



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**FARKLI MEFV MUTASYONLU AİLEVİ AKDENİZ  
ATEŞİ HASTALARININ BEYAZ KAN HÜCRE  
KÜLTÜRÜNDE İNFLAMAZOM POLARİTE  
GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYİ VE  
KOLŞİSİN TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

Fatma ANADOLU

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir  
2022

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**FARKLI MEFV MUTASYONLU AİLEVİ AKDENİZ  
ATEŞİ HASTALARININ BEYAZ KAN HÜCRE  
KÜLTÜRÜNDE İNFLAMAZOM POLARİTE  
GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYİ VE  
KOLŞİSİN TEDAVİSİ İLE İLİŞKİSİ**

Fatma ANADOLU

Danışman  
Prof. Dr. Afig BERDELİ

Kök Hücre Anabilim Dalı  
Kök Hücre Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2022

## Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Prof.Dr. ....

(Danışman)

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: .....

## Önsöz

Tez konusunu belirlemedeki en büyük etken, yüksek lisans ders dönemi boyunca danışman hocamın yanına gittiğimde gelen çocuk FMF hastaların ailelerinin bizden medet umarak “Tedavi için daha farklı ne yapılabilir? Biz neler yapabiliriz? Bizi yönlendirir misiniz?” şeklindeki istekleri oldu. Eğitimim gereği onlara ilaç veya tedavi yöntemi tavsiye edebilecek yeterliliğe sahip olmadığımından, bu hastalığın nasıl bir hastalık olduğunu araştırarak sürece başladım. Araştırdıkça gördüm ki, FMF çok çalışılan bir hastalık olsa da gerek oluşum mekanizması, gerek atakların tam olarak nelerin tarafından tetiklendiğini, gerekse kullanılan ilaçların etki mekanizması konusunda çok sayıda görüş var. Hastalık kompleks bir hastalık olması, birçok sinyal yolağının birlikte active olması hastalığın gizemini korumasında çok büyük etki etmiştir. Ben de tez sürecimde bu açıklanması zor hastalığın karanlık yönlerini bir nebze olsun aydınlatmak, belki de biraz olsun literature katkı sağlayacak bulgular bulmak hevesi ile bilim yolculuğuma başladım. Özellikle hasta çağırma sürecinin tüm dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pandemi dönemine denk gelmesi, hem tahmin ettiğimizden daha az sayıda hasta ile çalışmamıza, hem de hastalara ulaşım açısından işleri zorlaştırırsa da; ailemin, arkadaşlarımın ve danışman hocamın da büyük desteği ile deney sürecini tamamlayıp yazım aşamasına gelebildim. Yazım aşamasında, anlamlı sonuçlar elde ederek bu süreci kendimce başarılı olarak tamamladığımı düşünüyorum.

İzmir, 17.05.2022

Fatma ANADOLU

## Özet

### **Farklı MEFV Mutasyonlu Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarının Beyaz Kan Hücre Kültüründe İnflamazom Polarite Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Ve Kolşisin Tedavisi İle İlişkisi**

Bu tezde, ülkemizde sıkça rastlanan bir genetik hastalık olan FMF hastalığının seyrine ışık tutmak amacıyla farklı MEFV gen mutasyonlu hastalardan periferik kan alınarak monosit-nötrofil hücre hattı oluşturulup, hücrelerin polarite genlerinin kontrol edilmesi ve FMF hastalığının tedavisinde tek seçenek olarak kullanılan kolşisin hücre polarite genlerinin ekspresyonuna etkisi gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, şu an için başka inflamasyon hastalıklarında kullanımı süren bir ilaç olan Canakinumab ilacı da aynı hücre hattı üzerinde değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlarla kolşisin tedavisine alternatif bir ilaç önermek amaçlanmıştır. Bu çalışma içerisinde bu amaçla PYCARD(diğer adı ile ASC), CASP-1, Pyrin ve IL-1 $\beta$  genlerinin ekspresyon düzeyi qPCR ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular, kolşisin hücre içi polarite genlerinin aktivasyonunda değişikliğe sebep olduğunu, FMF ile direkt ilişkisi bulunan MEFV geni tarafından kodlanan pyrin proteininin kolşisin uygulaması ile birlikte gen ekspresyonunun *in vitro* ortamda azaldığı, pyrin, ASC ve CASP-1 proteinleri arasında kompensatuvar bir mekanizma olabileceği ve kolşisin bu mekanizma üzerinde etki sayılabiliyor olabileceği bulgusu elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler; MEFV geni, pyrin, FMF, kolşisin, hücre kültürü**

## Abstract

### **Expression Levels of Inflammasome Polarity Genes in White Blood Cell Culture of Familial Mediterranean Fever Patients with Different MEFV Mutations and Relationship with Colchicine Treatment**

In this thesis, in order to shed light on FMF disease, which is a common genetic disease in our country, the control of the polarity genes' expression levels of patients with different MEFV gene mutations and the effect of colchicine treatment *in vitro* culture.

A monocyte-neutrophile cell line is formed, the control of the polarity genes of the cells and the effect of colchicine, which is used as the only option in the treatment of FMF disease, on the expression of cell polarity genes has been observed. In addition, Canakinumab, a drug currently used in other inflammatory diseases, was also evaluated on the same cell line, and it was aimed to suggest an alternative drug to colchicine treatment with the results obtained. For this purpose, the expression level of PYCARD (aka ASC), CASP-1, Pyrin and IL-1 $\beta$  genes was investigated by qPCR in this study. The findings show that colchicine causes changes in the activation of intracellular polarity genes, the gene expression of the pyrin protein encoded by the MEFV gene, which is directly related to FMF, decreases *in vitro* with colchicine administration, and there may be a compensatory mechanism between pyrin, ASC and CASP-1 proteins. It has been found that colchicine may have an effect on this mechanism.

**Keywords; FMF, Pyrin, MEFV gene, colchicine, hücre kültürü**

## İçindekiler

<b>Önsöz</b>	<b>II</b>
<b>Özet</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>V</b>
<b>Tablolar Dizini</b>	<b>VII</b>
<b>Şekiller Dizini</b>	<b>VIII</b>
<b>Kısaltma Listesi</b>	<b>IX</b>
<b>Giriş : Genel Bilgiler</b>	<b>1</b>
1. Sistemik Otoimmün Hastalıklar (SAID).....	1
1.1. Familial Mediterranean Fever (FMF).....	2
1.1.1. MEFV Geni.....	3
1.1.2. Pyrin Protein.....	3
1.1.3. Serum Amiloid A(SAA).....	4
1.1.4. IL-1 $\beta$ Ailesi.....	4
1.1.4.1. IL-1 $\beta$ Aktivasyonu.....	7
2. Kolşisin.....	8
3. Canakinumab.....	8
<b>Gereç ve Yöntem</b>	
<b>1. Araştırmanın Problemi.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Araştırmanın Sorusu.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Araştırmanın Hipotezleri.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Araştırmanın Varsayımları.....</b>	<b>11</b>
<b>5. Araştırmanın Sınırlılıkları.....</b>	<b>11</b>
<b>6. Araştırmanın Amacı.....</b>	<b>11</b>
<b>Yöntem.....</b>	<b>12</b>
1. Periferik Kandan Lökosit İzolasyonu.....	12
2. Hücre Kültürü ve IL-1 $\beta$ -Kolşisin-Canakinumab Uygulaması.....	14
3. RNA izolasyonu.....	15
4. RNA Miktarı Kontrol.....	16
5. cDNA Sentezi.....	16
6. cDNA Miktarı Kontrolü.....	17
7. qPCR.....	17

8. Data Analiz.....	17
<b>Bulgular</b>	<b>20</b>
<b>Tartışma</b>	<b>25</b>
<b>Sonuç ve Öneriler</b>	<b>30</b>
<b>Kaynaklar</b>	<b>31</b>
<b>Teşekkür</b>	<b>35</b>
<b>Özgeçmiş</b>	<b>36</b>



## **Tablolar Dizini**

**Tablo 1:** IL-1 Ailesi ve Reseptörleri

**Tablo 2 :** Çalışmada yer alan FMF hastalarının mutasyonları



## Şekiller Dizini

**Şekil 1:** Otoimmün hastalıklar ve SAID arası farklar

**Şekil 2:** Pýrin protein yapısı

**Şekil 3:** IL-1'in reseptörüne bağlanma şekli

**Şekil 4:** Canonical ve non-canonical IL-1 Aktivasyonu

**Şekil 5:** Kandaki gradient farkının görüntüsü

**Şekil 6 :** Deney akış şeması

**Şekil 7 :** FMF hastalarında IL-1 $\beta$  gen ekspresyonu değişimi(Kolşisin uygulaması ile)

**Şekil 8 :** FMF hastalarında IL-1 $\beta$  gen ekspresyonu değişimi(Canakinumab uygulaması ile)

**Şekil 9 :** FMF hastalarında CASP-1 gen ekspresyonu değişimi(Kolşisin uygulaması ile)

**Şekil 10 :** FMF hastalarında CASP-1 gen ekspresyonu değişimi(Canakinumab uygulaması ile)

**Şekil 11:** FMF hastalarında PYCARD(ASC) gen ekspresyonu değişimi(Kolşisin uygulaması ile)

**Şekil 12 :** FMF hastalarında PYCARD(ASC) gen ekspresyonu değişimi(Canakinumab uygulaması ile)

**Şekil 13 :** FMF hastalarında Pýrin gen ekspresyonu değişimi(Kolşisin uygulaması ile)

**Şekil 14:** Kolşisin'in ASC, CASP-1 ve Pýrin gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişim

## Kısaltma Listesi

<b>FMF</b>	:	Familial Mediterranean Fever
<b>MEFV</b>	:	Mediterranean Fever
<b>ASC</b>	:	Apoptosis associated Speck like protein containing a CARD
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	:	Interleukin 1 $\beta$
<b>CASP-1</b>	:	Kaspaz-1
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	:	Nuclear Factor kappa-b
<b>SAID</b>	:	Systemic AutoInflammatory Disease
<b>TIR</b>	:	Toll Interleukin-1 Receptor
<b>LPS</b>	:	LipoPoliSaccaride
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:	Tumor Necrosis factor alfa
<b>PBS</b>	:	Phosphate Buffered Saline
<b>RPMI</b>	:	Roswell Park Medical Institute Medium
<b>SAA</b>	:	Serum Amiloid A
<b>PyD</b>	:	Pyrin Domain
<b>cDNA</b>	:	Complementary DNA
<b>CARD</b>	:	CAspase Recruitment Protein

## Giriş: Genel Bilgiler

### 1. SİSTEMİK OTOİNFLAMATUAR HASTALIKLAR(SAİD)

Sistemik otoimmün hastalıklar, organizmanın doğuştan sahip olduğu bağışıklık sisteminde (innate immunity) meydana gelen düzenlenme bozukluklarından dolayı kaynaklanan hastalıklardır. Sistemik olarak tüm vücudu etkiler. Gruplamak gerekirse, otoimmün hastalıkların içinde yer aldığı varsayılabilir. Otoimmün hastalıklarda da SAİD'deki gibi bağışıklık sistemindeki anormal yanıtlar görülür. Fakat ikisi arasındaki ayırım, otoimmün hastalıklarda adaptif bağışıklık sistemi etkilerken, SAİD'de doğuştan bağışıklık sistemi etkilenir (Krainer, Siebenhandl & Weinhäusel, 2020). Doğuştan ve adaptif bağışıklık sisteminin temel hücreleri birbirinden farklıdır. Makrofajlar, monositler ve nötrofiller doğuştan bağışıklık sisteminin elemanları iken, T ve B hücreleri adaptif sistemin elemanlarıdır. Bu SAİD ve otoimmün hastalıkların ayırt edilmesinde kullanılan tanı kriterinde önemli bir noktadır. SAİD'de kanda testinde antijene özgü T-hücreleri veya yüksek miktarda otoimmün antikorları saptanmaz (McDermott et al., 1999). Ayrıca klinik tanıyı zorlaştıracak yüksek ateş, karın, eklem ağrısı ve deri semptomları da SAİD'de eşlik eder.

SAİD'nin oluşumunda tek veya çoklu gen mutasyonları sorumlu olabileceği gibi, çevresel faktörlerin tetiklediği şekilde seyreden tipleri de mevcuttur (Doria et al., 2012).

SAİD ve otoimmün hastalıkların farklılıkları olduğu kadar benzerlikleri de vardır. İkisinde de vücut kendi hücrelerine karşı bağışıklık yanıtı oluşturur. İkisinin de patolojisinde genetik altyapı etkilidir. Ayrıca uzun süreli B ve T hücreleri yanıtları, adaptif bağışıklığı tetikleyerek otoimmün hastalıkların oluşmasında yol oynar. Diğer bir benzerlik ise her iki hastalıkta da IL- $\beta$  molekülünün B ve T hücrelerine etki ederek yönlendirici bir görev almasıdır (Doria et al., 2012; Nigrovic, Lee & Hoffman, 2020).

*Differences between autoinflammatory and autoimmune diseases [4–10].*

	Autoinflammation	Autoimmunity
Immune dysregulation	Innate immune system	Adaptive immune system
Predominant cell types	Monocytes, macrophages, neutrophils	T cells, B cells
Cytokine targets used therapeutically	TNF, IFN $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-12, IL-23, IL-18	IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, IL-23
Pathogenesis of organ damage	Neutrophil- and macrophage-mediated	Autoantibody- or autoantigen-specific T cell-mediated

Şekil 1: Otoimmün hastalıklar ve SAİD arasındaki farklılıklar.

### 1.1. Familial Mediterranean Fever (FMF)

FMF, Doğu Akdeniz ve Ortadoğu bölgeleri başta olmak üzere dünyada en yaygın gözlemlenen otozomal resesif bir otoinflamatuar hastalıktır. Hastalığın oluşum sebebi MEFV (MEditerranean FeVer) geninde meydana gelen mutasyondur. MEFV geni, doğuştan gelen bağışıklık düzenleyici görevinde yer alan pyrin proteini kodlayan genidir. Semptomlar genellikle çocukluk döneminde başlar tekrarlayan yüksek ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı şeklindedir. Yüksek ateş ve karın ağrısı şikayetleri genellikle 48-72 saat içinde kendiliğinden geçebilmektedir. Tahlil bulgusunda yüksek eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif proteine ve akut inflamasyonda olduğu gibi trombosit, lökosit, fibrinojen ve immunoglobulinlere rastlanır. Enflamasyon kolşisin ve IL-1 inhibitörleri ile kontrol altına alınır (Schnappauf, Chae, Kastner & Aksentijevich, 2019).

Hastalara tanı konulabilmesi için sağlaması gereken semptomlar Tel-Hashomer Kriterleri ile belirtilmiştir. Sonrasında Yalçinkaya, çocuklardaki FMF için bu kriterlerden daha tutarlı tespitler sağlayan kriterleri yayınladı (Demirkaya et al., 2015). Bu kriterlere göre semptomların seyri “tipik ataklar” ve “tamamlanmamış ataklar” olarak ikiye ayrılarak gruplanmıştır. Tipik ataklar, tekrarlayan kısa süreli yüksek ateşler(38°C ve üstü, 12 saat ile 3 gün arasında değişebilen) şeklinde gözlemlenir. Tamamlanmamış ataklar ise bazı yönleri ile tipik ataklardan farklı olan, ağrılı tekrarlayan semptomlar olarak gruplandırılır. Atığın tipik atak olarak gruplandırılması için aşağıdaki beş durumdan bir veya ikisi açısından farklılık gösterir.

1. Düşük ateş (38°C’den daha düşük)
2. 12 saatten kısa veya bir haftadan uzun süre devam etmesi
3. Karın ağrısı sırasında hastanın peritonit tepkiler göstermemesi
4. Karında bölgesel ağrı
5. Eklemlerde ağrıları

Ataklar tipik veya tamamlanmamış atak kriterlerinden birine uymadığı sürece FMF tanısı konulmaz. Genetik testler sayesinde hastanın taşıdığı mutasyonun homozigot veya heterozigot mutasyon olduğu tespit edilir (Schnappauf, Chae, Kastner & Aksentijevich, 2019).

### 1.1.1. MEFV Geni

FMF hastalığının oluşumunda rol oynayan MEFV geni, 16p13.3 sitogenetik lokasyonda bulunan bir gendir ("OMIM Entry - \* 608107 - MEFV INNATE IMMUNITY REGULATOR, PYRIN; MEFV", 2022). Sağlıklı bir MEFV geni, pyrin adı verilen bir çeşit akyuvar hücresi olan granülosit ve monositlerde bulunan 3.7-kB ve 781 aminoasitlik bir protein kodlar. Pyrinin normal görevinin bağışıklık sistemini kontrol ederek inflamasyonu önlemek olduğu düşünülmektedir. Bu gende meydana gelen mutasyonlar, aktivitesi düşük pyrin proteinine sebep olur ve organizmanın enflamasyon regülasyonu sekteye uğrar (Shohat & Halpern, 2011; Sfikakis, 2017).

MEFV geni, FMF tanısında oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu amaçla en sık kullanılan moleküler metotlar hedef mutasyon analizleri ve seçilmiş ekzonların dizi analizleridir. Bu gende 300'den fazla mutasyon tespit edilmiştir. Gözlemlenen mutasyonların prevalansı etnik kökenlere göre değişmekle birlikte en sık görülen mutasyonlar Glu148Gln, Pro369Ser, Phe379Leu, Met680Ile (Gly/Cys), Met680Ile (Gly/Ala), Ile692del, Met694Val, Met694Ile, Lys695Arg, Val726Ala, Ala744Ser, ve Arg761His'dir (Shohat & Halpern, 2011). Sık görülen mutasyonlar, hedef mutasyon analizlerinde kullanılır. Daha kapsamlı incelemeler için ekzon 10 veya MEFV geni ekzon analizi yapılabilir (Sfikakis, 2017; Akca & Batu, 2021). Fakat tanı konulabilmesi için MEFV geninde meydana gelen mutasyonun 1-3 tekrarlanan yüksek ateş, eklem ve sırt ağrısı, karın ağrısı bulguları ile desteklenmesi gerekmektedir (Akca & Batu, 2021).

FMF hastalarında MEFV mutasyonu, hastalığın seyri açısından oldukça önemlidir.

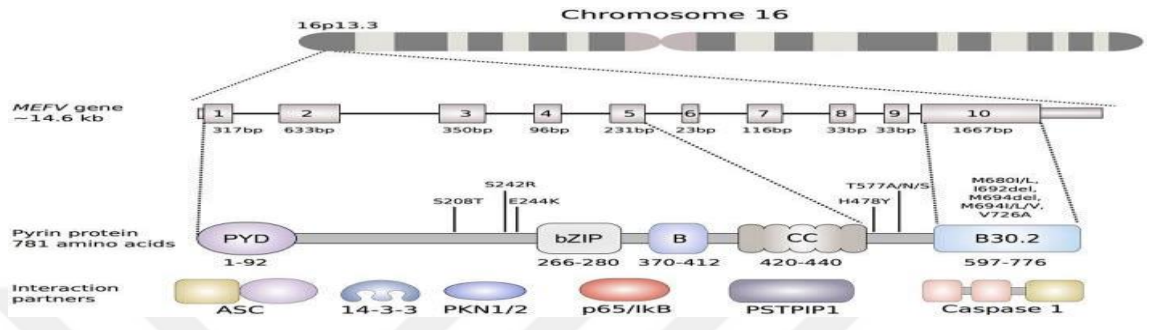
### 1.1.2. Pyrin Proteini

Diğer isimleri Marenostrin ve TRIM20 olan pyrin proteini, insanlarda 16. kromozomdaki MEFV geninde kodlanmıştır. Çoğunlukla monosit, nötrofil ve dentritrik hücrelerin yapısında bulunur ve IFN- $\gamma$ , LPS, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 gibi sitokinlerin varlığı ile sentezlenme miktarı arttırılır (Centola et al., 2000). Yapısal olarak dört üniteden oluşmuştur (Şekil 3):

1. Pyrin Bölgesi
2. Zinc finger(çinko parmak) Bölgesi(bBox)
3. Sarmal bobin(coiled coil)

#### 4. B30.2/SPRY domain

Aktif bir halka(ring) motifi içermese de Pyrin, TRIM protein ailesinin bir üyesi olarak kabul edilir. TRIM (tripartite motif-containing) protein ailesi özellikle viral saldırılardaki bağışıklık savunması açısından önemlidir ve normalde yapısında halka(ring), bBox, sarmal bobin ve bazen de B30.2 bölgesi bulunduran proteinleri içerirler (Centola et al., 2000).



Şekil 2: Pyrin yapısı (Aksentijevich & Kastner, 2011)

Pyrin aktive olduğunda diğer proteinlerle birleşerek pirin enflamazomu oluşturur. Pyrin inflamazom kaspaz-1'i aktive ederek IL-1 $\beta$  ve IL-18 oluşturur.

#### 1.1.3. Serum Amiloid A Proteini ve C-Reaktif Proteini

İnflamasyonda akut faz cevabı oluşmasında en etkin proteinlerden biri Serum Amiloid A(SAA) ve C-Reaktif proteinidir(CRP). Sağlıklı bireyler normal durumlarda kan plazmasında çok düşük miktarlarda (20-50 mcg/ml) bulundurlar. Fakat organizmada meydana gelen enfeksiyon, travma veya inflamasyon sonrasında takip eden 24 saat içerisinde plazmadaki proteinlerin miktarı 1000 kat artış gösterebilmektedir. CRP, spesifik olarak bir bakteri türününü C polisakaridine bağlanarak reaksiyona sebep olabilir ve plazmadaki seviyesi yükselebilir. Bu nedenle yaygın patojenlere karşı içsel konak savunmasında rol alır. Seviyesi aynı zamanda akut inflamasyonda arttığından, bazı hastalıklar için klinik olarak spesifik olmayan belirteç olarak da kullanılabilir (Sack, 2018).

#### 1.1.4. IL-1 Ailesi

Birçok biyolojik süreçte yer almasıyla geniş bir etki açısı sunan IL-1 sitokinin ailesinde 11 tane sitokin ve 10 reseptör yer almaktadır. Bu ailenin üyeleri, yabancı antijene karşı spesifik bağışıklık cevabı oluşturmada, enfeksiyona karşı spesifik olmayan immün yanıt sürecinde, lökosit pirojeni (lenfositleri içsel olarak tetikler ve ateş

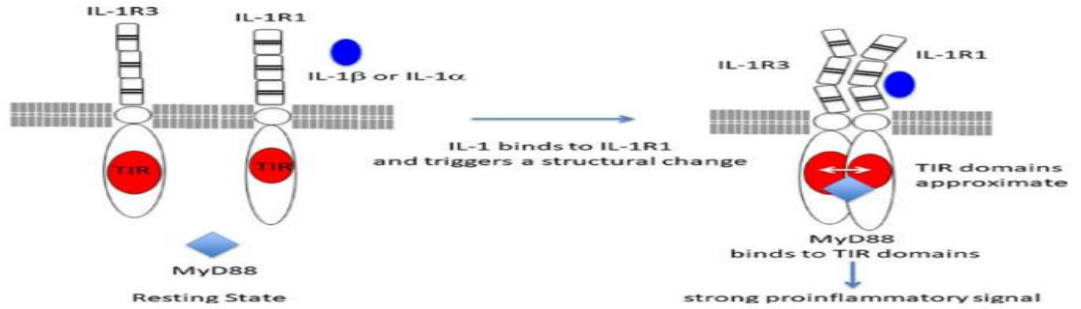
başlatıcı rol oynar) ve lenfosit aktive faktörü(LAF) olarak görev alır (Gery & Waksman, 1972; Kaneko, Kurata, Yamamoto, Morikawa & Masumoto, 2019)). IL-1 ailesi üyelerinin içinde bulunduğu tepkimeler “doğuştan bağışıklık sistemi” içerisinde yer alır. Doğuştan bağışıklık sistemi, özgül cevaplar oluşturmaz. IL-1 ailesinin doğuştan bağışıklıktaki öneminin keşfedilmesinde, IL-1R1(IL-1 reseptör tip 1) reseptöründeki Toll interleükin-1 reseptör(TIR) domaini ile Toll-like reseptörlerdeki (TLR), toll interleükin-1 reseptör domaininin birbiriyle çok yüksek benzerlik göstermektedir. Bu yüzden, temel enflamasyon başlangıç cevaplarında meydana gelen çoklu sitokin ve kemokin üretimi, nitrik oksit sentezleme, adezyon moleküllerindeki artışın sebebinin IL-1 üyeleri mi, yoksa TLR ligantları mı olduğu tespit edilememektedir(Kaneko, Kurata, Yamamoto, Morikawa & Masumoto, 2019). IL-1 ve TLR ailesi lenfositleri aktive ederek konak hücrenin enfeksiyondan korunmasını sağlar. saflaştırılmış IL-1’in kazanılmış bağışıklıktaki lenfosit aktive edici fonksiyonu ilk kez 1979’da gözlemlenmiştir (Rosenwasser, Dinarello & Rosenthal, 1979). IL-1 sitokin ailesinin en çok çalışılan sitokin ailesi olmasının sebebi otoinflamatuvar hastalık patolojisinde rol almasındandır.

Tablo 1: IL-1 ailesi ve reseptörleri

IL-1 Ailesi	Spesifik Reseptörü	Koreseptörü	Görevi
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$	IL-1R1	IL-1R3	Proinflamatuvar
IL-1 $\beta$	IL-1R2	IL-1R3	Antiinflamatuvar
IL-1Ra	IL-1R1		Antiinflamatuvar
IL-18	IL-1R5	IL-1R7	Proinflamatuvar
IL-33	IL-1R4	IL-1R3	Proinflamatuvar
IL-36 $\alpha,\beta,\gamma$	IL-1R6	IL-1R3	Proinflamatuvar
IL-36Ra	IL-1R6	IL-1R3	Antiinflamatuvar
IL-37	IL-1R5	IL-1R8	Antiinflamatuvar
IL-38	IL-1R6	IL-1R9	Antiinflamatuvar

IL-1 ailesi üyeleri, IL-1Ra hariç olmak üzere kendi içinde konsensus sekans (consensus sequence) ve birincil ligand bağlanma reseptörlerine göre 3 alt gruba ayrılır. Bunlar IL-1, IL-18 ve IL-33'dür. Çünkü IL-1Ra(Interleükin1 reseptör antagonisti) sinyal peptidi içermez ve precursor(öncül) olarak sitoplazmada bulunur. Konsensus sekans bölgesi üç amino asitli A-X-D olarak adlandırılır. Sırayla A bölgesindeki herhangi bir alifatik amino asiti X bölgesindeki rastgele amino asit karşılar ve D bölgesinde aspartik asit yer alır. AXD'den önceki 9 amino asit, sitokinin reseptöre bağlanması için gereken barrel formda katlanmasına imkan verir. IL-1 $\beta$ 'daki AXD'den önceki 9 amino asit, caspase-1 için kesme bölgesidir (Brough & Rothwell, 2007; Sims & Smith, 2010).

IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  sinyal iletiminde, IL-1R1 ve IL-1R3 reseptörleri dinlenme durumundayken hücre zarında yer alır. Dinlenme durumunda sitokinler reseptörlere bağlı değildir ve reseptörler ayrık formdadır. IL-1alfa, IL-1R1 reseptörüne bağlandığında, koreseptör olarak IL-1R3 de IL-1R1'e bağlanır fakat IL-1R3'ün ligandla direkt bağlantısı yoktur. Sonrasında kompleks haldeki iki reseptörün TIR bölgelerine hücre içindeki MyD88 molekülü bağlanır (Sims & Smith, 2010). MyD88 molekülünün bağlanması ile bir dizi kaspaz aktive olur ve proinflomasyon NFkB yolundan aktive olur (Şekil 3).



Şekil 3: IL-1'in reseptörüne bağlanma şekli (Sims & Smith, 2010)

Ayrıca IL-1beta öncülleri(precursor), sitoplazma içinde birikebilir. Bunları aktif forma döndürmek için leucine-rich repeat pyrin containing protein-3(NLRP3) ve caspase-1 görev alır. IL-1beta regülasyonu inflamazom oluşumuna bağlı olarak düzenlenir. Hücre içindeki çeşitli proteinleri NLRP-3'e bağlanarak cryopyrin inflamazomlarını oluşturur. Caspase-1 potasyum fazlalığında inaktif formda bulunur(procaspase-1). Inflamazom oluşumu sonrası P2X7 reseptörünün aktive

olarak ATP kullanarak potasyum kanallarını açması sonucu hücre içi potasyum derişimi azalır ve caspase-1 aktif forma geçer. Sonrasında caspase-1 aktif IL-1beta moleküllerini keserek inaktif forma dönüştürür. IL-1beta precursorlarının hücre dışına atılması ise özel lizozom paketleri ile atılması, mikrokanalların açılması, eksozom ile atılma veya pyroptosis gibi prosedürlerle olabilir. (Bergsbaken, Fink & Cookson, 2009; Qu, Franchi, Nunez & Dubyak, 2007; Suzuki et al., 2007).

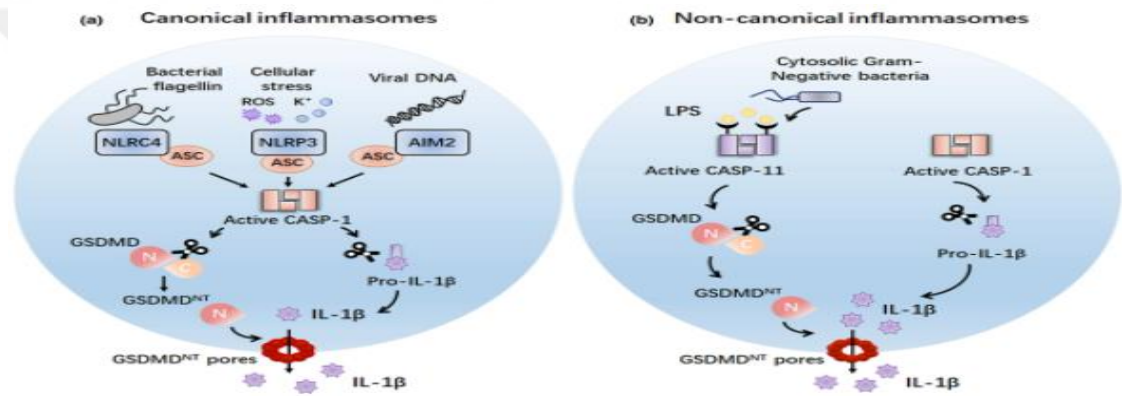
### 1.1.5. IL-1 Aktivasyonu

IL-1 ailesi içerisinde en çok çalışılmış iki üyesi olan IL-1 $\beta$  ve IL-1 $\alpha$ 'dır. Her ikisi de IL-1R1 reseptörüne bağlanıp aynı aşağı akış sinyalinin indüklemelerine rağmen aktive edilme şekilleri birbirlerinden farklıdır. İkisinde de reseptöre bağlanmak için proteolitik bir reaksiyon sonucu N-terminali residue açığa çıkar ve C-terminalinde meydana gelen konformasyonel değişimler sonucu reseptöre bağlanır. Bu süreçte IL-1 $\beta$  molekülü kaspaz-1(caspase-1) ile aktive edilirken, IL-1 $\alpha$  ise kalpin tarafından aktive edilir (Pyrrillou, Burzynski & Clarke, 2020).

IL-1 $\beta$  aktivasyonu, canonical ve non-canonical olmak üzere iki şekilde olabilir. Canonical aktivasyon, dışsal uyarı sonucunda IL-1 $\beta$  aktivasyonudur. Canonical aktivasyonda hücre reseptörlerinin pathogen-associated molecular patterns (PAMPs: bakteriyel lipopolisakkaritler veya viral RNA gibi uyarılar), danger-associated molecular pattern (DAMPs: ürik asit kristalleri, ATP gibi) veya dış çevresel faktörleri algıladıktan sonra hücre içinde cevap başlatmak için inflamazom adında multi-protein kompleksi oluşur. İnflamazom oluşturulduktan sonra IL-1 $\beta$  aktive olur. NOD, LRR ve pyrin-domain containing protein-3(NLRP-3) inflamazomları en çok çalışılmış inflamazomlardır. Canonical aktivasyonda NLRP-3 uyarı algıladıktan sonra ASC ve kaspaz-1 ile protein kompleksi oluşturarak kaspaz-1'i aktif hale getirir. Aktive olan kaspaz-1, pro-IL-1 $\beta$ 'yi keserek IL-1 $\beta$  oluşumunu ve Gastermin D(GSDMD)'yi keserek hücre zarında deliklerin oluşmasını sağlar (Şekil 4). Plazma zarında meydana gelen porlar hücreyi pyroptotic hücre ölümüne götürür. İçerisindeki sitokinler GSDMD porlar sayesinde hücre dışına gönderilebilir fakat buradaki mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Pyroptosis, proinflamasyon sinyalleri ve inflamasyon sonucu hücrenin ölümüne gitmesidir. Viral veya bakteriyel enfeksiyona uğramış makrofaj hücrelerinde sıkça rastlanabilir. Apoptosisten farkı ise apoptosistekinin aksine, pyroptosisde hücre çekirdeği olduğu

gibi kalır. Hücre zarının bütünlüğü porlar yüzünden bozulur ve içeriye su girişi sonucu hücre lizis olur.

Benzer şekilde non-canonical aktivasyonda süreç iki basamakta gerçekleşir. Fakat burada uyarı hücre içi bakteriyel enfeksiyon veya LPS sonucunda oluşturulur. Makrofajlarda LPS, TLR (Toll-like reseptör)'a bağlanır ve NFkB yoluyla inflamazom kompleksleri uyarılır ve ardından type I interferon(IFN) regülasyonu sonucu pro-kaspaz-4 ve -5 sentezlenir. İkinci basamakta ise uyarılan pro-kaspazlar LPS'e lipid A domaini ile bağlanarak aktive olurlar. Aktive olan kaspazlar GSBMD'yi keserek por oluşumuna ve hücrenin pyroptotik süreç girmesine sebep olurlar (Pyrillou, Burzynski & Clarke, 2020;(Tang, Lu, Zheng & Burgering, 2020).



Şekil 4: Canonical ve non-canonical IL-1 aktivasyonu(Tang, Lu, Zheng & Burgering, 2020)

### Canakinumab

Canakinumab (ACZ885, Ilaris), kolşisin dirençli hastalarda kullanılan FDA onaylı bir IL-1beta bloklayıcı ajandır (anti-IL-1beta monoclonal antibody). Otoinflamasyon hastalarında enflamasyonu baskılamak için kullanılır. Günümüzde romatoid artrit, bazı akciğer hastalıkları, tip1 ve tip2 diyabet ve göz hastalıklarında da kullanılmaya başlanmıştır (Dhimolea, 2010).

### Kolşisin

Kolşisin mikrotübül oluşumlarına etki ederek mitozu ve buna bağlı diğer hücre aktivitelerini bloklayabilen bir ajandır. Güz çiğdemi çiçeğinden (*Colchicum autumnale*) elde edildiği için bu adla bilinmektedir. Oral kullanımda %25-50

arasında biyolojik yararlanımı vardır ve vücuttan idrar veya safra yolu ile atılabilir. FMF başta olmak üzere, gut, Behçet hastalığı, siroz, artritte kullanılır. İnsanlardaki kullanımının yanı sıra, sitogenetikte mitozu durdurmak için de kullanılır. Kolşisinin etki mekanizması, beyaz kan hücrelerinde birikip onların mikrotübüllerine etki ederek hareketliliğini, adezyonunu ve kemotaksisini kontrol almaya yöneliktir. Bir diğer etkisi de inflamazom oluşumunu engellemeye ve antiinflamatuvar molekülleri arttırmaya yöneliktir. Böylelikle enflamasyon kontrol altına alınabilmektedir (Dalbeth, Lauterio & Wolfe, 2014).



## Gereç ve Yöntem

### 1. Araştırmanın Problemi

Kolşisinin hücre iskeleti elemanlarına etki ederek aktivasyon gösterdiği bilinmektedir. FMF hastalığının semptomları azaltmak amacıyla kullanımı önerilen tek ilaç günümüzde kolşisindir fakat kolşisinin FMF hastalarında nasıl bir mekanizma sonucu etkinlik gösterdiği tam olarak saptanamamıştır. Bu çalışmada, hücre iskeleti elemanlarına etki ettiği bilinen kolşisinin FMF hastalarından elde edilmiş hücre hattında hangi proteinlerin ekspresyonunu değiştirdiğini ve etki mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. FMF kompleks bir hastalık olduğundan ve hücre iskeleti proteinleri ile bağlantılı çok sayıda protein olduğundan seçilecek sınırlı sayıdaki proteinlerin iyi seçilmesi gerekiyordu. Biz de bu amaçla hem FMF’de önemli olan hem de hücre iskeletiyle bağlantılı olan proteinleri seçerek, amacımıza uygun bir şekilde ilerledik. Kolşisinin bu proteinlere nasıl etki ettiği net bir şekilde literatürde bulunmamaktadır. Biz de bu boşluğu doldurmak amacıyla *in vitro* ortamda inceleme yaparak bu bilgiyi literature kazandırmayı amaçladık. Bunun yanısıra, normalde FMF hastalarında kullanılmayan bir ilaç olan Canakinumab isimli ilacı da *in vitro* koşullarda test ederek anlamlı sonuçlar bulmayı amaçladık. Eğer uygun sonuçlar çıkarsa, kolşisine alternative bir ilaç olarak klinik araştırmalara eklenebilirdi.

### 2. Araştırmanın Sorusu

Bu çalışmada Ege üniversitesi Çocuk Hastanesi’ne gelen 5-17 yaş arası farklı mutasyonlardaki 14 FMF hastasından periferik kan alınarak kolşisin ilacının etkisi polarite genleri açısından incelenmiştir. Bunun yanı sıra alternative bir tedavi olabileceği düşünülen canakinumab da aynı şekilde incelenmiştir. Beklentimiz, kolşisinin gen ekspresyon düzeyini düşürmesi yönündeydi.

### 3. Araştırmanın Hipotezleri

Bu araştırmadaki hipotezlerimiz, FMF hastalarındaki mutant Pyrin proteininin kolşisin etkisi ile düşeceği, kolşisinin inflamasyon azaltma özelliğinin CASP-1 geni ekspresyon düzeyindeki değişikliğe sebep olarak gerçekleşeceği olarak düşünülmüştür. Aynı şekilde bir IL-1β bloker ilaç olan Canakinumab ilacının da aynı mekanizma üzerinden etki edebileceği öngörülmüştür.

#### 4. Araştırmanın Varsayımları

Kolşisinin kullandığımız oranının toksik etki göstermeyeceği, hücrelerin 24 saatlik süreç içerisinde beyaz kan hücresi profilinden farklı olmayacağı, FMF hastalarının hücrelerinde zaten inflamasyon olduğunu ve IL-1 $\beta$ 'yı hücre kültürüne direkt eklemenin hücrede inflamasyon artışına sebep olacağı varsayılmıştır.

#### 5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu araştırmadaki en büyük sınırlılık kişi sayısıdır. Araştırma dönemi COVID pandemisi dönemine denk geldiğinden tahmin edilenden çok daha az sayıda hasta çağırılabilmiştir. Bir diğer sınırlılık da elimizde olan malzemelerin durumudur. Eğer elimizde farklı genlerin primerleri olsaydı, daha geniş çaplı bir araştırma olabilirdi.

#### 6. Araştırmanın Amacı

Tezde ülkemizde yaygın olan FMF hastalığının patogeneze açıklık getirmek için farklı fenotiple seyreden farklı MEFV geni mutasyonuna sahip hastaların periferik kan hücrelerinden elde edilen nötrofil-monosit hücre hattında bazal ve planer hücre polaritesini kontrol eden genlerin ekspresyon düzeylerini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca, bu hastaların tedavisinde tek seçenek olarak kullanılan kolşisin ilacının hücre polaritesine etkisi ile kolşisin dirençli hastalarda alternatif olarak kullanılan canakinumab ilacının hücre polaritesine etkisi *in vitro* olarak araştırılacaktır.

Tablo 2: Çalışmada yer alan hastaların mutasyonları

HASTANIN NUMARASI	HASTANIN MUTASYONU
1	M694V Homozigot
2	M680I Homozigot
3	M680I Homozigot
4	M680I Homozigot
5	K695R Homozigot
6	M680I/M94V Heterozigot

7	R20ZQ Homozigot
8	V726A Homozigot
9	R2020q/744s Heterozigot
10	E148q 2.Exon Homozigot
11	M694V Homozigot
12	M680I Homozigot
13	M680I Homozigot
14	M680I Homozigot

## Yöntem

### 1. Periferik Kandan Lökosit izolasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan 15 ml'lik kandan vakit kaybetmeden lökosit izolasyonuna geçilir. Kandan lökosit izolasyonunda gradient farkı yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan solüsyonların amacı; izotonik solüsyon gradient farkı oluşturup lökositleri toplamak için, PBS ise lökositleri hücre artıklarından (cell debris) arındırmak ve elde edilen lökositleri saflaştırmak için kullanılır.

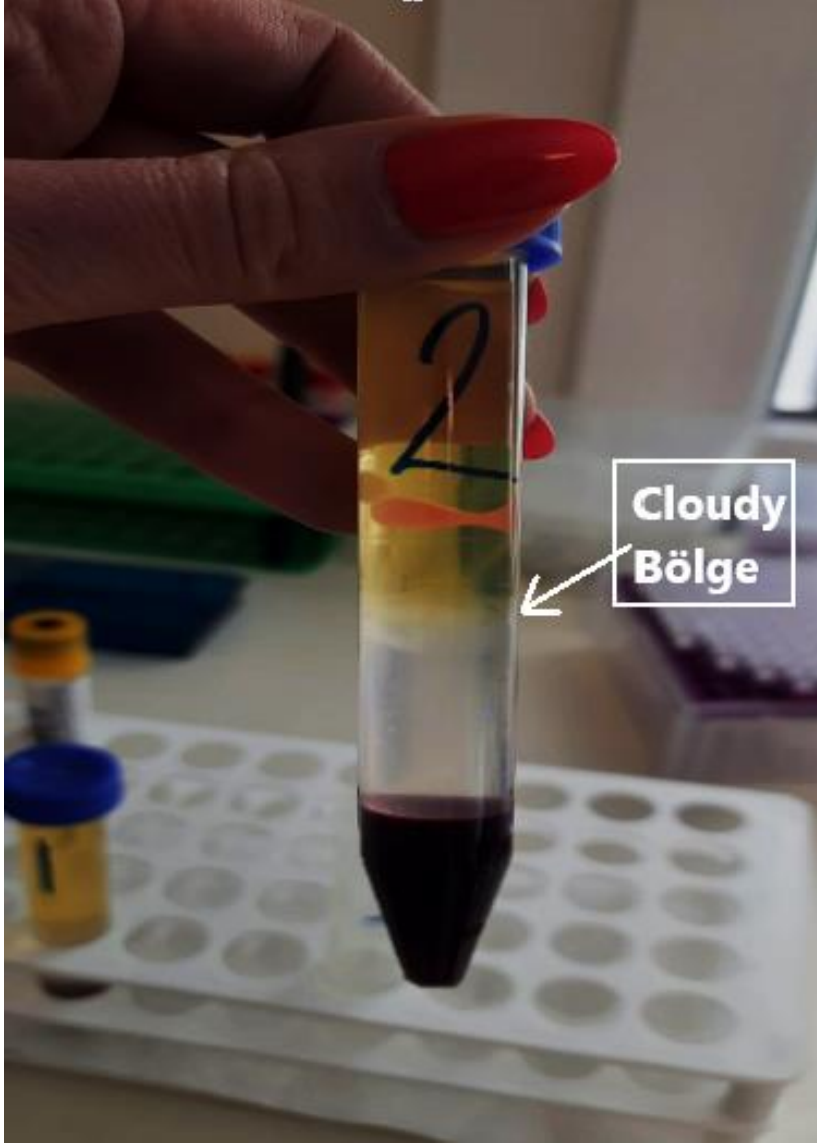
### Hazırlık Aşaması

- hastalardan periferik kan alınması
- PBS ve lökosit izotonik çözelti dolaptan çıkarılır.
- santrifüj ayarları yapılır.
- falkon tüpleri hazırlanır(her hasta için 3 falkon)
- pastör pipetleri hazırlanır

### Prosedür

- İzotonik çözelti, 5'er ml olarak falkon tüplere transfer edilir.
- Falkonların üzerine pastör pipeti ile 5'er ml kan damla damla eklenir(kan:izotonik oranı 1:1)
- 20 dk 2500 rpm'de döndürülür.

- Santrifüj durduktan sonra sarsmadan cihazın içinden alınır.
- Örneklerdeki gradient farkı gözlemlenir.
- Pastör pipeti yardımı ile ara fazda bulunan bulutsu tabaka çekilir (Şekil 5).
- Bulutsu tabaka başka bir falkona alınır. üzerine 6-7 ml PBS çözeltisi eklenir(yıkama 1)
- İki kez ters-düz ettikten sonra tekrar cihaza konulur.
- 5 dk 2000 rpm'de çevrilir.
- Süpernatant dökülür.
- Pellet üzerine 4-5 ml PBS eklenir ve ters düz edilir.(yıkama 2)
- 5 dk 2000 rpm'de çevirilir.
- Süpernatant dökülür.
- Eğer sonrası için saklanacaksa, üzerine 2 ml PBS eklenir.
- Lökosit hücreleri hazırlanmış olur.



Şekil 5: Kandaki gradient farkının görüntüsü. Kırmızı ile işaretlenmiş olan bölüm, ayırmak istenilen bölümdür.

## 2. Hücre Kültürü ve IL1- $\beta$ -Kolşisin ve Canakinumab Uygulaması

Periferik kandan elde edilen lökosit hücreleri eşit hacimde RPMI ile karıştırılarak petri kaplarına ekim yapılır. Her hasta için 6'şar adet petri kabı kullanılır.

Bu 6 kültür:

- Sadece lökosit hücrelerinin olduğu grup(kontrol- A grubu)
- IL1- $\beta$  uygulanmış grup (test grubu 1- B grubu)
- IL1- $\beta$ +Kolşisin uygulanmış grup (test grubu 2- C grubu)
- Sadece lökosit hücrelerinin olduğu grup(kontrol- A\* grubu)
- IL1- $\beta$  uygulanmış grup (test grubu 1- B\* grubu)

- IL1-β+Canakinumab uygulanmış grup (test grubu 2- C\* grubu)

### **Prosedür**

- Her hasta için 6 petri kabına 1:1 oranında hücre: RPMI pipetaj yapılarak ekilir.
- Bu hücreler 5 saat boyunca 35°C’de inkübe edilir.
- 5 saatin sonunda test grubu 1’e bir damla IL1-β, test grubu 2’ye 10 ul IL1-β ve 10 ul kolşisin eklenir. (2-C\* grubuna kolşisin yerine Canakinumab eklenir) (Kolşisin ve Canakinumab derişimi 10ng/ml olarak literatür bilgisi kullanılarak hesaplanmıştır((Taskiran, Cetinkaya, Balci- Peynircioglu, Akkaya & Yilmaz, 2012)
- 24 saat daha inkübe edilir.
- Bu aşama sonrasında mikroskopta hücreler gözlemlenir.

### **3. RNA izolasyonu**

Hücre kültüründeki lökositlerden RNA elde etmek için Qiagen RNA izolasyon kiti kullanıldı.

- Hücre kültüründeki hücreler tüplere alındı.
- Supersonicator yardımı ile hücreler parçalandı.
- Parçalanmış hücrelerin üzerine 700 ul %70 EtOH konuldu ve hücre lysate ve ethanol karışımı 500’er ul olarak spin kolonlara transfer edildi.
- En yüksek devirde, 2 dk santrifüj edildi.
- Toplama tübünde kalan sıvı dökülür ve tüm karışım kolondan geçene dek bu sürece devam edilir.
- Tüm karışım kolondan geçtikten sonra kolonu yıkama işlemine geçilir. Kit içerisinde çıkan RW1 Buffer’dan 700 ul spin kolona aktararak yine en yüksek devirde 2 dk’yı aşmayacak şekilde santrifüj edilir.
- Kolonun altında kalan karışım dökülür. Kolona 500 ul RPE Buffer konulur. En yüksek devirde 2 dk çevrilir.
- Kolonun altında toplanan sıvı döküldükten sonra tekrar 500 ul RPE Buffer kolona eklenir ve en yüksek devirde 2 dk santrifüj edilir.
- Bu aşamadan sonra kolonun kuruması, kolona hiçbir şey eklemekten en yüksek devirde 1 dk santrifüjlenir.

- Bu aşamalardan sonra kolon yeni bir toplama tüpüne alınır. Kolona 30 ul DNase-free water kolonu patlatmadan pipet yardımı ile tam kolonun ortasına bırakılır.
- En yüksek devirde 1 dk santrifüjlenmiş kolondan RNA izolasyonu gerçekleşmiş olur.

#### 4. RNA miktarı kontrolü

Önceki aşamadan elde edilen RNA miktarı Nanodrop spektrofotometre’de 260/280 dalga boyunda kontrol edilir.

#### 5. cDNA sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, izole edilen RNA’dan cDNA sentezinde kullanılmıştır.

Reaksiyon:

MALZEME	1 TANE İÇİN GEREKEN HACİM
5X Reliance Select cDNA Synthesis Reaction Buffer	4 ul
10X oligo(dT) primer mix	2 ul
RNA template	2 ul
Reliance Reverse Transcriptase	1 ul
Nuclease-free water	11 ul
<b>Total Reaction mix volume</b>	<b>20 ul</b>

Thermal cycler:

SICAKLIK(°C)	SÜRE(dk)
25	10

37	120
85	5
4	$\infty$

## 6. cDNA Kontrolü

NanoDrop Spektrofotometre ile ölçülmüştür.

## 7. qPCR

Real-Time PCR, FMF hasta grubundaki hedef genlerin IL-1 $\beta$ , Kolşisin ve Canakinumab varlığındaki ifade değişikliğini gözlemlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Real time PCR reaksiyonu AB PRISM 7000 cihazında gerçekleştirilmiştir.

Kontrol gen olarak ACTB kullanılmıştır.

Reaksiyon:

MALZEMELER	1 ÖRNEKLİK HACİM
Taqman 2X PCR Master mix	12,5 ul
Forward Primer	2 ul
Reverse Primer	2 ul
Prob setleri	0,5 ul
cDNA	7 ul
RNAse-DNAse free water	1 ul
<b>Total reaction mix volume</b>	<b>25 ul</b>

## 8. Data Analiz

qPCR'dan elde edilen datalar Comparative CT( $\Delta\Delta Ct$ ) yöntemi ile hesaplanmıştır.

Göreceli inceleme (Relative quantification) işlemi,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü ile yapılmıştır.



Şekil 6: Deneyin akış şeması

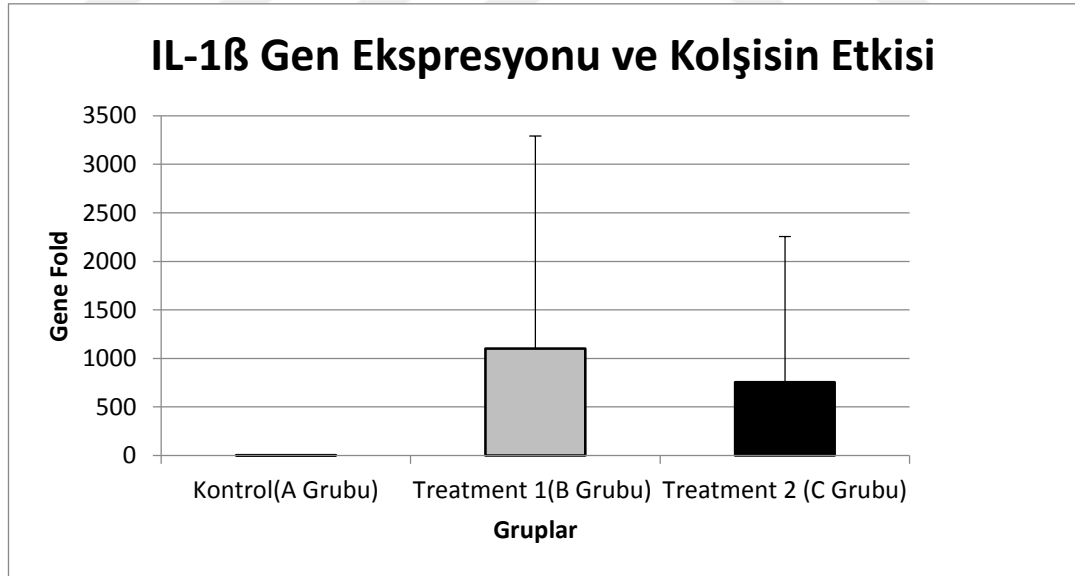


## Bulgular

Bu tez çalışmasında, FMF hastalarından alınan periferik kandan hücre kültürü elde edilerek, önemli bir inflamasyon sitokinlerinden olan IL-1 $\beta$  eklenmiş kültürde, kolşisin ve Canakinumab ilaçlarını da ekleyip gözlemlenerek anlamlı sonuçlar bulunması amaçlanmıştır. Kolşisin, FMF hastalarının tedavisinde çok sıkça kullanılan, günümüzde bile tek olma yolunda bir ilaçtır. Fakat bazı FMF hastaları kolşisine karşı direnç gösterebilir ve kolşisin kendinden beklediği gibi atakları yeterince engelleyemiyor. Bu gibi hastalar için alternatif ilaç önerileri bulunması gerekmektedir.

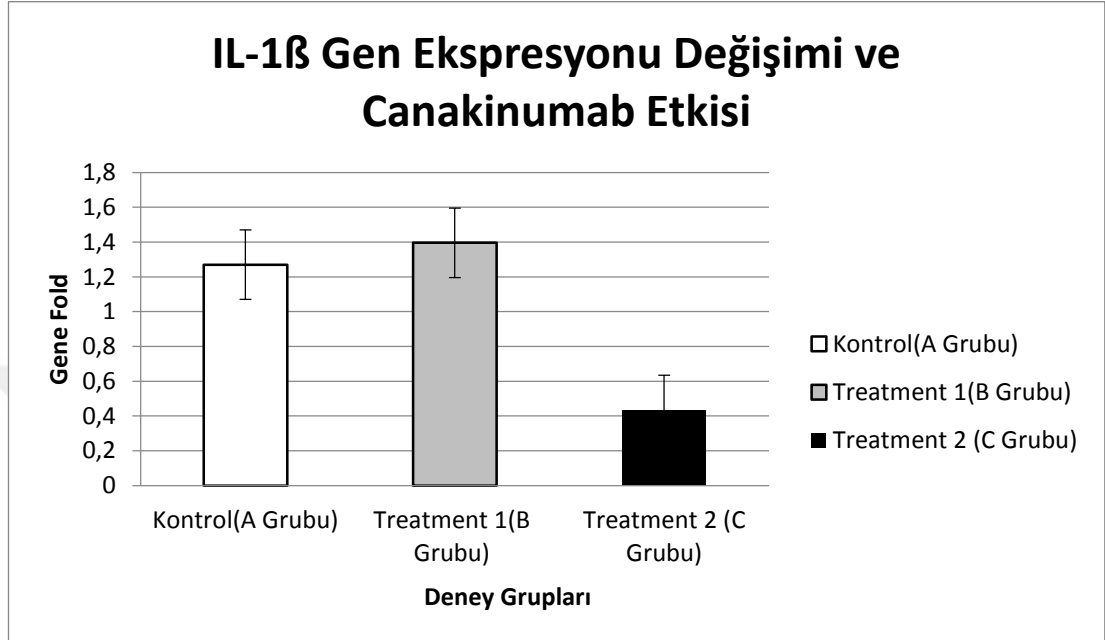
Deneylerde, Kontrol grubunda (A grubu) hastadan elde edilen hücreler RPMI kullanılarak ekim yapılmış hücreler, Treatment 1 (B grubu) ise üzerlerine IL-1 $\beta$  eklenmiş hücreler, Treatment 2 (C grubu) ise hem IL-1 $\beta$  hem de ilaçkolşisin veya canakinumab ilaçlarından birisi) eklenmiş hücrelerin bulunduğu grupları göstermektedir.

Şekil 7’de kontrol grubu ile kıyaslandığında IL-1 $\beta$  eklenmiş B grubundaki IL-1 $\beta$  gen ekspresyonunun arttığı, kolşisin eklenmiş C grubunda ise B grubuna göre hafif bir azalma meydana geldiği görülmektedir.



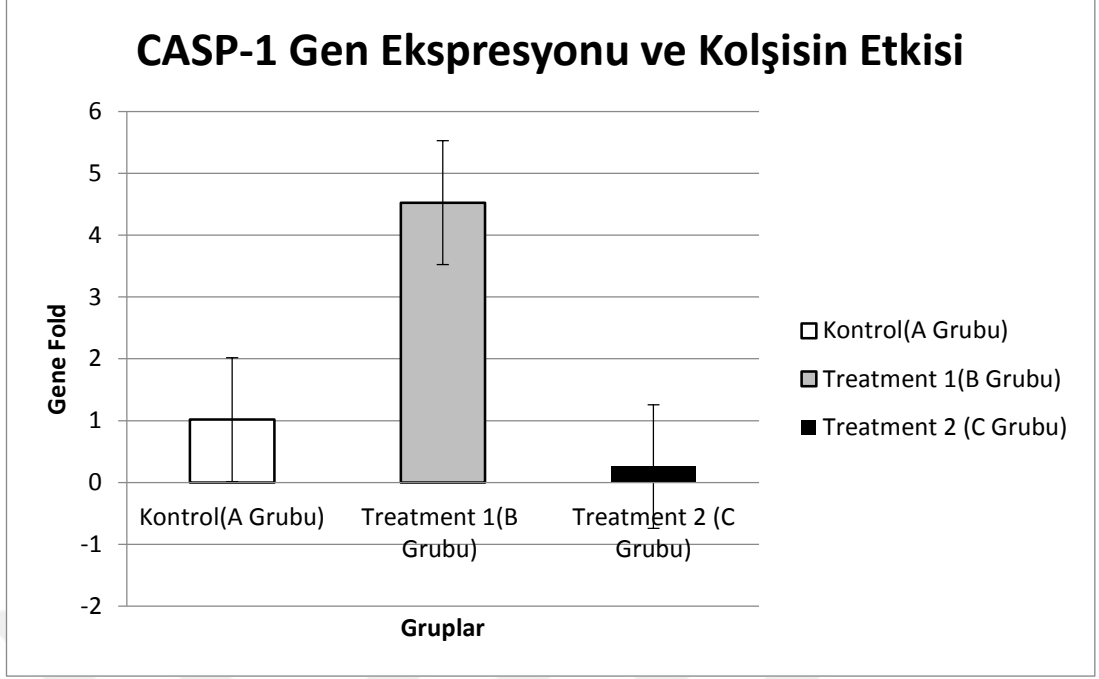
Şekil 7: FMF hastalarında IL-1 $\beta$  gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de kolşisin eklenmiş hücre hattıdır.

Şekil 8’de ise A ve B grupları yine aynı şekilde muamele edilirken, C grubuna kolşisin yerine canakinumab eklenmiştir. Görüldüğü üzere kontrol ve B grubu ile kıyaslandığında canakinumab bir IL-1 $\beta$  antagonisti olarak IL-1 $\beta$  miktarında belirgin şekilde azaldığı görülmektedir.

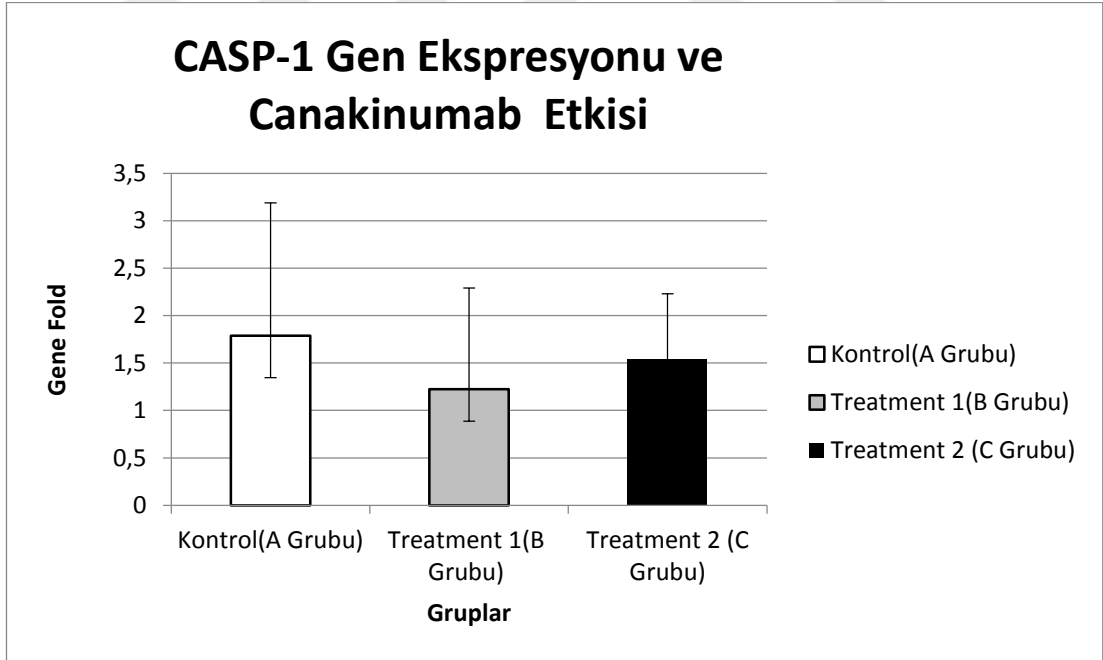


Şekil 8: FMF hastalarında IL-1 $\beta$  gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de Canakinumab eklenmiş hücre hattıdır.

Şekil 9 ve Şekil 10, CASP-1 geni ekspresyon katları görülmektedir. Figür 3’de görülen kolşisin eklenmiş C grubu, sadece IL-1 $\beta$  eklenmiş B grubuna göre bir azalma meydana geldiği gözlemlenmektedir. Aynı gen için Canakinumab eklenmiş grupta ise anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 10).

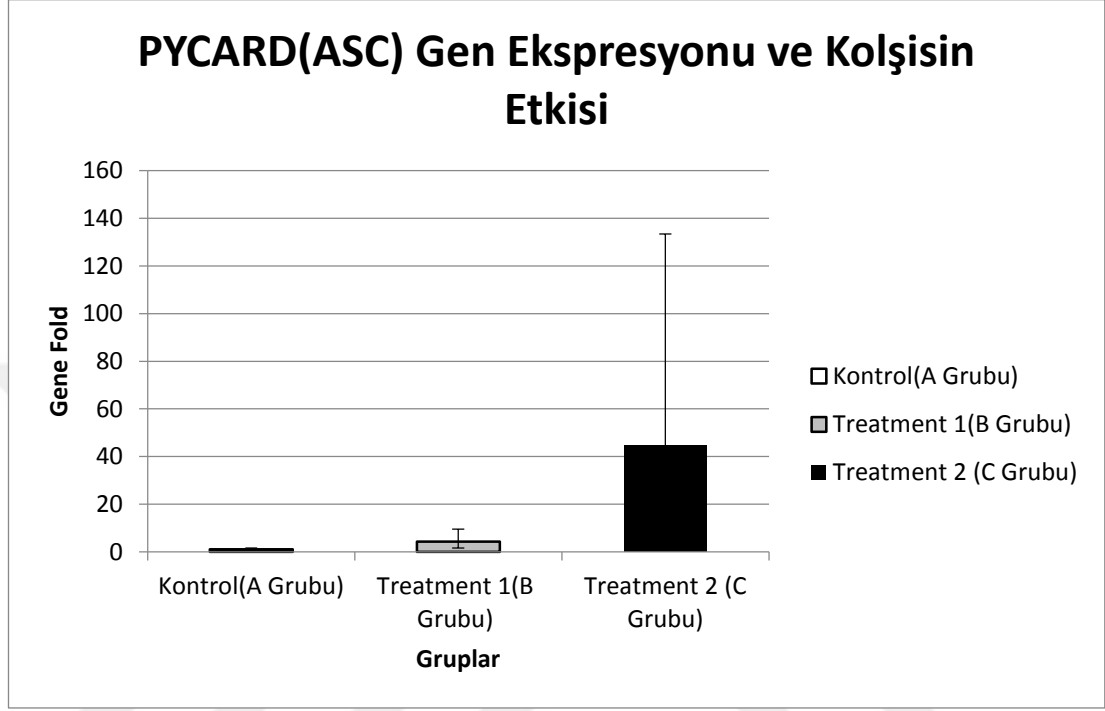


Şekil 9: FMF hastalarında CASP-1 gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de kolşisin eklenmiş hücre hattıdır.

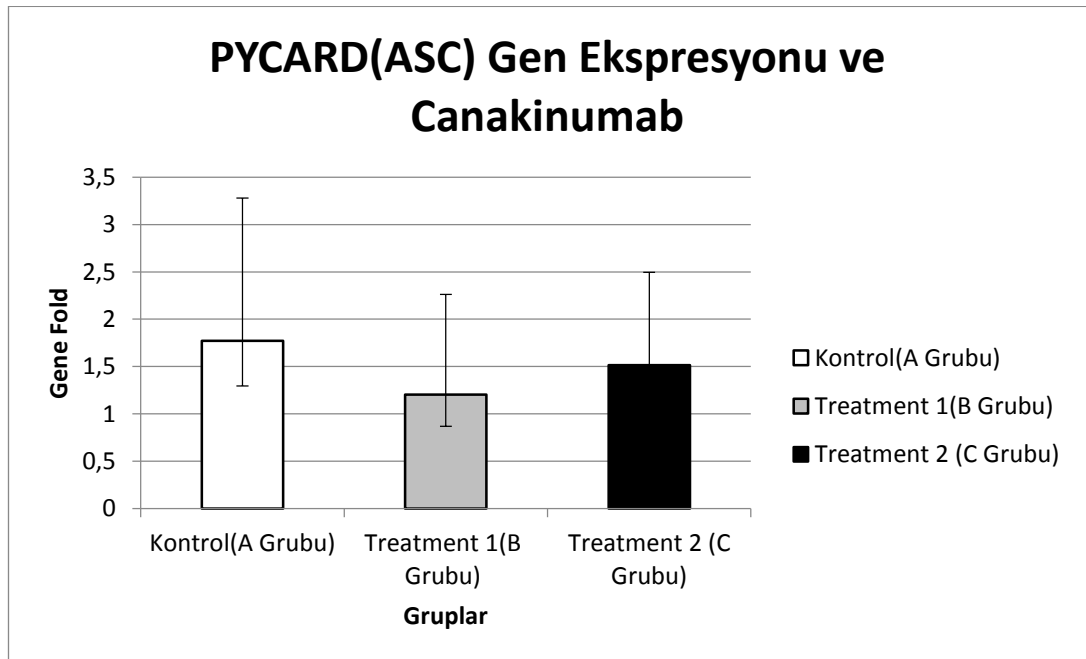


Şekil 10: FMF hastalarında CASP-1 gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de Canakinumab eklenmiş hücre hattıdır.

Şekil 11 ve 12'ye geldiğimizde, kolşisin eklenmiş C grubundaki PYCARD(ASC) geni ekspresyonundaki artış B ve A grubu ile kıyaslandığında görülmektedir. Canakinumab eklenmiş C grubunun görüldüğü Şekil 12'de ise anlamlı bir durum gözlemlenememiştir.

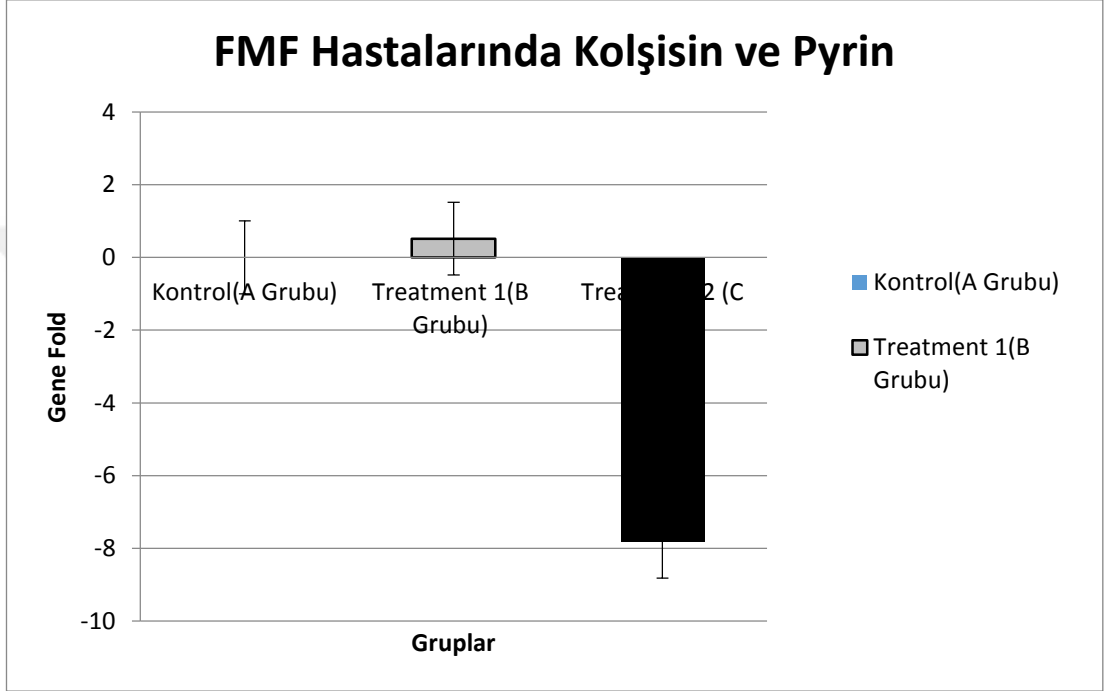


Şekil 11: FMF hastalarında ASC gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de kolşisin eklenmiş hücre hattıdır.



Şekil 12: FMF hastalarında ASC gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de Canakinumab eklenmiş hücre hattıdır.

Şekil 13’de görülen grafikte ise Pypin gen ekspresyonunun kolşisin muamelesi ile değişimi gözlemlenmektedir. Görüldüğü üzere, kolşisin eklenmiş FMF hastalarından elde edilen hücrelerde, Pypin ekspresyonu dramatik şekilde düşmüştür.



Şekil 13: hastalarında Pypin gen ekspresyonu. A grubu kontrol grubudur. B grubu IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerdir. C grubu ise hem IL-1 $\beta$  hem de kolşisin eklenmiş hücre hattıdır.

## Tartışma

Bu tez çalışması kapsamında, FMF hastalarından alınan periferik kandan elde edilen beyaz küre hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılarak polarite ile ilgili genlerin ifadelerinin gözlemlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca FMF hastalığındaki etki mekanizması henüz aydınlatılmamış bir ilaç olan kolşisinin polarite genleri üzerindeki etkisini gözlemleyip, buradan gözlemlenen sonuçlarla kolşisinin hangi molekül ve proteinler üzerinden tedavi edici özellik sağladığı konusuna ışık tutacak sonuçlara elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın diğer kısmında ise, günümüzde FMF'den başka inflamasyon hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaya başlanan IL-1 $\beta$  sinyalini engelleme mekanizması üzerinden etki eden Canakinumab isimli ilacın *in vitro* ortamda hasta hücrelerine olan etkisi gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

Kolşisinin mikrotübüllerin polimerizasyonunu engelleyerek etki ettiği bilinmektedir (Stanton, Gernert, Nettles & Aneja, 2011). Bu tez çalışmasında biz bu etkiyi egale etmek amacı ile kolşisinin mikrotübül yapısındaki polimerizasyonu engellemeyecek dozda kullanmak için literatür bilgisine başvurduk (Taskiran, Cetinkaya, Balci-Peynircioglu, Akkaya & Yilmaz, 2012). Böylece, kolşisinin henüz gün yüzüne çıkamamış etki mekanizması hakkında çıkarımda yapabileceğimiz hipotezi üzerinden ilerledik.

Dizayn ettiğimiz deney düzeneği, periferik kandan beyaz kan hücre kültürü ve sonrasında IL-1 $\beta$ , Kolşisin ve Canakinumab muamelelerini içermektedir. Hücrelerde meydana gelen gen ekspresyonlarındaki değişimler qPCR çalışması ile incelenmiştir. IL-1 $\beta$  inflamasyon başlatıcı olarak bilinmektedir. Pysin inflamazomu oluşurken, pyrin proteini ASC ile birbirine bağlanır ve kaspaz-1'i aktive ederek pro-IL-1 $\beta$  formundan inflamasyon başlatıcı matur IL-1 $\beta$  formuna geçer (McDermott, 2004). Bu çalışmada kullanılan hücreler bir tür otoinflamatuvar hastalık olan FMF hastaları olduğundan, hücrelerinde zaten inflamasyon bulundurmaktadır fakat biz IL-1 $\beta$ 'yı dışarıdan ekleyerek inflamasyonda artışı ve ilaç etkisini daha net bir şekilde gözlemlemeyi hedefledik. Şekil 7 ve Şekil 8 görselleri IL-1 $\beta$  genlerinin ekspresyonunu göstermektedir. Çalışmada kolşisin eklenmiş grupta, sadece IL-1 $\beta$  eklenmiş grupla karşılaştırıldığında beklenen dramatik düşüş gözlemlenmemiştir fakat kolşisin etkisi ile meydana gelen bir düşüş vardır. Kolşisin eklenmiş grubu(C grubu) hiçbir şey eklenmeden inkübe edilmiş Kontrol Grubu(A grubu) ile karşılaştırdığımızda C grubunda kontrole göre bir artış gözlemlemekteyiz(Şekil 7).

Bunun sebebi kolşisini kullanılan dozun (100 ng/ml) IL-1 $\beta$  eklendiğinde artan inflamasyonu yeterince engelleyememesi gelmesi olabileceği gibi, 24 saatlik inkübasyon süresinin yetersiz gelmesi de olabilir. Canakinumab muamelesi bulunmuş hücrelerin grafiğine geldiğimizde, canakinumabın hem kontrol hem de sadece IL-1 $\beta$  eklenerek inflamasyonu arttırılmış gruba göre IL-1 $\beta$  miktarını azalttığı gözlemlenmiştir. Kolşisinde direkt bir azalma gözlemleyemezken, canakinumabda IL-1 $\beta$  ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlemlememizin sebebi, canakinumab ilacının IL-1 $\beta$  sinyalini direkt bloklama etkisi varken, kolşisinin bu işlevi hücre polaritesi ile ilgili olan mikrotübülleri de ilgilendiren yollar üzerinden sağlamasıdır(Centola et al., 2000). Bu yüzden ki, *in vitro* ortama direkt eklenmiş kolşisin, canakinumab kadar etki gösterememiş olabilir.

Kolşisinin ASC oligomerizasyonunu engelleyerek inflamasyon önleyici etki edebileceği bilgisi literatürde vardır (Waite et al., 2009). Pirin inflamazom oluşumunda pyrinin PYD domainine ASC ve B30.2(SRY) domainine ise pro-kaspaz-1 proteini bağlanarak pyrin inflamazomu meydana getirir. Bu inflamazomda kaspaz-1 aktive olur ve pro-IL-1 $\beta$ 'yi keserek inflamasyonu başlatacak olan sitokini açığa çıkarmış olur (Chae et al., 2006). Bir başka çalışmada ise pyrin inflamazom oluşumunda ASC oligomerizasyonunun arttırıcı bir etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Yu et al., 2005). Bu çalışmada FMF'li hastalardan elde edilen hücre kültürüne IL-1 $\beta$ +Kolşisin eklendiğinde, Kontrol(sadece hücre kültürü) ve B grubu(sadece IL-1 $\beta$ ) eklenmiş grupla karşılaştırdığımızda CASP-1 ve Pyrin gen ekspresyonunun düştüğü fakat ASC(PYCARD) geni ekspresyonunun yükseldiği gözlemlenmektedir. Bunun sebebi CASP-1'in aktin etkileşimli bir protein olması ve mikrotübül polimerizasyonunu engelleyecek fakat toksik olmayacak miktardaki kolşisin aktin düzenlenmesini değiştirmesi ve yeniden düzenlenmeye sebep olması olabilir (Caution et al., 2015). CASP-1 geni ekspresyonundaki düşüşü CASP-1'in aktif forma geçmek için pyrin varlığına ihtiyaç duyması, fakat pyrin ekspresyonu kolşisin muamelesi altındaki FMF hastalarından elde edilmiş hücre kültüründe aşırı bir düşüş gözlemlenmesi olabilir. Aynı genler Canakinumab varlığında gözlemlendiğinde ise anlamlı sonuçlar elde edilememiştir (Şekil 10 ve Şekil 12).

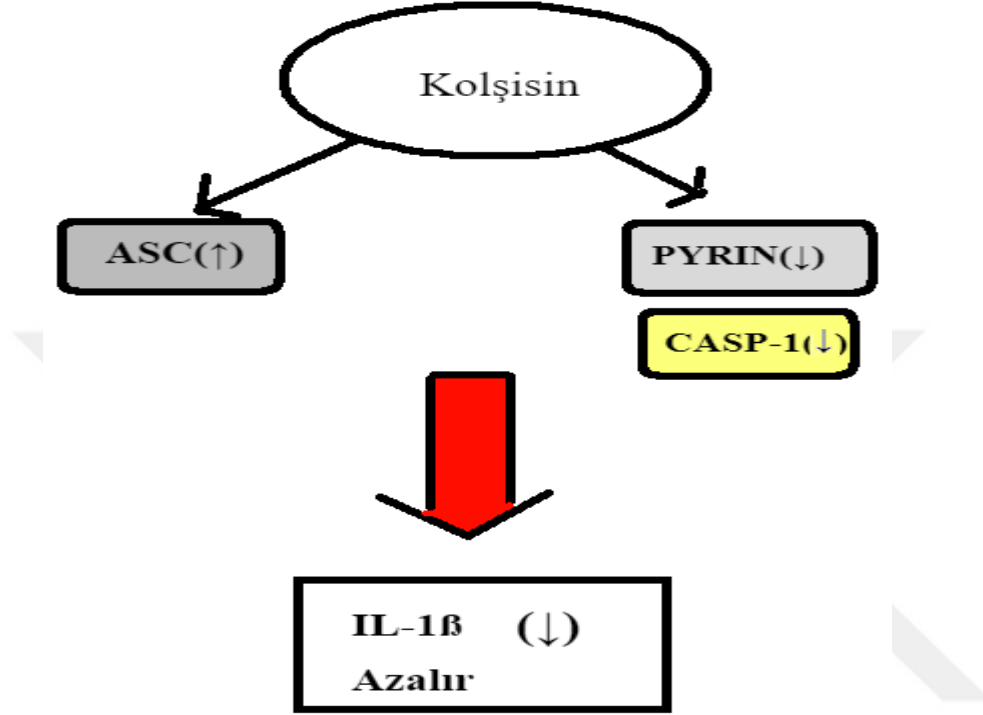
Tüm sonuçlar göz önüne alındığında kolşisinin varlığında ASC ve CASP-1 genlerinin arasında ters orantı olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi derişimleri

arasındaki rekabet olabilir. Ayrıntılı bir sonuç için deneyler geliştirilip farklı genler incelemeye dahil edilerek incelenmelidir.

Kolşisin'in etki mekanizması incelenirken birçok farklı yolda rol oynadığı ortaya konmuştur. Bunlardan bazıları nötrofillerin hareketliliği ve yapışmaları, inflamazom aktivasyonu, süperoksit üretimi, TNF-alpha faktörü ile indüklenen NF-kB inflamasyon yolağıdır(Angelidis et al., 2018). Bir başka çalışmada IL-1 $\beta$  eklenmiş hücrelerde fenotipik değişim meydana gelirken, canakinumab eklenmiş hücrelerde fenotipik değişimlerin daha az olduğu raporlanmıştır(Masola et al., 2019). Bu tez çalışmasında Canakinumab'ın IL-1 $\beta$  ekspresyonunu azaltma yönündeki etkisi Figür 2'de görünmektedir. IL-1 $\beta$  muamelesi görmüş hücre kültürü ile karşılaştırıldığında IL-1 $\beta$ +Canakinumab grubunda belirgin bir ekspresyon azalması görülmektedir. Fakat Canakinumab muamelesinin CASP-1 ve ASC gibi hücre iskeleti ile etkileşimde olan proteinin genlerinde belirgin bir artış göstermese de, bu genlerin ekspresyonu sadece IL-1 $\beta$  eklenmiş B gruplarına göre nispeten yükselmiştir (Şekil 10 ve 12). Bir IL-1 $\beta$  antibodysisi olan canakinumabın etki mekanizmasında etkileşimde olduğu proteinler olma ihtimalini ortaya koyuyor.

Bir başka çalışmada, Pysin proteininin varlığında CASP-1'in upregüle olduğu ortaya konulmuştur (Seshadri et al., 2007). Bu tez çalışmasında da Kolşisin eklenmiş gruplar ele alındığında, IL-1 $\beta$  eklenmiş B grupları ile A grubu (kontrol grubu) karşılaştırıldığında CASP-1 ekspresyonu belirgin bir artış gösterirken, Pysin daha az miktarda bir artış göstermiştir. Bunun sebebi ortamda derişimi artan IL-1 $\beta$  sitokininin Pysin ekspresyonunu regülasyonunu düşürmeye sebep olmasından kaynaklanıyor olabilir (Figür 3 ve Figür 7). Kolşisin eklenmiş gruba gelindiğinde ise Pysin ve CASP-1 ekspresyonlarında çok belirgin bir düşüş meydana gelmiş (Figür 13 ve Figür 9). Kolşisin eklenmiş gruba baktığımızda ASC gen ekspresyonunda da ciddi bir artış meydana gelmiştir (Figür 11). Buradan hareket ile Pysin ve CASP-1 genlerinin regülasyonlarının birbiri ile pozitif ilişkili, ASC ile ise negatif regülasyon ilişkisi olduğu söylenebilir (Şekil 8). Aynı mantık ile Canakinumab eklenmiş C grubuna bakıldığında (Şekil 10 ve Şekil 12), CASP-1 ve ASC gen ekspresyonu B grubuna(sadece IL-1 $\beta$  eklenip inkübe edilmiş) göre artış göstermiştir fakat pyrin geninde kayda değer bir değişim gözlemlenmemiştir. Fakat Canakinumab varlığında IL-1 $\beta$  gen ekspresyonuna bakıldığında (Şekil 8) belirgin bir düşüş görülmüştür. Buradan, Canakinumab'ın IL-1 $\beta$  inflamasyon başlatıcı proteinin azaltılması

sırasındaki etki mekanizmasında daha önceden bilindiği üzere direkt olarak IL-1 $\beta$ 'ya etki ettiğini, Pyrin ile ilişkili olmadığı, CASP-1 veya ASC gibi aktin ilişkili proteinlerle ilişkisi olabileceği ortaya konulmuştur. Canakinumabın başka proteinlerle ilişkisi olup olmadığının çözümlenebilmesi için daha farklı sinyal yolları ve o yollarda aktif olan protein ekspresyonları incelenebilir.



Şekil 14: Kolşisin'in ASC, CASP-1 ve Pyrin gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişim

Sonuç olarak bu tezde farklı türde MEFV mutasyonu taşıyan FMF hastalarından alınan periferik kandan elde edilen hücreler kolşisin hücre polaritesi ile ilgili genlere olan etkisi gözlemlenmiştir. FMF hastalarında MEFV geninin protein ürünü olan Pyrin proteininde meydana gelen mutasyon, FMF hastalarının vücudunda inflamasyon meydana gelmesi ile direkt ilişkilidir çünkü pyrin proteini bir inflamasyon sitokini olan IL-1 $\beta$ 'yı aktif hale getiren pyrin inflamazom oluşumunda rol oynayan bir proteindir. Pyrin inflamazomu meydana getiren diğer proteinler ise ASC ve CASP-1 proteinleridir. Bu tezde kolşisin bunlar üzerine olan etkisi amaca uygun olarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre, kolşisin ASC ve geni ekspresyonunu arttırırken, literatür bilgisine uyumlu olarak Pyrin gen ve CASP-1 gen ekspresyonunu düşürdüğü gösterilmiştir (Şekil 14). Bu tezde kullanılan bir diğer ilaç ise canakinumab'dır. Kolşisin dirençli FMF hastalarına alternatif olarak önerilebilir

bu ilaç bir IL-1 $\beta$ -antibodysidir ve IL-1 $\beta$ 'nın reseptörlere bağlanarak inflamasyon sinyaline sebep olmasını engeller. Canakinumab'ın IL-1 $\beta$ 'ya etki ederken diğer hücre proteinleri ile ilişkisi olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, CASP-1, ASC ve Pyn ile ilişkisi olduğu gösterilmiş Kolşisin gibi hücre iskeleti ile ilişkili proteinlerle etkileşimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre IL-1 $\beta$  ekspresyonunu düşürürken, Pyn gen ekspresyonunda belirgin bir düşüş veya artışa sebep olmadı, ASC ve CASP-1 gen ekspresyonunda bir miktar artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre, pyn inflamazom oluşumuna etki etmediği görülen Canakinumab'ın ASC veya CASP-1'in rol aldığı diğer yolları inceleme adına yol gösterici olabilir.



## Sonuç ve Öneriler

- Kolşisinin MEFV geninin ürünü olan Pysin proteininin ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu engellediği gösterilmiştir.
- Pysin miktarındaki azalma, pysin inflamazomunda meydana gelecek azalma ile direkt ilişkilidir.
- Kolşisin varlığında ASC ve CASP-1'in birinin ekspresyonu artarken diğerini azalmaktadır. Buradan hareket ile ASC miktarının artışı, CASP-1'in downregülasyonuna sebep olabileceği çıkarımı yapılabilir.
- Canakinumab IL-1 $\beta$  ekspresyonunu azaltmaktadır.
- Canakinumab'ın diğer hücre içi proteinlere etkisi gözlemlendiğinde, CASP-1 ve ASC gen regülasyonunu arttırdığı ortaya konmaktadır.
- Canakinumab'ın diğer proteinlerle ilişkisini tespit edebilmek için CASP-1 ve ASC'nin rol aldığı diğer yollar üzerindeki etkisi incelenmelidir.
- Kolşisin'in etki mekanizmasını ve etkileşimde olabileceği proteinleri daha ayrıntılı incelemek adına farklı yollar proteinlerinin ekspresyonları da incelenebilir.
- İlaçların genlerin ekspresyonuna olan ilişkisini knock-out genler taşıyan hücre hatları kullanılarak netleştirilebilir.
- FMF hastalardan elde edilen hücre kültürünün yanında sağlıklı hastalardan da kan alınarak Kolşisin-Canakinumab etkisi gözlemlenerek MEFV geni ve Kolşisin-Canakinumab arası bağlantı gösterilebilir.
- Gelecekte tasarlanabilecek ilaçlar için kolşisinin etki mekanizmasını tam olarak aydınlatılabilmek çok önemlidir, çünkü özellikle kolşisin dirençli FMF hastaları için alternatif ilaç ihtiyacı bulunmaktadır.

## Kaynaklar

- Akca, U., & Batu, E. (2021). SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AND BEHÇET'S DISEASE. *Central Asian Journal Of Medical Hypotheses And Ethics*, 2(1), 43-50. doi: 10.47316/cajmhe.2021.2.1.07
- Aksentijevich, I., & Kastner, D. (2011). Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: past successes, future challenges. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(8), 469-478. doi: 10.1038/nrrheum.2011.94
- Angelidis, C., Kotsialou, Z., Kossyvakis, C., Vrettou, A., Zacharoulis, A., & Kolokathis, F. et al. (2018). Colchicine Pharmacokinetics and Mechanism of Action. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 659-663. doi: 10.2174/1381612824666180123110042
- Bergsbaken, T., Fink, S., & Cookson, B. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7(2), 99-109. doi: 10.1038/nrmicro2070
- Brough, D., & Rothwell, N. (2007). Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 $\beta$  is cytosolic and precedes cell death. *Journal Of Cell Science*, 120(5), 772-781. doi: 10.1242/jcs.03377
- Centola, M., Wood, G., Frucht, D., Galon, J., Aringer, M., & Farrell, C. et al. (2000). The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95(10), 3223-3231. doi: 10.1182/blood.v95.10.3223.010k26\_3223\_3231
- Chae, J., Wood, G., Masters, S., Richard, K., Park, G., Smith, B., & Kastner, D. (2006). The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 $\beta$  production. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 103(26), 9982-9987. doi: 10.1073/pnas.0602081103
- Dalbeth, N., Lauterio, T., & Wolfe, H. (2014). Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clinical Therapeutics*, 36(10), 1465-1479. doi: 10.1016/j.clinthera.2014.07.017
- Demirkaya, E., Saglam, C., Turker, T., Koné-Paut, I., Woo, P., & Doglio, M. et al.

- (2015). Performance of Different Diagnostic Criteria for Familial Mediterranean Fever in Children with Periodic Fevers: Results from a Multicenter International Registry. *The Journal Of Rheumatology*, 43(1), 154-160. doi: 10.3899/jrheum.141249
- Dhimolea, E. (2010). Canakinumab. *Mabs*, 2(1), 3-13. doi: 10.4161/mabs.2.1.10328
- Doria, A., Zen, M., Bettio, S., Gatto, M., Bassi, N., & Nalotto, L. et al. (2012). Autoinflammation and autoimmunity: Bridging the divide. *Autoimmunity Reviews*, 12(1), 22-30. doi: 10.1016/j.autrev.2012.07.018
- Gery, I., & Waksman, B. (1972). POTENTIATION OF THE T-LYMPHOCYTE RESPONSE TO MITOGENS. *Journal Of Experimental Medicine*, 136(1), 143-155. doi: 10.1084/jem.136.1.143
- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation And Regeneration*, 39(1). doi: 10.1186/s41232-019-0101-5
- Krainer, J., Siebenhandl, S., & Weinhäusel, A. (2020). Systemic autoinflammatory diseases. *Journal Of Autoimmunity*, 109, 102421. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102421
- Masola, V., Carraro, A., Granata, S., Signorini, L., Bellin, G., & Violi, P. et al. (2019). *In vitro* effects of interleukin (IL)-1 beta inhibition on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular and hepatic stellate cells. *Journal Of Translational Medicine*, 17(1). doi: 10.1186/s12967-019-1770-1
- McDermott, M. (2004). A common pathway in periodic fever syndromes. *Trends In Immunology*, 25(9), 457-460. doi: 10.1016/j.it.2004.07.007
- McDermott, M., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E., Ogunkolade, B., & Centola, M. et al. (1999). Germline Mutations in the Extracellular Domains of the 55 kDa TNF Receptor, TNFR1, Define a Family of Dominantly Inherited Autoinflammatory Syndromes. *Cell*, 97(1), 133-144. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80721-7
- Nigrovic, P., Lee, P., & Hoffman, H. (2020). Monogenic autoinflammatory disorders: Conceptual overview, phenotype, and clinical approach. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 146(5), 925-937. doi: 10.1016/j.jaci.2020.08.017
- OMIM Entry - \* 608107 - MEFV INNATE IMMUNITY REGULATOR, PYRIN;

MEFV.(2022). Retrieved 22 May 2022, from <https://omim.org/entry/608107#27>

- Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., & Dubyak, G. (2007). Nonclassical IL-1 $\beta$  Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal Of Immunology*, *179*(3), 1913-1925. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1913
- Rosenwasser, L., Dinarello, C., & Rosenthal, A. (1979). Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition. IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen. *Journal Of Experimental Medicine*, *150*(3), 709-714. doi: 10.1084/jem.150.3.709
- Sack, G. (2018). Serum amyloid A – a review. *Molecular Medicine*, *24*(1). doi: 10.1186/s10020-018-0047-0
- Schnappauf, O., Chae, J., Kastner, D., & Aksentijevich, I. (2019). The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Frontiers In Immunology*, *10*. doi: 10.3389/fimmu.2019.01745
- Sfikakis, P. (2017). FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AS THE PROTOTYPE AUTOINFLAMMATORY DISORDERI65. FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AND ADAMANTIADIS–BEHÇET DISEASE: COMMON FEATURES AND DIFFERENCES. *Rheumatology*, *56*(suppl\_2). doi: 10.1093/rheumatology/kex060.065
- Shohat, M., & Halpern, G. (2011). Familial Mediterranean fever—A review. *Genetic In Medicine*, *13*(6), 487-498. doi: 10.1097/gim.0b013e3182060456
- Sims, J., & Smith, D. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, *10*(2), 89-102. doi: 10.1038/nri2691
- Seshadri, S., Duncan, M., Hart, J., Gavrillin, M., & Wewers, M. (2007). Pyrin Levels in Human Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages Regulate IL-1 $\beta$  Processing and Release. *The Journal Of Immunology*, *179*(2), 1274-1281. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.1274
- Stanton, R., Gernert, K., Nettles, J., & Aneja, R. (2011). ChemInform Abstract:Drugs that Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Cheminform*, *42*(30), no-no. doi: 10.1002/chin.201130277
- Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., & Yoshikawa, Y. et al.

- (2007). Differential Regulation of Caspase-1 Activation, Pyroptosis, and Autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-Infected Macrophages. *Plos Pathogens*, 3(8), e111. doi: 10.1371/journal.ppat.0030111
- Tang, L., Lu, C., Zheng, G., & Burgering, B. (2020). Emerging insights on the role of gasdermins in infection and inflammatory diseases. *Clinical & Translational Immunology*, 9(10). doi: 10.1002/cti2.1186
- Taskiran, E., Cetinkaya, A., Balci Peynircioglu, B., Akkaya, Y., & Yilmaz, E. (2012). The effect of colchicine on pyrin and pyrin interacting proteins. *Journal Of Cellular Biochemistry*, 113(11), 3536-3546. doi: 10.1002/jcb.24231
- Waite, A., Schaner, P., Hu, C., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., & Hong, A. et al. (2009). Pyrin and ASC Co-Localize to Cellular Sites that Are Rich in Polymerizing Actin. *Experimental Biology And Medicine*, 234(1), 40-52. doi: 10.3181/0806-rm-184
- Yu, J., Wu, J., Zhang, Z., Datta, P., Ibrahimi, I., & Taniguchi, S. et al. (2005). Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF- $\kappa$ B, via ASC oligomerization. *Cell Death & Differentiation*, 13(2), 236-249. doi: 10.1038/sj.cdd.4401734

## **Teşekkür**

Tez çalışması sürecinde bana katkılarını esirgemeyen, çok değerli bilgileri ile tezimde yoluma ışık tutan tez danışmanım Prof. Dr. Afig BERDELİ'ye; katkılarından ötürü Doktora Öğrencisi Berkay KIRNAZ'a, Kök Hücre Anabilim Dalı bünyesindeki tüm öğretim üyelerine ve çalışanlarına; özverili ve uyumlu bir ekip şeklinde birlikte bu yolda birlikte çabaladığım arkadaşım Hazal BARUT'a moleküler düzeydeki çalışmalarımızı yapmamızda bize yardımcı ve cihazlarını kullanmamıza izin veren Tıbbi Genetik çalışanlarına, her zaman yanımda olan benden maddi-manevi desteğini asla esirgemeyen annem Seda ANADOLU ve babam Çağlayan ANADOLU başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

İzmir, 20.05.22

Fatma ANADOLU

## Özgeçmiş

Ad Soyadı : Fatma ANADOLU

Doğum Yeri :

Mezun Olduğu Okullar:

2012-2017 : İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (Moleküler Biyoloji ve Genetik-Lisans)

2018-2020: Anadolu Üniversitesi(Sağlık Yönetimi-Önlisans-Açıköğretim)

2019-2022: Ege Üniversitesi (Kök Hücre-Yüksek Lisans)

2020-...: Anadolu Üniversitesi (İş Sağlığı ve İş Güvenliği-Önlisans-Açıköğretim)

