4 diğer bir adaptör molekül olan, TRIF, aracılığı ile Tip I IFN üretimini indüklerler. TLR-4'ün LPS'yi tanıyabilmesi için adaptör moleküller hariç bazı moleküllere ihtiyacı vardır. Bunlar LPS bağlayan protein (PBP) , CD14 ve MD2'dir.

Bu ligantların yanı sıra, TLR-4'ün intraselüler kısmında MyD88'e bağlı yol için TIRAP ve MyD88'e, MyD88'den bağımsız yol için ise TRAM ve TRIF adaptör moleküllerine ihtiyaç duyar. MyD88 olmayan farelerde TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-7 ve TLR-9'un ligantlarına karşı tepkisiz olduğu gösterilmiştir. ^{3,43,57,58,59}

MyD88'den bağımsız TRIF bağımlı yol ise TLR-3 ve TLR-4 / TRAM ile aktive olmaktadır. Bu aktivasyon sonucu IRF-3 transkripsiyon faktörü aktif duruma gelerek IFN β üretimi sağlar. ^{43,57}



Şekil 5: Toll Benzeri Reseptörlerin Sinyal İletim Yolu

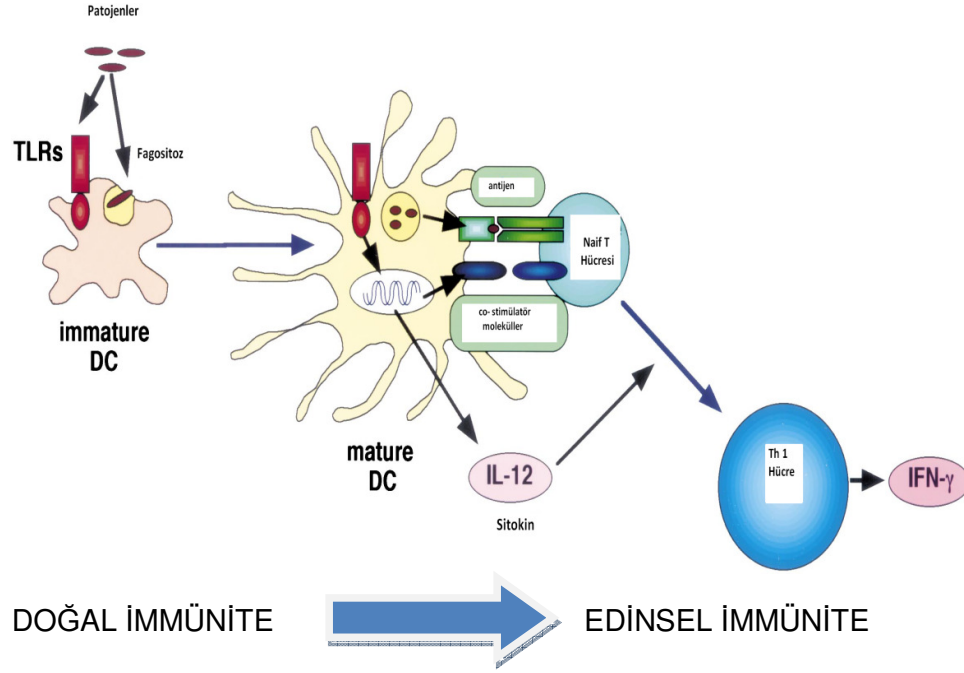
2. d. TLR ve Edinsel İmmünite

Değişik hücre ve moleküllerin oluşturduğu, hücre içi ile hücre dışı mikroplara karşı savunma sağlayan iki türlü edinsel immünite vardır; humoral ve hücreli immünite. Humoral immünite B lenfositlerinin ürettiği antikor denilen proteinler tarafından oluşturulur. Antikorlar enfekte hücrenin içinde yaşayan ve bölünen hücrelere erişemezler. Böyle hücre içi mikroplara karşı savunmaya hücreli immünite denir ve T lenfositleri tarafından oluşturulur. T lenfositleri arasında CD4+ T hücrelerine yardımcı T hücreleri adı verilmektedir. Çünkü bu hücreler antikor yapımı için B lenfositlerine, yutulmuş mikropların yıkımı için ise fagositlere yardım etmektedir. CD8+ T hücreler ise sitolitik T lenfositleri (CTL) olarak adlandırılırlar çünkü bu hücreler hücre içi mikropları taşıyan hücreleri öldürürler.^{12,14}

T hücreleri üzerinde bulunan ve antijeni tanıyan reseptörler vardır. T hücrelerine antijenler, antijen sunucu hücreler (ASH) adı verilen bazı özel hücreler tarafından sunulurlar. Antijenler ASH 'lerin yüzeylerinde bulunan ve majör histokompatibilite (MHC) adı verilen özel moleküller ile sunulmaktadır. ASH'lerce hücre içine alınıp veziküller içine alınan hücre dışı proteinler işlenip sınıf II MHC moleküllerince sunulurken, çekirdekli hücrelerin sitozolünde işlenen proteinler sınıf I MHC moleküllerince T lenfositlerine sunulur. Sınıf II MHC molekülü CD4+ hücrelere antijen sunarken, sınıf I MHC molekülü CD8+ hücrelere antijen sunarlar. CD4+ yardımcı T hücreleri değişik sitokinleri üreterek farklı fonksiyonlara neden olan efektör hücre alt gruplarına farklılaşabilirler. Bu alt grupların en iyi tanımlananı TH1 ve TH2 hücreleridir. TH1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokin IFN- γ 'dır.^{12,14}

IFN- γ makrofajların güçlü bir aktivatörüdür. Ayrıca mikropların fagositozunu uyaran antikor izotiplerini üretimini de stimüle eder. Diğer

taraftan TH2 hücreleri IgE antikor üretimini stimüle eden IL-4 ile eozinofilleri uyaran IL-5 üretir.



Şekil 6: Toll Benzeri Reseptörler ve Edinsel İmmünite

Makrofajlar ve dentritik hücreler üzerindeki TLR'ler kendi ligantları olan antijenler ile aktive hale geçtiklerinde IL-12 üretirler. IL-12 T hücrelerinin TH1 alt grubuna farklılaşmasını uyarır ve bu hücreler IFN- γ salgırlar. Salgılanan bu sitokin makrofajları aktive eder.^{2,23,26}

TLR-3 ve TLR-4 ile uyarılan MyD88'den bağımsız TRIF bağımlı sinyal sistemi, sınıf II MHC ve co-stimülator moleküllerin (CD80 ve CD86) sayısında artışa neden olarak dentritik hücrelerin matürasyonunu sağlamaktadır.⁵⁷

2. e. Kök Hücre Nedir?

Kök hücreleri, kendini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir.^{60,61}

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran iki temel özellik bulunmaktadır;

1- Bölünüp, Çoğalabilme (Proliferasyon) ve Kendini Yenileyebilme (Rejenerasyon)

Tekli hücrelerden elden edilen embriyonik kök hücrelerinin 300-400 döngü boyunca çoğalabildikleri gösterilmiştir. Sonuçta meydana gelen hücrelerin özelleşmediği ve bu nedenle de bu hücrelerin uzun dönemde kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin bölünme kapasitelerini kromozomların uç kısmında bulunan ve “*telomer*” denilen DNA zincirleri belirler. Telomerler ne kadar uzunsa hücreler o kadar çok bölünebilirler. Telomerlerin uzun kalmasını sağlayan da “*telomeraz enzimi*” dir. Bir hücrede telomeraz enzimi ne kadar aktif ise telomer uzunluğu da o kadar korunabilir. Kök hücreler çok yoğun telomeraz enzim aktivitesinden dolayı çok sayıda bölünebilirler.

2- Farklılaşabilme

İnsan ve memeli hayvanlardaki kök hücreleri birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunlar;

A-Totipotent: Tam bir bireyi oluşturabilecek kapasiteye sahip olan bu hücreler, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu hücreler embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanmaktadır

B-Pluripotent: Embriyonik gelişimde üç germ tabakasından köken alan ve yaklaşık 200 çeşit hücreye dönüşebilen hücrelerdir. Pluripotent hücreler, organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynaklık etmesine rağmen, yeni bir birey oluşturamazlar

C-Multipotent: Pluripotent kök hücreleri (Erişkin kök hücreler), biraz daha özelleşmiş olan multipotent kök hücrelerine dönüşürler. Kademe kademe farklılaşmalar geçiren pluripotent hücreler, daha özel hücreler haline gelirler. Örneğin; kan hücrelerini oluşturacak kök hücreleri; oksijen taşıyarak solunumda gerekli olan alyuvarlar, hastalık etkenleri ile savaşan akyuvarlar ve pıhtılaşmayı sağlayan trombositler gibi birbirinden farklı özelliklere sahip üç ana grupta farklılaşırlar. Deri kök hücreleri çeşitli tipteki deri hücrelerini, kas kök hücreleri de farklı tipteki kas dokularını meydana getirirler. İşte, bu özelliklere sahip kök hücrelerine multipotent kök hücreler denir.^{61,62}

Kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere 2 gruba ayrılabilir.

2. e. 1. Embriyonik Kök Hücreler

Erken dönemdeki memeli embriyosundaki kök hücrelerden elde edilmektedirler. Bu hücreler in vitro ortamda sınırsız ve farklılaşmadan çoğalma kapasitesine sahiptir ve pluripotenttirler. Embriyonik kök hücrelerin vücuttaki tüm dokulara kaynaklık edebileceği sadece farelerde tam olarak gösterilebilmiştir.^{9,62}

2. e. 2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

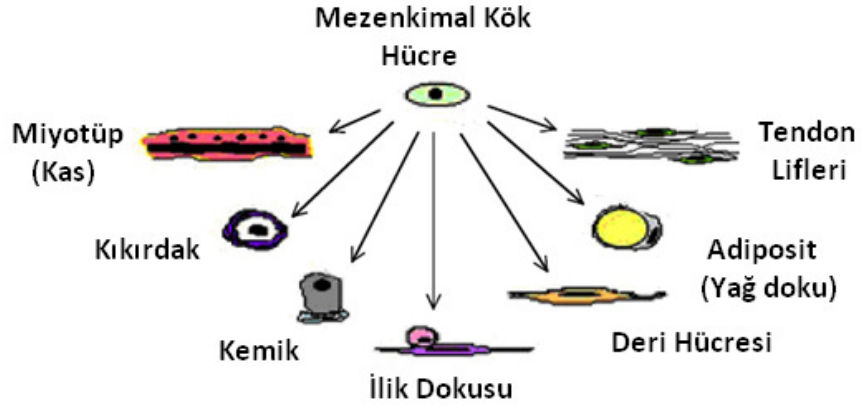
Erişkin bir kök hücresi, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup, bu hücre kendisini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Bazı bilim adamları, erişkin kök hücresi yerine artık “somatik kök hücresi” terimini kullanmaktadır.^{9,62,63}

2. e. 2. a. Mezenkimal Kök Hücreler

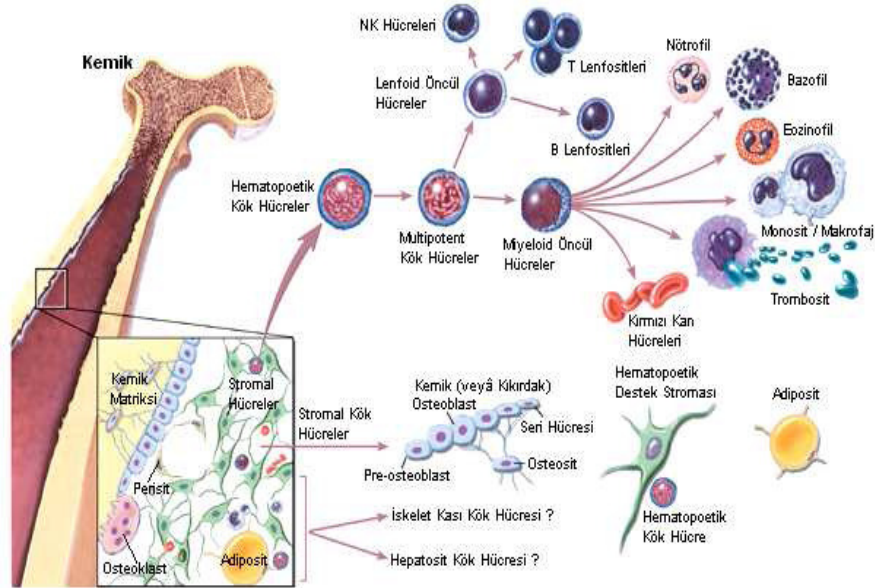
Kemik iliğini incelediğimiz zaman iki ayrı sistemden oluşan bir organ olduğunu görürüz;

- a) Hematopoietik doku,
- b) Stroma

Kemik iliği hücrelerinden, kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kabına yapışan hücrelerin kemik iliği stromal kök hücreleri olduğu, yapışmayan hücrelerin ise hematopoietik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Son yıllarda ise, stromal hücre sistemine duyulan ilgi giderek artmaktadır. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücrelerin, özellikle mezenkimal kök hücrelerin hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girdiği düşünülürken, daha sonraları yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla bu hücrelerin aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, adipoz doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir.^{9,60,64}



Şekil 7 : Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşması İle Oluşan Hücreler



Şekil 8: Kemik İliğinden Meydana Gelen Hücreler

MKH'ler, fetal buzağı serumu içeren besi yeri içerisinde kemik iliği materyalinin kültüre edilmesinden sonra, fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini ve bu fibroblast benzeri hücrelerin kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaştığını gösteren Fridenshtein tarafından 1970'de tanımlanmıştır. 1970'lerde Friedenstein ve arkadaşlarının fibroblast kolonisi yapan ünit (CFU-F) olarak tanımladığı nonhematopoetik kemik iliği progenitörleri olan MKH bugün özellikle immunoregülatuar özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlac Hücre - Cell Drug - kapsamına almıştır.^{60,64,65}

MKH'ler daha çok kemik iliğinde bulunsa da, periferal kan, adipoz doku, deri dokusu, kemik trabeküler dokusu, kordon kanı, plasenta, Wharton jeli, amnion mayi, snovyal membran, karaciğer ve dişten de elde edilebilmektedir.^{9,66}

Kemik iliğinde her 10.000-100.000 tek çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu hesaplanmaktadır (Bu oran kordon kanında 1/108'e kadar düşebilmektedir). Çocuklarda 29 CFU /1 milyon tek çekirdekli hücre oranı varken ileri yaşlarda bu oran 3.2CFU/1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar inmektedir.¹⁰

Mezenkimal kök hücreler, hücrelerin yüzeye yapışma özelliğinden dolayı kültür ortamına alınarak elde edilebilirken, yüzeylerindeki belirteçlerin belirlenmesi ile de tanımlanabilirler. Mezenkimal kök hücreyi tanımlamak için kullanılan pozitif belirteçler CD105 (endoglin, MAb SH2), CD73 (ekto 5' nükleotidaz, MAb SH3 ve SH4) ve CD90 (Thy-1)'dir. Hematopoetik belirteçler olan CD45 (pan-lökosit belirteçi), CD34 (hematopoetik kök hücre belirteci), CD14 ve CD11b (monosit ve makrafaj belirteci),CD79 ve CD19 (B hücre belirteci) açısından negatif olmaları

gerekir. HLA-DR molekülü de mezenkimal kök hücre uyarılmadıkça mezenkimal kök hücre yüzeyinde eksprese edilmez.^{9,65,66}

Bugüne kadar bu hücreleri temsilen birçok isimlendirme kullanılmıştır. Önceleri “koloni oluşturan birim-fibroblast (colony forming unit fibroblast; CFU-F)” ya da “kemik iliği stromal fibroblastları” adlandırmaları kullanılmış, fakat zamanla yerini şu farklı adlandırmalara bırakmıştır; kemik iliği stromal hücreleri (KİSH), mezenkimal kök hücreler (MKH) ya da mezenkimal progenitör–öncül hücreler (MPH). Son olarak, Minnesota Üniversitesi’nden Catherine Verfaillie bu hücreleri “ multipotent erişkin progenitör hücreler ” olarak tanımıştır.^{65,66}

2. f. Stafilokokal Enterotoksin B

Staphylococcus aureus uygun koşul bulduğunda hem hızla çoğalır hem de suşa bağlı olarak A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H toksinlerinden birini veya birkaçını oluşturabilir. Enterotoksinler polipeptid yapıdadırlar. Molekül ağırlığı 29 366 Da olan ve 239 aminoasit içeren B toksini asparajin, lizin, valin, glutamik asit ağırlıklıdır. *S. aureus* enterotoksinleri içinde ısıya en dayanıklı olanı enterotoksin B’dir. Enterotoksin B 99⁰C’de 87 dakikada inaktive olur. Stafilokokal enterotoksinlerin DNA analizi çalışmalarında ilk olarak stafilokokal enterotoksin B’nin aminoasit dizilimi belirlenmiştir. stafilokokal enterotoksin B’nin N-terminalinde glutamik asit, C-terminalinde ise lizin aminoasidi bulunmaktadır.^{67,68}

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri başta *S. aureus* olmak üzere enterotoksijenik stafilokoklar tarafından gıdalarda oluşturulan enterotoksinlerin alınması sonucu şekillenen ve tüm dünyada yaygın olarak görülen en önemli intoksikasyonlardan biridir. İlk kez 1914’de

Barber, stafilokokal mastititi olan bir ineğin sütünün içilmesi ile başlayan akut gastroenterit tablosunu bildirmiştir. Stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşturmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı –kusma ve diare başlar. Akut semptom ve bulgular, genellikle 24 saat içinde düzelir. Stafilokokal enterotoksinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.
67,68,69

Stafilokokal enterotoksinler gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, toksik şok benzeri sendroma, alerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır. Stafilokokal enterotoksinlerin ayrıca, spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonları da bulunmaktadır.⁶⁷

2. g. Difteri Toksini

Difteri toksini, difteri basilin hücre dışı bir ürünü olup protein yapısındadır. Bu toksin birçok klinik belirtilerden sorumludur. Çok dayanıksızdır ve ısıtmakla kolaylıkla parçalanabilir (75 C° de 10 dk). Ayrıca ışık ve beklemeyle de parçalanır. Difteri toksini hücrelere endositoz ile girer.

Difteri toksini iki basamakta oluşur. Salınan difteri toksini; toksinin stoplazmik membrandan ekstraselüler sıvıya salınımı sırasında ayrılan 58.3 kDa molekül ağırlığında bir polipeptit bölgeye sahiptir. Bu polipeptit salındıktan sonra, proteolitik çentiklenme ile A ve B zincirlerine ayrılır ve bunlar disülfid bağları ile bağlanmıştır. Toksinle ilgili detaylı biyokimyasal ve genetik araştırmalarda toksinin 3 fonksiyonel bölgesi olduğu anlaşılmıştır.

1-Reseptör bağlayan bölge ki bu bölge, konakçı hücre yüzeyindeki bir protein ile birleşir.

2-Enzimatik bölgenin konakçı hücre içine translokasyonunu idare eden bölge.

3-ADP-riboz aktarılmasında etkili olan katalitik bölge.

Difteri toksininin kristal yapısı çözülmüştür ve R, T, C olarak isimlendirilen 3 bölge saptanmıştır; 'R' reseptör, 'T' translokasyon, 'C' katalitik bölgedir. C bölgesi A zincirinde R ve T bölgeleri ise B zincirindedir.

B zincirindeki R bölgesi, konakçı hücre yüzeyindeki bir proteine bağlanır. Toksinin hücre yüzeyine bağlanmasından sonra konakçı hücresi toksini bir endositik vezikül içine alır. Endositoz toksin hareketinde önemli bir basamaktır; çünkü endositik veziküldeki pH düşüşü, translokasyon işleminin oluşmasını sağlar. Endositik vezikülde pH düşmesi ile + ve – yük dağılımında değişiklikler olur ve A ve B zincirinin parsiyel ayrılmasına neden olur. A ve B zinciri ayrıldıktan sonra A zinciri stoplazma içinde serbest kalır ve ökaryot hücrelerdeki protein sentezi için gerekli olan uzama faktörü 2'yi (EF-2) inaktive ederek, protein sentezini durdurur. Protein sentezinin durması hücrenin ölümüne neden olur.⁶⁸

2. h. MTT Testi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir.⁷⁰

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. MTT test

yöntemi, ilk olarak Mosmann tarafından kullanım alanına sokulmuştur. Hücre canlılığını ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay, hızlı olması avantaj olarak belirtilmiştir.⁷¹

Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntemi hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır.⁷²

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. a. Gereçler

3. a. 1. Cihazlar

Flow Sitometri (BD FACSCanto™ Amerika)

Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (Nuair / Amerika)

Etüv (% 5 'lik CO2 'li) (Revco Elite II / Amerika)

Inverted Mikroskop (Leica /Almanya)

Işık Mikroskobu (Leica /Almanya)

Santrifüj (Beckman Coulter / Amerika)

Mikrosantrifüj (Eppendorf / Almanya)

Spektrofotometri (Bio Tek synergy HT / Amerika)

Buz Dolabı (Bosch / Almanya)

Derin Dondurucu (Sanyo / Japonya)

Steril Plak (96 Kuyucuklu TPP / İsviçre)

Vorteks (Heidolp / Almanya)

Sıvı Azot Tankı

Hücre Kültür Kapları (25 'lik veya 75'lik Flasklar TPP / İsviçre)

Steril Santifüj Tüpleri (Greiner / Almanya)

Flow Stometri Tüpleri

Steril Pastör Pipetleri

Mikropipetler ve Steril Uçları

Thoma Lamı

Enjektör

Ependof

3. a. 2. Kimyasallar

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco / Amerika)

RPMI Medium 1640 (Gibco / Amerika)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco / Amerika)

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (Gibco / Amerika)

Tirpsin Edta (Gibco / Amerika)

Penisilin Streptomisin (Gibco / Amerika)

N Asetil Glukoz Amin (Gibco / Amerika)

B-Merkapto Ethanol (Gibco / Amerika)

L- Glutamin (Gibco / Amerika)

Tipan Mavisi (Gibco / Amerika)

Paraformaldehit (Electron Microscopy Sciences / Amerika)

Fikol-paque (Biosciences / İsveç)

Heparin (Sigma /Almanya)

Difteri Toksinin (1.8 mg / ml Refik Saydam Hıfzıssıhha / Türkiye)

Staphylococcal Enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* (Sigma
Almanya)

Lipopolisakkarit from *Salmonella typhimurim* (Sigma Almanya)

Cell Proliferation Kit (MTT) (Roche / Almanya)

Anti Human Tlr 1 (eBioscience / Amerika)

Anti Human Tlr2 (BioLegend / İngiltere)

Anti Human Tlr3 (eBioscience / Amerika)

Anti Human Tlr 4 (e Bioscience / Amerika)

Anti Human /Mause Tlr8 (Imgenex / Amerika)

Anti Human Tlr9 (eBioscience / Amerika)

G2a: Rpe (İzotip) (Sero- Tec / Amerika)

3. a. 3. Diğerleri

İnsan kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücre serisi

3. b. Yöntemler

3. b. 1. Mezenkimal Kök Hücre Serisi

İnsan kemik iliğinden elde edilmiş olan mezenkimal kök hücrelerinin kullanıma hazır hale getirilebilmesi için hücreler, % 10 fetal bovin serum içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kültür ortamında, 37°C ve % 5'lik CO₂ ve nemli ortam koşullarında 75'lik kültür kapları (flasklar içerisinde) yeterince çoğaltıldı. Bu hücreler sürekli pasajlandı ve her pasajlama sonunda bir miktar hücre daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılabilmek için %95 serum % 5 DMSO'dan yapılan karışım ile kriyo tüpleri içerisinde sıvı azot ortamında saklandı.

3. b. 1. a. Hücrelerin Pasajı

Pasaj işlemi, kültür kaplarında (flasklarda) çoğalan hücrelerin belirli bir yoğunluğa ulaştıkları zaman, hücrelerin seyreltilip başka flasklara aktarılması işlemidir.

Kültür kapları inverted mikroskopta kontrol edilerek pasajlama zamanı gelen hücreler, her defasında en az 10'ar ml olacak şekilde 2 kez PBS ile yıkanır. Buradaki amaç kültür ortamı içerisindeki maddelerin özellikle de serumun ortamdaki uzaklaştırılmasıdır.

PBS ile yıkanan flasklar içerisine, 3 ml olacak şekilde Tripsin-edta koyularak flasklar 37 °C ve % 5 CO₂ 'lik etüvde 5 dakika bekletilir. Böylece hücreler yapıştıkları zeminden ayrılırlar ve steril pastör pipetleri ile santrifüj tüpleri içerisine aktarılırlar. Bütün bu işlemler, sınıf 2 biyogüvenlik kabini içerisinde yapılır.

Santrifüj tüplerine aktarılan hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Santrifüj işlemi sonunda üst sıvı atılarak altta kalan hücreler 1ml besi yeri içerisinde mikropipetler kullanılarak hücre süspansiyonu haline getirilir.

3. b. 1. b. Hücre Sayımı ve Canlılığın Belirlenmesi

Santrifüj sonrası 1 ml besi yerinde süspansiyon haline getirilen hücreler, tripan mavisi ve thoma lamı kullanılarak ışık mikroskopunda sayılır. Canlı olmayan hücreler mavi renkte görülür. Canlı hücreler sayıldıktan sonra total hücre sayısını belirleyebilmek için aşağıdaki formül kullanılır.

Toplam Hücre Sayısı x 10^4 x Seyretme Faktörü x Total Hacim (1ml)

Hücre sayısı belirlendikten sonra hücreler yeni flasklara aktarılır. 75'lik flasklarda 15 ml besi yeri içerisinde 5×10^5 hücre, 25 'lik flasklar içerisinde ise 5 ml besi yeri içerisinde 2×10^5 hücre olacak şekilde aktarma işlemi gerçekleştirilir. Bir miktar hücre de daha sonra kullanılmak üzere % 95 FBS, % 5 DMSO içeren karışımda kriyo tüpleri içerisinde sıvı azot tankında saklanır.

3. b. 2. MTT Testi

Hücreleri MTT testi için hazırlamak amacıyla hücre kültürleri için kullanılan 96'lık steril bir plak kullanılmıştır. Her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde hücreler kuyucuklara aktarılmış ve son hacim % 10 FBS içeren DMEM besi yeri ile 200µl 'ye tamamlanmıştır. Hücreler çoğalmaları için 3 gün boyunca etüvde (37⁰C ve % 5 CO₂) bekletilmiştir.

3 gün sonunda hücreler %10 FBS içeren DMEM besi yeri içerisinde hazırlanmış faklı konsantrasyonlardaki Stafilokokal Enterotoksin B ve difteri toksini ile 24 saat uyarılmıştır.

3. b. 2. a. MTT Test Yöntemi

MTT testi Cell Proliferation kiti kullanılarak kitte belirtilen prosedüre göre yapılmıştır.

1 - 3. gün sonunda hücreler çoğaldıktan sonra, kuyucuklardaki besi yerleri dikkatli bir şekilde alınır.

2- İlgili kuyucuklara, ilgili toksin konsantrasyonlarından 100'er µl koyulur.

3- Hücreler toksinler ile 24 saat uyarılmaya bırakılır. (37⁰C ve % 5 CO₂)

4- 24 saat sonra her bir kuyucuğa 10 µl MTT ayıraç solüsyonu koyulur.

5- Hücreler 4 saat etüvde (37⁰C ve % 5 CO₂) inkübasyona bırakılır.

6- 4 saat sonunda her kuyucuğa çözünürleştirme solüsyonundan 100'er µl koyulur.

7- Plak 1 gece etüvde (37⁰C ve % 5 CO₂) inkübasyona bırakılır.

8- Süre sonunda plak spektrofotometrede 670-570 nm 'de okutulur.

3. b. 3. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Toksinler İle Uyarılması ve PE (Fikoeritrin) İle İşaretli Anti- Human Toll Like Antikorları İle Boyanması

Hücre kültür kaplarında yeterli miktarda çoğalan hücreler % 10 FBS içeren DMEM besi yeri içerisinde hazırlanmış, farklı konsantrasyonlarda olan difteri toksini ve Stafilokokal Enterotoksin B ile 24 saat uyarıldıktan sonra PE ile işaretli anti-Human Toll Like antikorları ile boyanmıştır.

3. b. 3. a. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Difteri Toksini İle Uyarılması ve PE (Fikoeritrin) İle İşaretli Anti- Human Toll Like Antikorları İle Boyanması

Hücreleri uyarmak için difteri toksininin 1 µg/ml ve 25 µg/ml olan konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar %10 FBS içeren DMEM besi yeri içerisinde hazırlanmıştır. 3 adet 75'lik flask kullanılmıştır. Flasklardaki hücreler çoğaldıktan sonra, flasklardaki besi yerleri dökülmüş ve yerine toksin içeren besi yerleri koyulmuştur. Kontrol grubu için sadece %10 FBS içeren DMEM besi yeri kullanılmıştır. Hücreler etüvde (37⁰C ve % 5 CO₂) 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda hücreler tripsin –edta kullanılarak yapışıkları yüzeyden kaldırılmış ve pasajlama işleminde olduğu gibi santrifüj edildikten sonra sayılarak işaretli antikor ile boyama işlemi yapılmıştır.

Hücreleri işaretli antikorlar ile boyarken uygulanan yöntem şöyledir.

1-Hücreler santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki sıvı dökülmüş ve hücreler 700 µl % 0.1 FBS içeren PBS (boyama tampon çözeltisi) ile süspansiyon haline getirilmiştir.

2- Hücre miktarını belirlemek için hücreler sayılmıştır.

3- 6 adet ependorf içerisinde 90 µl olacak şekilde hücre süspansiyonundan koyulmuştur.

4- %10 insan serumu içeren PBS solüsyonu hazırlanmış ve yalancı pozitifliği engelleyebilmek için bu karışımdan 10µl her bir ependorfa ilave edilmiş ve hücreler 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

5- 15 dk sonunda her bir ependorfa ilgili antikorlardan üretici firmanın önerdiği miktarlarda antikor ilave edilmiş ve +4⁰C'de karanlık ortamda 30 dk bekletilmiştir. (izotip, TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-8, TLR-9)

6- Bu 30 dk süresince her 10 dk'da ependorflar düşük devirde vorteks edilmiştir.

7- 30 dk sonunda ependorflar mikrosantrifüjde 3000 rpm'de 3 dk çevrilmiştir.

8- Üst kısımda kalan sıvılar dikkatli bir şekilde mikropipet yardımı ile alınmış ve her bir ependorfa %0,1 FBS içeren PBS 'den 200 µl koyularak yıkama işlemi yapılmıştır.

9-Ependorflar yeniden mikro santrifüjde 3000 rpm'de 3 dk çevrilmiş ve üzerlerindeki sıvı, dipte kalan hücrelere dokunmayacak şekilde dikkatlice mikropipet yardımı ile alınmıştır.

10- Üst sıvı alındıktan sonra ependorflara 400 µl %2 oranında parofarmaldehit içeren PBS (sabitleme tampon çözeltisi) koyulmuştur.

11- Hücre süspansiyonu özel akış stometri tüplerine aktarılmış ve özgül işaretli antikolar ile boyanan hücreler üzerindeki reseptörler akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Her örnekten 10.000 hücre analiz edilmiştir.

Bu işlemler kontrol grubu hücreleri, 1µg/ml toksin ile uyarılan hücreler ve 30 µg / ml toksin ile uyarılan hücreler için ayrı ayrı tekrar edilmiştir.

3. b. 3. b. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılması ve PE (Fikoeritrin) İle İşaretli Anti- Human Toll Like Antikorları İle Boyanması

Hücreleri uyarmak için Stafilokokal Enterotoksin B 3 µg / ml ve 30 µg/ml olan konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu aşamada difteri toksini ile yapılan çalışmalar aynen tekrarlanmıştır.

3. c. İstatistiksel Analiz

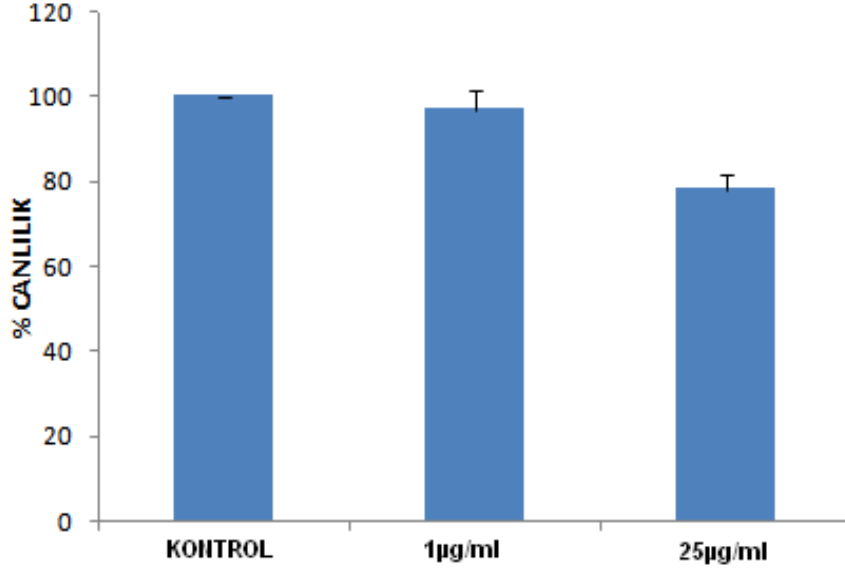
Gruplar arasındaki farkları analiz için Studen t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4. 1. MTT Testi Sonuçları

4. 1. a. Difteri Toksininin Hücre Canlılığına Etkisi

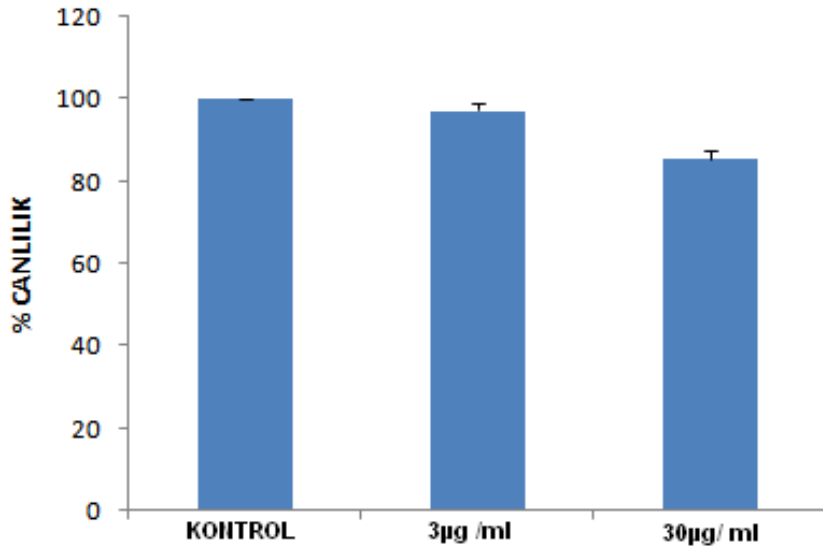
1 µg/ ml difteri toksini ile uyardığımız hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olmazken, 25 µg/ ml toksin ile uyardığımız hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. ($p < 0,05$)



Grafik 1: Difteri Toksini ile Uyarılan MKH'lerdeki Canlılık Oranı (ortalama \pm ortalamanın standart sapması)

4.1. b. Stafilokokal Enterotoksin B 'nin HÜcre Canlılığına Etkisi

3 µg/ ml Stafilokokal Enterotoksin B ile uyardığımız hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olmazken, 30µg/ ml toksin ile uyardığımız hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. ($p < 0.05$)



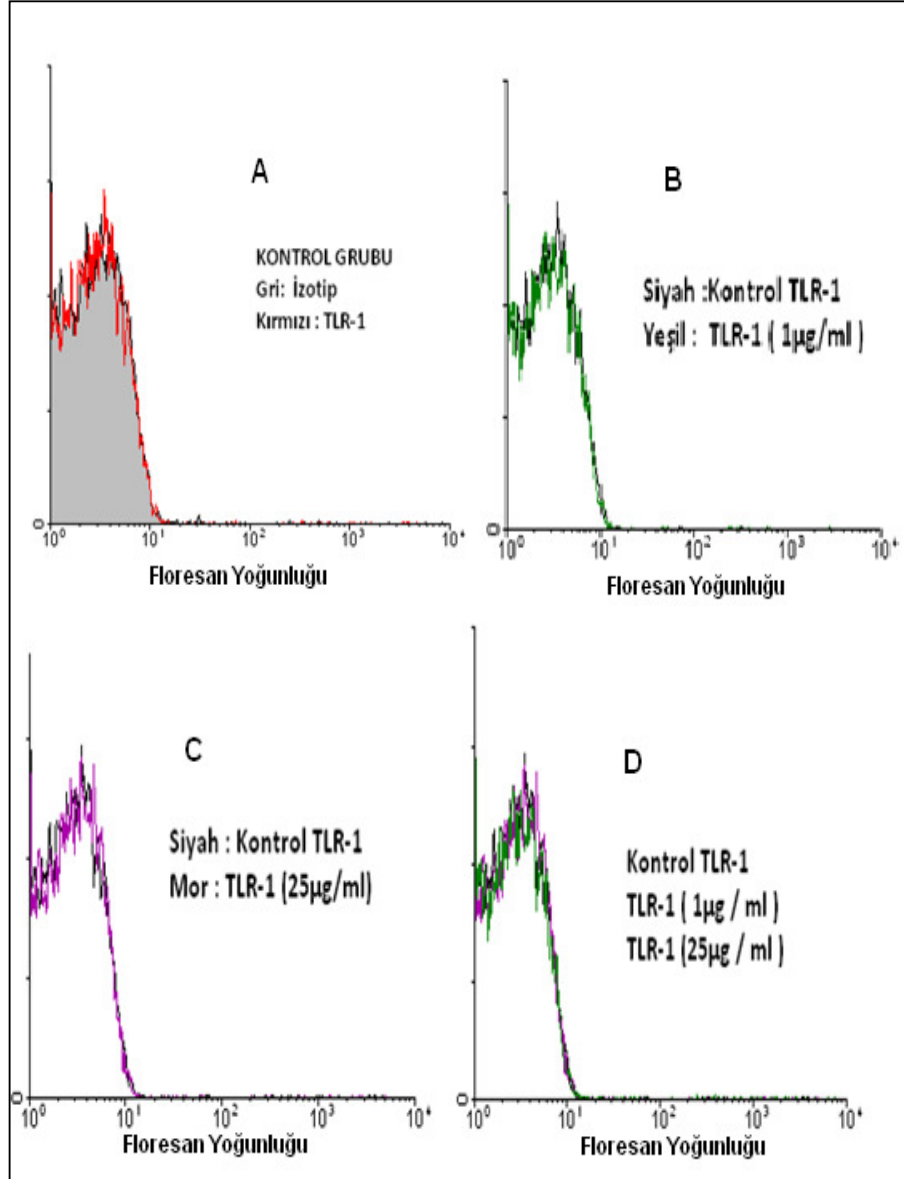
Grafik 2: Stafilokokal Enterotoksin B ile Uyarılan MKH'lerdeki Canlılık Oranı (ortalama ± ortalamanın standart sapması)

4. 2. a Difteri Toksininin TLR İfadelenmesine Etkisi

Histogram A 'da G2a: Rpe (İzotip) antikoru ve TLR-1 antikoru ile boyanan kontrol grubu hücreleri karşılaştırıldı. Burada İzotip ile boyanan kontrol grubu hücreleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol grubu hücreleri TLR-1 (kırmızı) ifadelenmesi yönünden, negatif kontrol (izotip) ile karşılaştırıldığında (gri çizgi) aralarında bir fark olmadığı görüldü. (şekil 9) Histogram B 'de kontrol grubu (siyah) ile 1 µg/ ml toksin ile uyarılan hücrelerdeki TLR-1(yeşil) ifadelenmesi karşılaştırıldı arada bir fark olmadığı görüldü. Histogram C 'de kontrol grubu ile (siyah) 25 µg/ ml toksin ile uyarılan hücrelerde (mor) TLR-1 ifadelenmesi karşılaştırıldı ve fark olmadığı görüldü. Histogram D'de ise TLR-1 ifadelenmesi açısından 3 grup karşılaştırıldı ve bu sonuçlara göre difteri toksininin MKH'lerde TLR-1 ifadelenmesinde etkisi olmadığı görüldü. (şekil 9)

1 µg/ ml ve 25 µg/ml difteri toksini ile uyarılan MKH'lerde TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-8 ve TLR-9 ifadelenmesi açısından kontrol grubu ile bir fark olup olmadığını görebilmek için yukarıda belirtilen karşılaştırma her grup için ayrı ayrı yapıldı. Bu toksinin MKH'lerde TLR ifadelenmesine herhangi bir etkisi olmadığı görüldü.

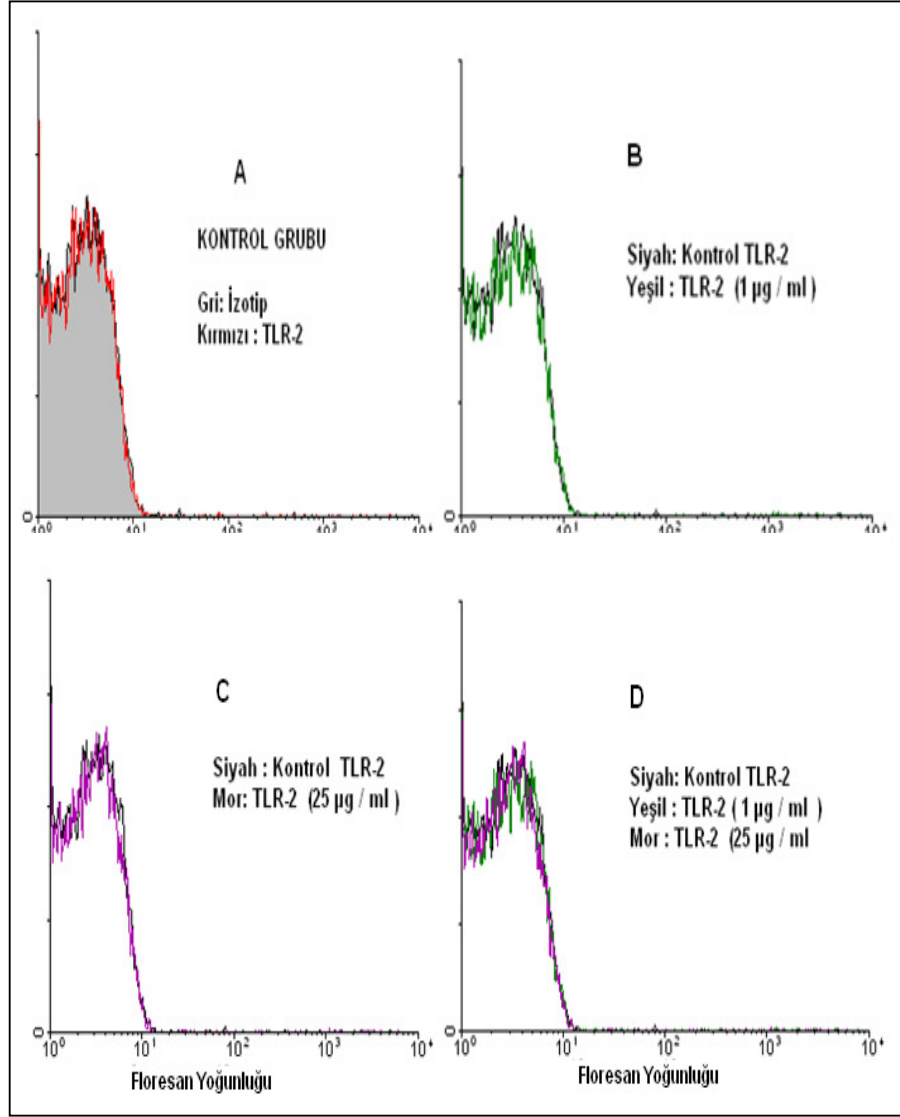
4. 2. b. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-1 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 9: Difteri Toksininin TLR-1 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre difteri toksininin TLR-1 ifadenmesine etkisi yoktur.

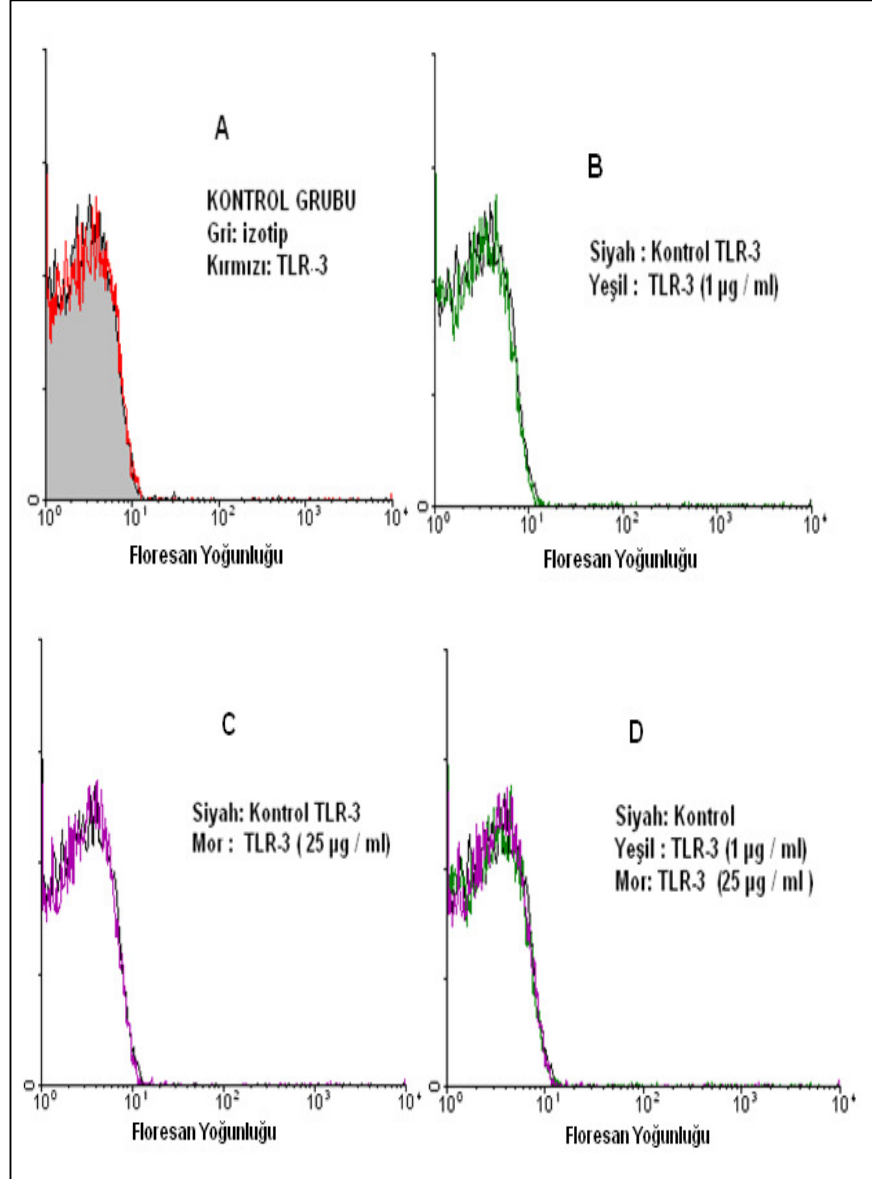
4. 2. c. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-2 İfadelenmesinin Karşılaştırılması



Şekil 10: Difteri Toksininin TLR-2 ifadenmesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre difteri toksininin TLR-2 ifadenmesine etkisi yoktur.

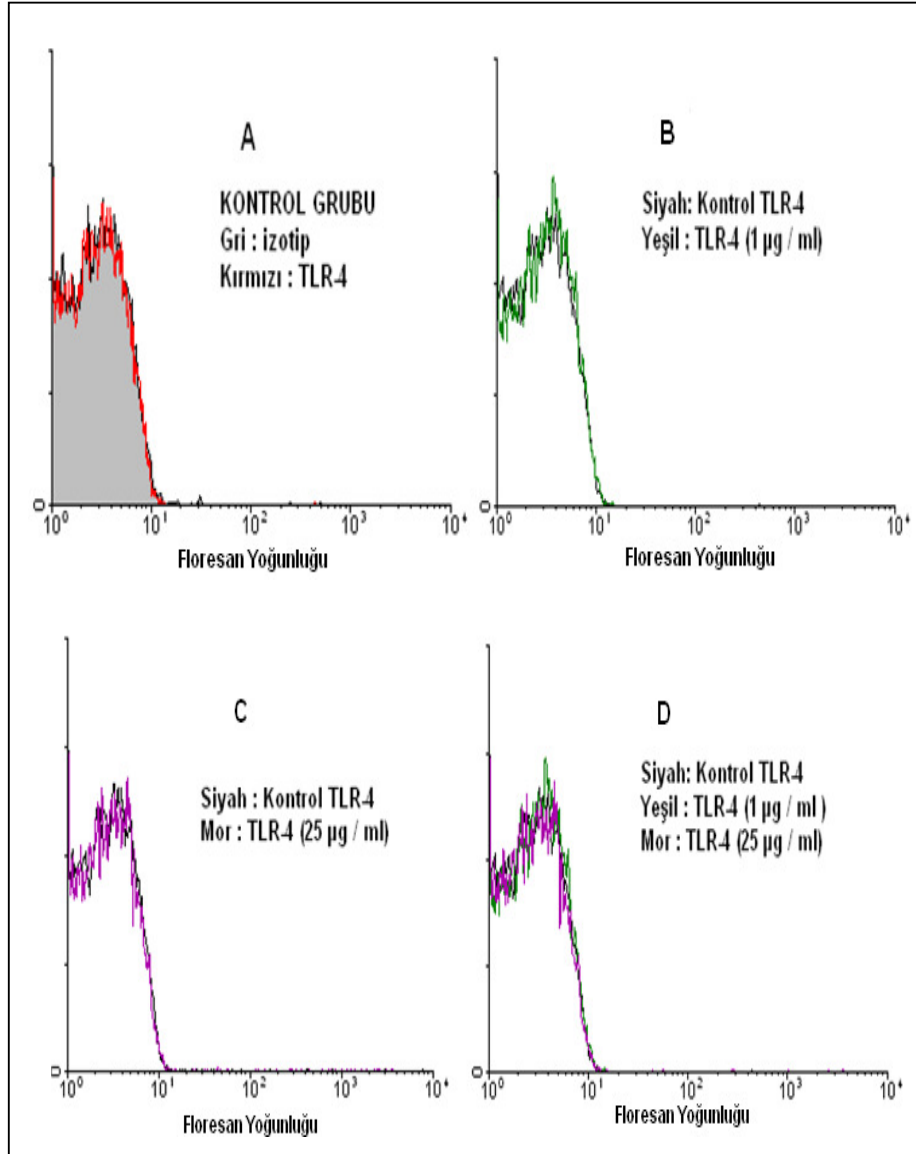
4. 2. d. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-3 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 11: Difteri Toksininin TLR-3 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre difteri toksininin TLR-3 ifadenmesine etkisi yoktur.

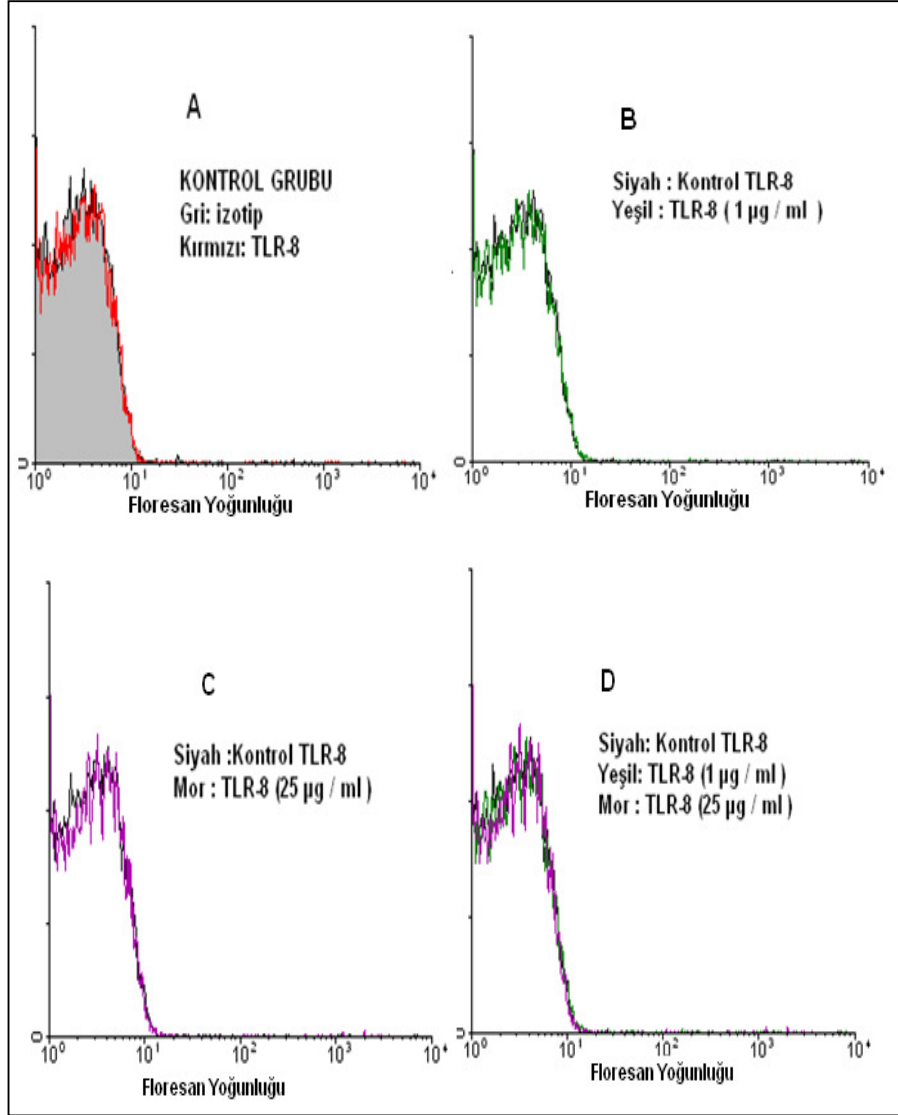
4. 2. e. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-4 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 12: Difteri Toksininin TLR-4 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre difteri toksininin TLR-4 İfadelemesine etkisi yoktur.

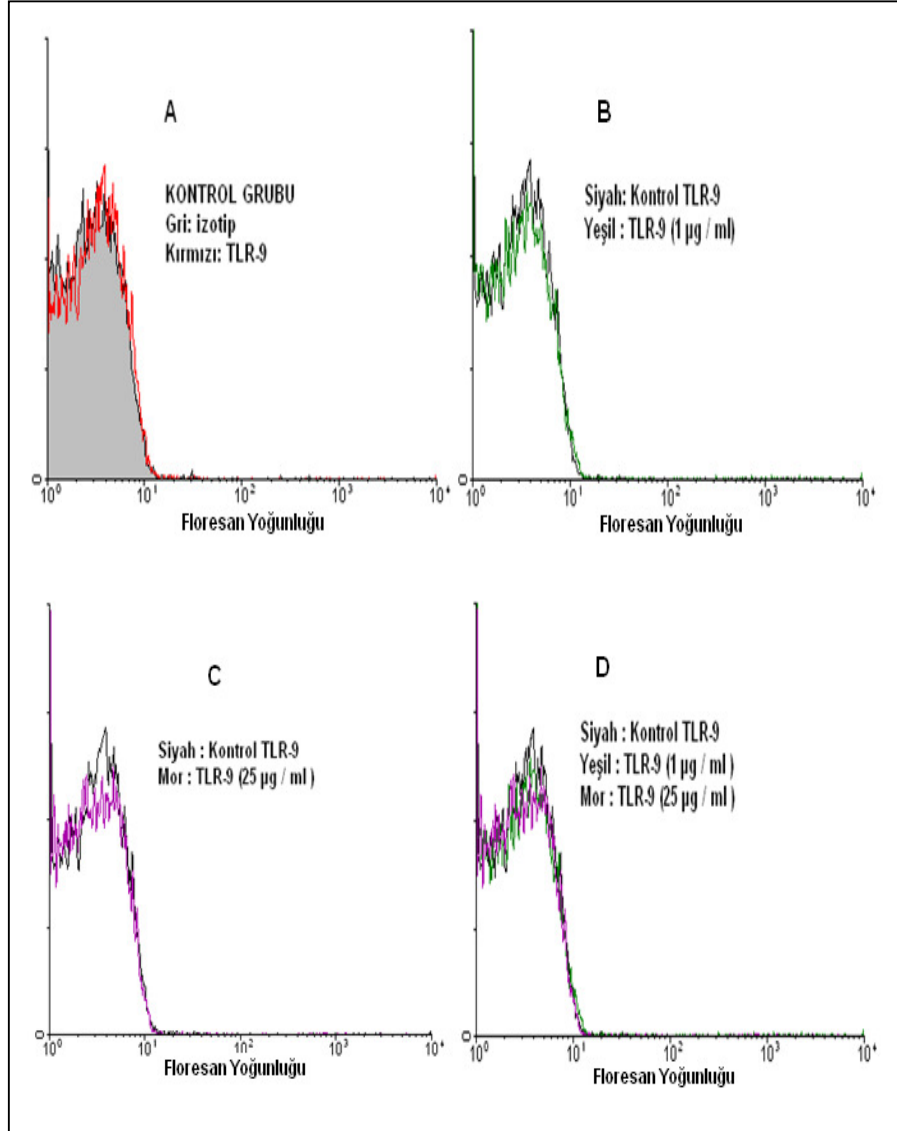
4. 2. f. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-8 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 13: Difteri Toksininin TLR-8 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre difteri toksininin TLR-8 İfadelemesine etkisi yoktur.

4. 2. g. Difteri Toksini İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-9 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 14: Difteri Toksininin TLR-9 İfadelemesine Etkisi

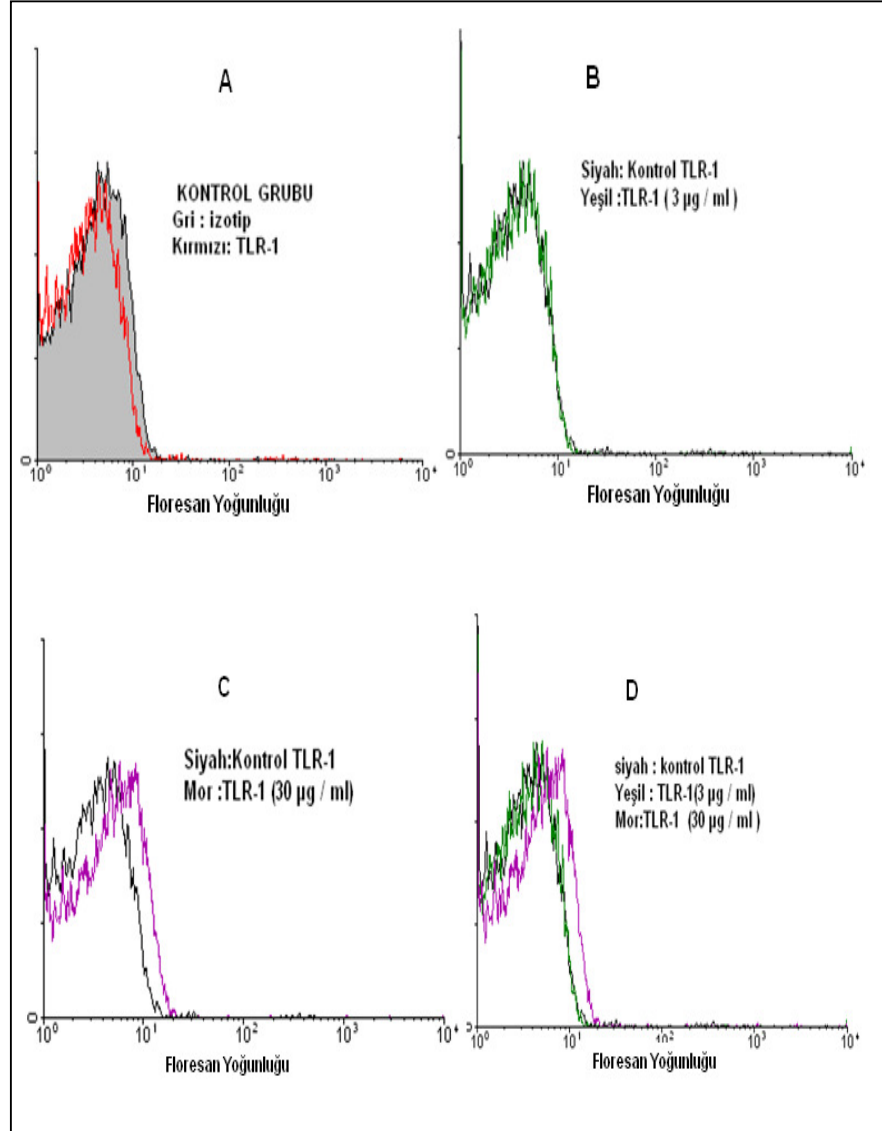
Yapılan karşılaştırmalara göre difteri toksininin TLR-8 İfadelemesine etkisi yoktur.

4. 3. a. Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR İfadelenmesine Etkisi

Histogram A 'da G2a: Rpe (İzotip) antikor ve TLR-1 antikor ile boyanan kontrol grubu hücreleri karşılaştırıldı. Burada İzotip ile boyanan kontrol grubu hücreleri negatif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol grubu hücreleri TLR-1 (kırmızı) ifadelenmesi yönünden, negatif kontrol (izotip) ile karşılaştırıldığında (gri çizgi) aralarında bir fark olmadığı görüldü. Histogram B 'de kontrol grubu (siyah) ile 3 µg/ ml toksin ile uyarılan hücrelerdeki TLR-1(yeşil) ifadelenmesi karşılaştırıldı arada bir fark olmadığı görüldü. Histogram C 'de kontrol grubu ile (siyah) 30 µg/ ml toksin ile uyarılan hücrelerde (mor) TLR-1 ifadelenmesi karşılaştırıldı. Toksin ile uyarılan hücrelerdeki floresan yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü. Histogram D'de ise TLR-1 ifadelenmesi açısından 3 grup karşılaştırıldı. Bu sonuçlara göre 30 µg/ ml S.E.B ile uyarılan hücrelerde TLR-1 ifadelenmesi artmıştır.

Kontrol grubuna göre, 3 µg/ ml ve 30µg/ ml toksin ile uyarılan MKH'lerde TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-8 ve TLR-9 ifadelenmesine etkisinin olup olmadığını görebilmek için yukarıda belirtilen karşılaştırma her grup için ayrı ayrı yapıldı. Karşılaştırmalar sonucunda TLR-2 ve TLR-3 ifadelenmesinde kontrol grubuna göre floresan yoğunluğunda bir artış olduğu diğerlerinde herhangi bir fark olmadığı görüldü.

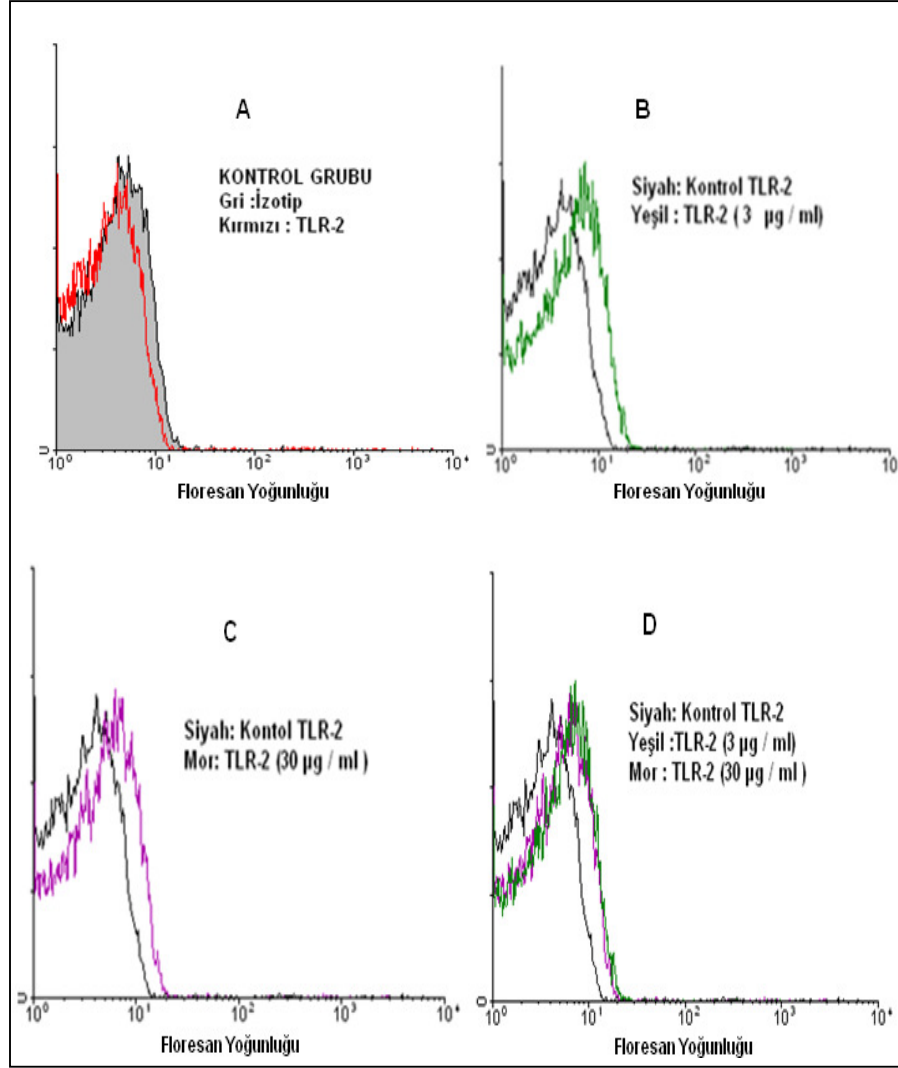
4. 3. b. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-1 İfadelenmesinin Karşılaştırılması



Şekil 15: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-1 İfadelenmesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre S.E.B 'nin 30 µg/ ml konsantrasyonu TLR-1 ifadenmesinde artışa neden olmuştur.

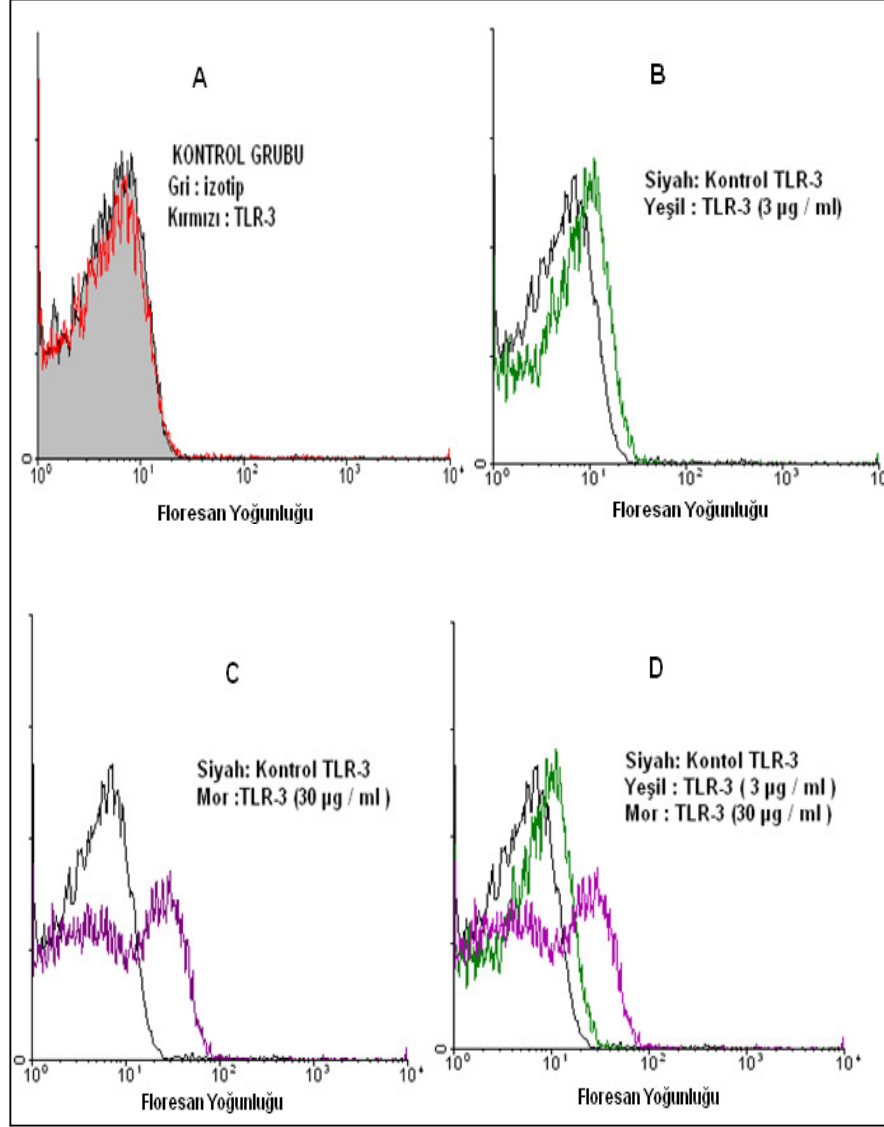
4. 3. c. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-2 İfadelenmesinin Karşılaştırılması



Şekil 16: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-2 İfadelenmesine Etkisi

Kontrol grubu hücrelerine göre 3 µg/ml ve 30 µg/ml S.E.B ile uyarılan hücrelerin yüzeylerinde TLR-2 ifadenmesinde bir artış olduğu görülmüştür.

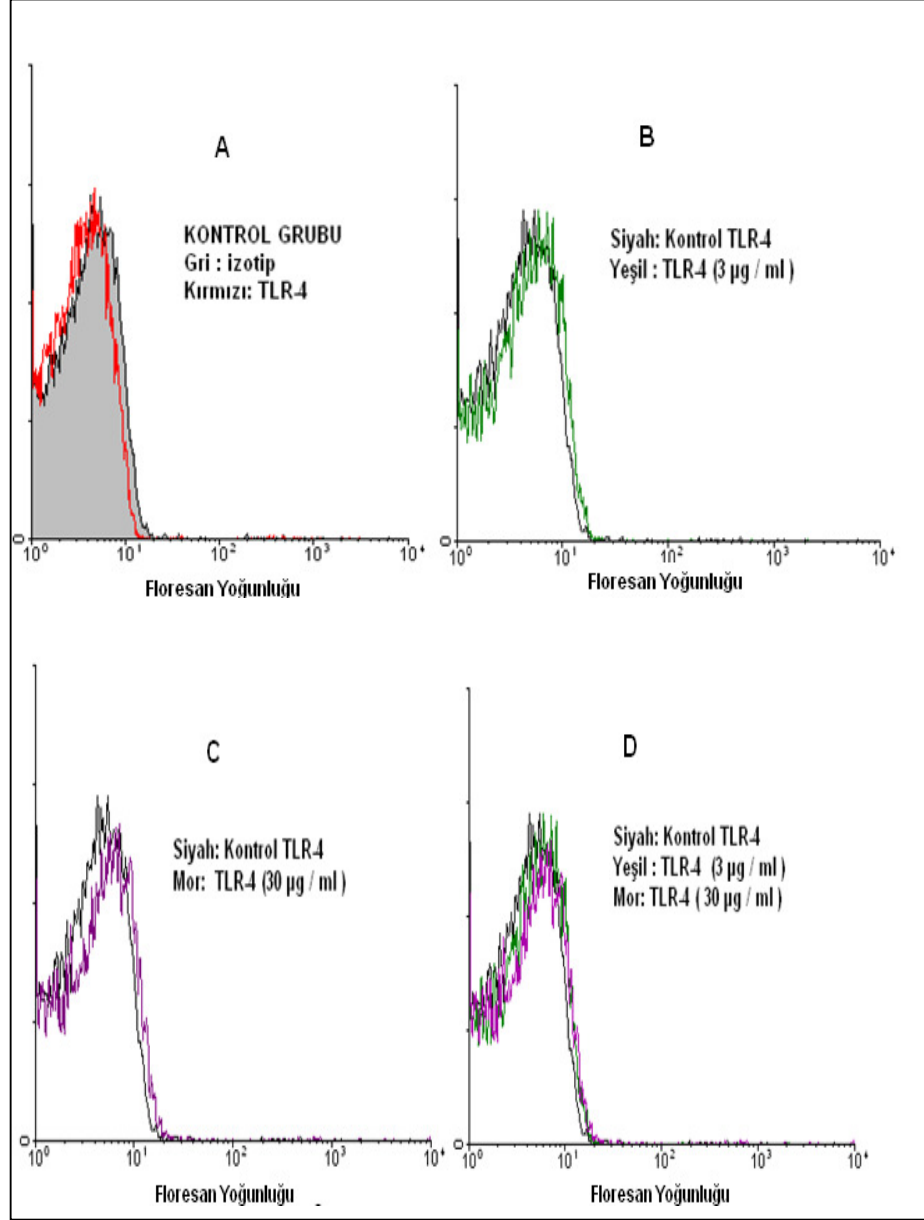
4. 3. d. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-3 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 17: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-3 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre 3 µg / ml ve 30 µg / ml S.E.B hücrelerde TLR-3 İfadelemesinin arttırdığı görülmüştür.

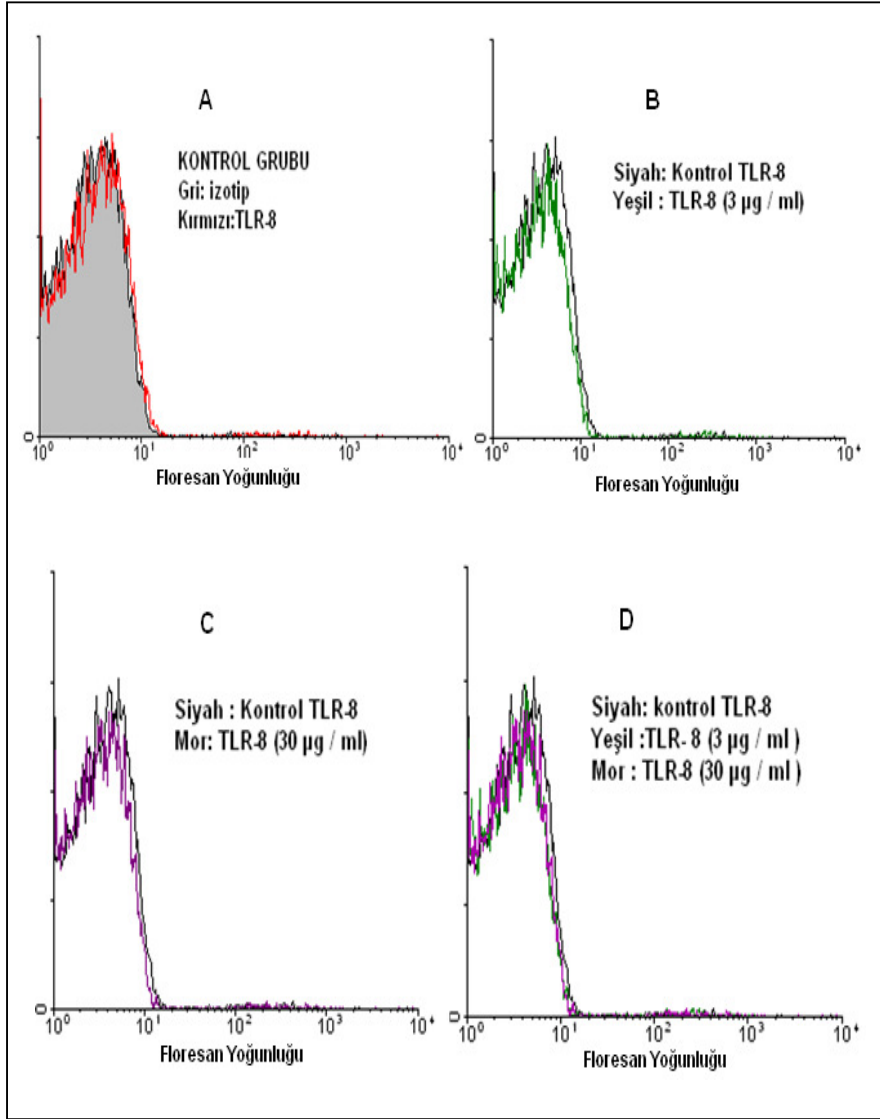
4. 3. e. Stafilokokal Enterotoksin B ile Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-4 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 18 : Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-4 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre S.E.B'nin TLR-4 İfadelemesinde etkisi yoktur.

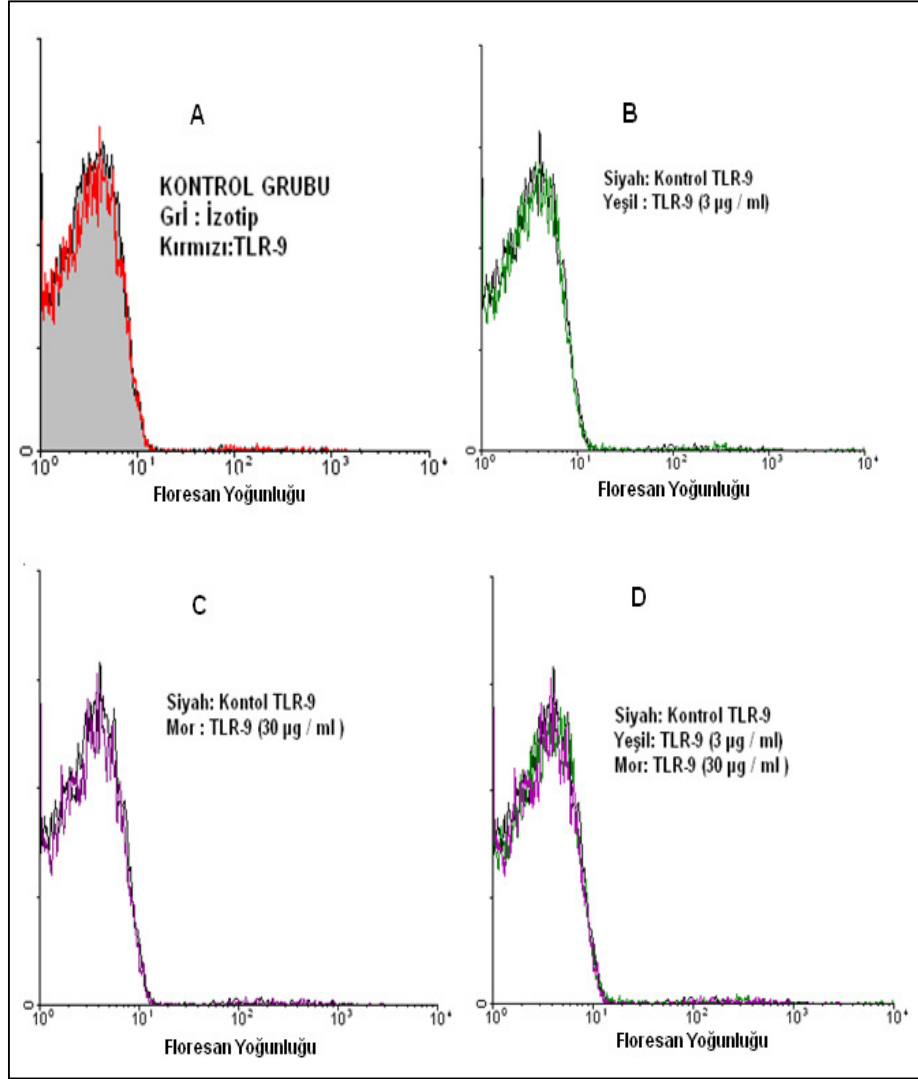
4. 3. f. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-8 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 19: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-8 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre S.E.B'nin TLR-8 ifadenmesinde etkisi yoktur.

4. 3. g. Stafilokokal Enterotoksin B İle Uyarılmış Hücrelerin Yüzeyinde TLR-9 İfadelemesinin Karşılaştırılması



Şekil 20: Stafilokokal Enterotoksin B'nin TLR-9 İfadelemesine Etkisi

Yapılan karşılaştırmalara göre S.E.B'nin TLR-9 ifadenmesinde etkisi yoktur.

5. TARTIŞMA

Kemik iliğinde her 10.000-100.000 tek çekirdekli hücreden birinin MKH olduğu hesaplanmaktadır. Kemik iliğinde hematopoezin meydana geldiği ortamdaki düzenli değişiklikler doğal immünite ve inflamasyon için çok önemlidir. Kemik iliği öncü hücrelerinden olan MKH'lerin hematopoezi desteklediği bilinmektedir fakat bu hücrelerin doğal immünite ve inflamasyon ile ilgisi henüz kanıtlanamamıştır. Bu ilişkinin açıklanabilmesi için kök hücrelerin reseptörleri, farklılaşma mekanizmaları özellikle MKH'lerin ifade ettiği Toll Benzeri Reseptörler araştırmacıların ilgisini çekmektedir.^{1,10}

Literatürde MKH'lerinde ifadelenen TLR'ler ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamakla beraber bu konu ile ilgili çalışmalarda akış sitometrisi yöntemi ve RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar daha çok, MKH'lerde TLR ifadelenmesi mRNA düzeyinde gösterilmesi ile ilgilidir. Fakat bu çalışmalar genellikle birbirinden farklı sonuçlar sunmaktadır. Bu nedenle çalışmalardan MKH'lerde hangi TLR'ün ekspresse olduğu ile ilgili anlamlı ve kapsamlı bir sonuç çıkarmak çok da mümkün olmamaktadır.

Örneğin Cho ve arkadaşları insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde RT-PCR yöntemini kullanarak TLR-1'den TLR-10 'a kadar TLR ifadelenmesini araştırdıkları çalışmada bu hücrelerin yüksek seviyede TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 ve düşük seviyede de TLR-1, TLR-5, TLR-9 ifade ettiklerini belirtmişlerdir.⁷³

Benzer yöntemle Tomchuck ve arkadaşlarının insan kemik iliğinden elde ettikleri MKH'lerde TLR ifadelenmesini araştırmak için yaptıkları çalışmada, bu hücrelerde TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5 ve TLR-

6'nın ifade olduğunu diğerlerinin ise bu hücrelerde ifade olmadığını belirtmişlerdir. ⁸

Fischer ve arkadaşlarının, fare kemik iliğinden elde edilerek, kültür ortamında çoğalttıkları MKH'lerde TLR mRNA ekspresyonunu araştırmak için RT-PCR yöntemini kullandıkları çalışma sonucunda MKH'lerin TLR-1 ile TLR-8 'e kadar bütün mRNA'ları ifade ettikleri fakat TLR-9 mRNA'sını ifade etmediklerini belirtmişlerdir. ¹¹

Görüldüğü gibi kemik iliği mezenkimal kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda aynı yöntemler kullanılmasına rağmen araştırmacılar farklı sonuçlar elde etmiştir. Bu sonuçlar bize mezenkimal kök hücreleri ile yapılan çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin nedenlerinden birinin de kök hücrelerin pasajlanma sayısına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bazı çalışmalar MKH'lerin in vitro kültürleri sırasında (12-16 pasaj) bazı kemokin reseptörlerinde farklılıklar olduğunu göstermektedir. ⁷⁴

TLR-3 hücrelerde endozomlarda ifadelenmektedir. Tomchuck ve Cho yaptıkları çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerdeki TLR-3 'un diğer hücrelerde olduğu gibi hücre içerisinde ifadelendiğini göstermişlerdir. ^{8,73} Yaptığımız çalışmada Stafilokokal Enterotoksin B ile uyardığımız hücrelerin yüzeyinde TLR-3 ifadelenmesinde toksin konsantrasyonuna bağlı olarak, kontrol grubu hücrelerine göre bir artış olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda görülen bu farklılığın, daha önce de belirttiğimiz gibi hücrelerin pasaj sayısına bağlı olarak hücrelerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Gram pozitif bakteriler, ekzotoksin, peptidoglikan, teikoik asit gibi hücre duvarı komponentleri ve süperantijenleri ile septik şoka neden olmaktadır. Stafilokokal Enterotoksin B çözünebilir hücre dışı bir ekzotoksin ve süperantijendir. Gram pozitif stafilokok ailesi tarafından meydana getirilir. Bu toksin septik şok sendromu, bağırsak hastalıkları gibi durumlarda güçlü bir şekilde immün sistemi uyarır. Ayrıca gıda zehirlenmesinde de önemlidir.⁷⁵ İmir ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, normalde IL-2 uyarımı ile LAK hücresi haline gelen NK hücrelerinin, SEB ile 16 saat uyarımından sonra LAK hücresi haline geldiği gösterilmiştir.⁷⁶ NK hücrelerinin bu şekilde SEB etkisi ile LAK hücresi haline gelmesinde TLR'lerin rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda 30 µg / ml Stafilokokal Enterotoksin B ile 24 saat uyardığımız hücrelerde TLR-1'in ifadenmesinde kontrol grubuna göre bir artış görülmüştür. Bu sonuç toksin miktarının TLR-1 ifadenmesini uyardığını göstermektedir. 3 µg / ml ve 30 µg / ml Stafilokokal Enterotoksin B ile 24 saat uyardığımız hücrelerde ise TLR-2 ekspresyonu kontrol grubu hücrelerine göre yüksek çıkmıştır. Literatürde Gram pozitif hücrelerin patojen ile ilişkili moleküler yapılarının (PAMP) TLR-2 aracılığı ile tanındığı ayrıca TLR-2'nin TLR-1 ve TLR-6 ile birlikte çalıştığı söylenmektedir.^{13,21} Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar bize Stafilokokal Enterotoksin B 'nin mezenkimal kök hücrelerdeki TLR-2 ve TLR-1'in ligantı olabileceğini düşündürmektedir.

Fischer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, TLR-2'nin in- vitro şartlarda MKH'lerdeki proliferasyonu ve farklılaşmayı etkilediğini söylemektedirler. Bu çalışmada TLR-2'nin prototipik bir ligantı olan Pam3Cys'nin MKH kültürüne ilavesi ile hücrelerde meydana gelmesi gereken kemik dokuyu, kırık dokuyu ve yağ dokuyu oluşturan hücrelere farklılaşmanın inhibe olduğu belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada MyD88 eksik farelerden elde edilen MKH'lerin kemik dokuyu ve

kıkırdak dokuyu oluşturan hücelere farklılaşmasının zayıf olduğu söylenmektedir. ¹¹

TLR-2 'nin MKH'lerde önemli olduğunu literatürdeki bazı çalışmalar göstermektedir. Yaptığımız çalışma sonucunda Stafilokokal Enterotoksin B'nin mezenkimal kök hücelerdeki TLR-1 ve TLR-2 ile ilişkisi olabileceğini gördük. Bu konuda daha kesin sonuçlar elde edebilmek destekleyici araştırmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ

TLR'ler doğal immün sistemde patojen ile ilişkili yapıları tanımada görev alan önemli bir reseptör ailesidir ve mezenkimal kök hücrelerde de ekspresse olmaktadır.

Yaptığımız çalışmada difteri toksini ve S.E.B' nin konsantrasyon artışına göre hücrelerin canlılıklarına etki ettiklerini gördük. Difteri toksini ile uyardığımız hücrelerde TLR ifadenmesi açısından kontrol grubu ile hiçbir fark görülmezken, S.E.B ile uyardığımız hücrelerde TLR-1, TLR-2 ve TLR-3 açısından kontrol grubuna göre farklılıklar meydana gelmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerdeki TLR'lerin de bu hücrelerin farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu yüzden S.E.B 'nin bu hücrelerdeki TLR 'lere etkisinin daha ileri düzeyde yapılacak çalışmalar ile araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

7. ÖZET

Gram Pozitif Bakteriyel Toksinlerin Mezenkimal Kök Hücrelerdeki Toll Benzeri Reseptörlere Etkisinin Araştırılması

Toll benzeri reseptörler (TLR), doğal immün sistemde görev alan patojen tanıyan reseptör (PRR) ailesi üyelerindedir. Pek çok hücre yüzeyinde ekspresse olurlar. Patojen ile ilişkili moleküler yapıları (PAMP) tanıyarak doğal immün sistemi aktive ederler. Mezenkimal kök hücrelerde ekspresse olan TLR'in bu hücrelerin çeşitli dokulara farklılaşmasında önemli rolleri olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda difteri toksini ile Stafilokokal Enterotoksin B'nin (S.E.B) insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) canlılığına ve TLR ekspresyonuna etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış toksinler ile 24 saat uyarılan MKH'lerin canlılıkları MTT testi ile incelenmiştir. Difteri toksininin 25 µg/ml konsantrasyonu ve S.E.B'nin 30 µg/ml konsantrasyonu hücre canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaltmıştır.

Difteri toksini ve S.E.B ile uyarılan hücrelerde TLR ifadenmesini araştırmak için özgül antikorlar kullanılmış ve hücreler akış sitometrisi yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan analizler sonucu difteri toksininin MKH'lerde TLR ifadenmesine etkisi görülmemiştir. S.E.B 'nin 30 µg/ml konsantrasyonu TLR-1 ifadenmesini artırırken, 3 µg/ml ve 30 µg/ml konsantrasyonu TLR-2 ve TLR-3 ifadenmesini arttırmıştır. S.E.B'nin diğer TLR'lerin ifadenmesine etkisi görülmemiştir.

Literatürde S.E.B 'nin MKH'lerdeki TLR'lere etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden çalışma sonunda elde edilen veriler S.E.B 'nin MKH'lerde TLR'lerin bir ligantı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Doğal immünite, Toll Benzeri Reseptörler, Mezenkimal Kök Hücreler

8. SUMMARY

Investigations for effects of toxins from gram positive bacteria on toll-like receptors of mesenchymal stem cells.

Toll-like receptors (TLRs) are members of pattern recognition receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMP) as an important component of innate immune responses. TLR expression by various cells of the innate immune system has been well characterized. However, there is some controversial information pertaining TLR expression by bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). The purpose of this study was to investigate the effects of Diphtheria toxin and Staphylococcal enterotoxin B (SEB) on TLR expression by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs).

MTT assay was used to determine viability of hBMSCs that were exposed to different concentrations of toxins for 24 hours.

TLR expression was explored using TLR-specific antibodies by flow cytometry.

Diphtheria toxin did not affect TLR expression at all. However, SEB changed TLR expression in a dose dependent fashion. For example, while 30 µg/ml SEB increased expression of TLR-1, SEB at the concentrations of both 3 µg/ml and 30 µg/ml increased expression of both TLR-2 and TLR-3. SEB did not affect expression of the other TLRs.

First of all, the results of this study have suggested that SEB could be involved in regulation of TLR-1, TLR-2, and TLR-3 expression by hBMSCs. Secondly, these findings indicate a novel discovery since no literature pertaining effects of SEB on TLR expression by hBMSCs. Therefore, further investigations are needed to make a final definitive conclusions about the regulatory roles of SEB on TLR expression particularly by hBMSCs.

Key words: Innate Immunity, Toll Like Receptors, Mesenchymal Stem Cells

9. KAYNAKLAR

1-Shi L, Wang J.S, Liu X, Xiao H, Fang O. Upregulated functional expression of toll like receptor 4 in mesenchymal stem cells induced by lipopolysaccharide. Chinese Medical Journal 2007; 120 (19) : 1685-1688.

2- Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by toll-like receptors. Current Opinion Immunology 2002; 14: 380–383

3-Nahoum ST, Medzhitov R. Toll- like receptors and cancer. Nature Reviews Cancer 2009; 9(11): 57-63

4-Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. Microbes and Infection 2004; 6: 1382–1387

5-Werling D, Jann OC, Offord V, Glass EJ, Coffey TJ. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. Trends Immunol. 2009; 30 (3) : 124-130

6-Sandor F, Buc M. Toll-like receptors structure, function and their ligands. Folia Biologica 2005; 5: 148-156

7-Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. Current Opinion in Immunology 2000, 12: 13–19

8-Tomchuck SL, Zvezdaryk K, Coffelt SB, Waterman R, Danka ES. Scandurroa. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. Stem Cells 2008; 26: 99–107

9-Placzek MR, Chung M, Macedo HM, Ismail S, Blanco TM, Lim M, Cha J, Fauzi I, Kang Y, David CL, Joan Ma YC, Polak MJ, Panoskaltsis N, Mantalaris A. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. J R Soc Interface 2009; 6: 209–232

10-Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith E, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid Aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 2004;22: 675–68

11-Fischer M, Morad V, Cohen M, Rousso L, Zanin A, Cohen S. Cohen IR, Zipori D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* 2007; 109(4):1422-32

12-Abbas AK, Lichtman AH, editors. *Temel İmmünoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2007

13-Takada K, Akira S. Toll -like receptors in innate immunity. *International Immunology* 2005; 17: 11-14

14-İmir T. İmmünoloji'ye Giriş. İçinde: Ustaçelebi Ş, editörler. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. s. 119-125

15-Tuğrul T, Ersoy F. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni toll like reseptörler. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 114-118

16-Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *International Immunopharmacology* 2001; 1: 625–635

17-Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40: 97-112

18-Cengiz A.B. Sepsis patogenezi. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi* 2007; 1: 63-5

19-Holger H, Ulmer AJ, Recognition of bacterial products by toll-Like receptors. *Chem Immunol Allergy* 2005; 86: 99–119

20-Yüksel H. Alerjik yanıtta genetik faktörler ve gen çevre etkileşimi. *C.B.Ü. Sağlıkta Birikim Dergisi* 2006; 1(1): 5-9

21-Takada K, Kaisho T, Akira S. Toll- like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76

22-Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation the potential role of toll-like receptors. *American Journal of Transplantation* 2005; 5: 969–975

23-Damo X, Haiying L, Mousa KK. Direct and indirect role of toll-like receptors in T Cell Mediated Immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 2004; 1(4):239-246.

24-Vega M, Martín A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. *Allergol et Immunopathol* 2008; 36(6):347-57

25-Trinchieri G, Sher A. Cooperation of toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 179-190

26-Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells* 2001; 6: 733-742

27-Jin MS, Lee JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 2008; 29 (2): 182-91

28-Takeda K, Akira S. Microbial recognition by toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science* 2004; 34: 73-82

29-Schnare M, Röllinghoff M, Qureshi S. Toll -like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *Allergy and Immunology* 2006; 139: 75-85

30-Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia OP, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of the toll like receptors in the development of sepsis. *Shock Society* 2008; 29(3) : 315-321

- 31-Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16: 538–544
- 32-Vandewalle A. Toll-like receptors and renal bacterial infections. *Chang Gung Med J.* 2008; 31(6) : 525-37
- 33-Kawai T, Akira S. Toll- like receptors and RIG-1-like receptor signaling. *New York Acedemy of Sciences* 2008; 1143: 1-20
- 34-Bell J, Askins J, Hall P, Davies D, Segal M. The dsRNA binding site of human toll-like receptor 3. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 2006; 103(23):8792-7
- 35-Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clinical Microbiology* 2008; 21: 13-25
- 36-Schro M, Bowie AG. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends in Immunology* 2006; 26(9): 462-467
- 37- Menager P, Roux P, Megret F, Bourgeois JP, Le Sourd AM, Danckaert A, Lafage M, Prehaud C, Lafon M. Toll-Like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus negri bodies. *Plos Pathogens* 2009; 5:(2) 1-15
- 38-Xagorari A, Chlichlia K. Toll-like receptors and viruses. Induction of Innate antiviral immune responses. *The Open Microbiology Journal* 2008; 2: 49-59
- 39-Matsumoto M, Seya T. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 805–812
- 40-Mutlu G. Mikrobiyolojiye Giriş: içinde Ustaçelebi Ş, editörler. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. 3-21

- 41-Hallman M, Rämetsä M, Ezekowitz RE. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *International Pediatric Research* 2001; 50: 315–321
- 42-Katherine A, Fitzgerald D, Rowe C, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes and Infection* 2004; 6: 1361–1367
- 43-Takamura SA, Miyake K. TLR accessory molecules. *Current Opinion in Immunology* 2008; 20: 420–425
- 44-Steiner TS. How flagellin and toll like receptor 5 contribute to enteric infection. *Infection and Immunity* 2007; 75:(2) 445-452
- 45-Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 5165–5175.
- 46-Hornung V, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2008; 183: 72-86
- 47-Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, Hamm S. Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology* 2008; 213: 315–328
- 48-Landenberg P, Bauer S. Nucleic acid recognizing toll-like receptors and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 2007; 19: 606–610
- 49-Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and type I interferons. *The Journal Of Biological Chemistry* 2007; 282 (21) : 15319–15324
- 50-Diebold SS. Recognition of viral single-stranded RNA by toll-like receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008; 60: 813–823

- 51-Robbins M, Judge A, MacLachlan L. siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 2009;19(2): 89-102
- 52-Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunological Reviews* 2007; 220: 251–269
- 53-Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001; 19: 157-61
- 54-Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. Expression and distribution of toll-like receptors 11–13 in the brain during murine neurocysticercosis. *Journal of Neuroinflammation* 2008; 5: 53-64
- 55-Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2006; 36(3):255-9.
- 56-Oda K, Kitano H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Molecular Systems Biology* 2006; 15: 1-19
- 57-Seki E, Brenner DA. Toll-Like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48: 322-335
- 58-O'Neill AJ. The role of MyD88-like adapters in toll-like receptor signal transduction. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31:(3) 643-647
- 59-Kenny EF, Neill LJ. Signalling adaptors used by toll-like receptors: An update. *Cytokine* 2008; 43: 342–349
- 60-Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie M.C. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal. *Blood* 2001; 98: 2615-2625
- 61-Keith WN. From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia. *Oncogene* 2004; 23: 5092–5094

62-Sağsöz H, Ketani MA. Kök hücreler. Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg. 2008; 1 (2): 29 – 33

63-Crawford J, Turner M. Stem cell therapies: hype or reality? J. R.Coll Physicians Edinb. 2008; 38: 221–3

64-Soukup T, Mokry J, Karbanova J, Pytlik R, Suchomel, Kucerova L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. Acta Medica 2006; 49(1):27–33

65-Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological Features, and potential for homing. Stem Cells 2007; 25: 2739 –2749

66-Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. Blood 1998; 92: 2609-2612

67- Erol İ, İşeri Ö. Stafilokokal enterotoksinler. Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi 2004; 51: 239-245

68-A.Tevfik Cengiz. Staphylococcus. içinde Ustaçelebi Ş, editörler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. 339-347

69- Fischer A, Eiff C, Kuczius T, Omoe K, Peters G. Becker K. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. J Mol. Med. 2007; 85: 461–469

70-Doğan A, Doğan AL, Canpınar H, Demirpençe E. Hidroksiürenin lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına etkileri. Türk Biyokimya Dergisi 2004; 29 (3); 232-236.

71-SipahiC, Özen J, Ural AU, Dalkız M, Beydemir B. Beş farklı protez kaide materyalinin gingival fibroblastlar üzerine olan etkilerinin incelenmesi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2005; 47: 275-278

72-Yaka E. Eğrimez MY, Keskinöglü P, Çavdar Z, Genç Ş, Genç K, İyilikçi L, Yener GG. Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (Bos) biyolojik belirteçler ve Bos'un PC12 hücre hattı canlılık üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Geriatrics* 2006; 9 (1): 1-7

73-Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2006; 24(12):2744-52

74-Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* 2007; 69(1):1-9

75-Calkins CM, Barsness K, Bensard DD, Torres AV, Raeburn CD, Meng X, McIntyre R. Toll-like receptor-4 signaling mediates pulmonary neutrophil sequestration in response to gram-positive bacterial enterotoxin1. *Journal of Surgical Research* 2002; 104: 124–130

76- Bankhurst AD, Imir T. The mechanisms involved in the activation of human natural killer cells by staphylococcal enterotoxin B. *Cell Immunol*. 1989; 122(1):108-21.

10. ÖZGEÇMİŞ

MELEK YAMAN

Doğum Tarihi : 03.03.1984

Doğum Yeri : Ankara

Meslek : Biyolog

Yazışma Adresi :Barıştepe Mahallesi 755.Sokak No: 17 / 8
Yenimahalle / Ankara

E.mail : yamanmelek84@hotmail.com

EĞİTİM

2007-2009 : (Yüksek Lisans) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Ankara)

2003-2007 :(Lisans) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Ankara)

1999-2003 : (Lise) Yenimahalle Alparslan Süper Lisesi (Ankara)

1991-1999 : (İlköğretim) Şentepe İlköğretim Okulu (Ankara)

YABANCI DİL

İngilizce

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince değerli katkılarından dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr Semra KUŞTİMUR ve diğer değerli hocalarıma, danışman Hocam Sayın Prof. Dr Turgut İMİR'e, yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince laboratuvar çalışmalarım da bana yardımcı olan Hocam Sayın Doç. Dr Emin Ümit BAĞRIAÇIK'a sonsuz teşekkürler...

Yüksek lisans öğrenimimi 2228 kodlu Son Sınıf Lisans Öğrencileri İçin Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ile maddi açıdan destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürler...

Bana olan güveni ve desteğinden dolayı, çok değerli ağabeyim Sayın Salim AKAR' a sonsuz teşekkürler...

Değerli arkadaşlıkları ile her zaman yanımda olan Bio. Duygu KAHRAMAN, Bio. Songül TÜRK, Bio. Ayşe SEYER ve Vet. Hekim Sultan YOLBAKAN'a teşekkürler...

Hayatta aldığım kararlarda beni destekleyen, varlıkları ve sonsuz destekleri ile her zaman yanımda olduklarını bildiğim SEVGİLİ AİLEMİN her bir bireyine sonsuz teşekkürler...

MelekYAMAN