

**EPİTEL HÜCRE KÖKENLİ SERPINB1'İN NÖTROFİL
ELASTAZ İLİŞKİLİ ANTI-APOPTOTİK VE PRO-
APOPTOTİK YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

**THE EFFECT OF EPITHELIAL CELL-DERIVED SERPINB1 ON
NEUTROPHIL ELASTASE-ASSOCIATED ANTI-APOPTOTIC AND
PRO-APOPTOTIC PATHWAYS**

BÜŞRA KILIÇ

Doç. Dr. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

EPİTEL HÜCRE KÖKENLİ SERPINB1'İN NÖTROFİL ELASTAZ İLİŞKİLİ ANTİ APOPTOTİK VE PRO APOPTOTİK YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİ

Büşra Kılıç

Yüksek Lisans, BİYOMÜHENDİSLİK Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Haziran 2021, 114 sayfa

Astım farklı yaş gruplarındaki insanların yaşam kalitesini etkileyen kronik inflamatuvar akciğer hastalıklarından biridir. Duyarlı kişilerin havayolunda sıklıkla nefes darlığı, öksürük, göğüste sıkışma hissi gibi belirtilerle kendini gösterebilmektedir. Astım hastalığında ortaya çıkan hava yolu obstrüksiyonunda genetik faktörlerle birlikte maruz kalınan spesifik alerjenler, sigara dumanı, hava kirliliği gibi çevresel uyaranlar da etkili olmaktadır. Nötrofil, eozinofil ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerin hastalığın patolojisine katkı sağladığı da bilinmektedir.

Astım cevabı heterojenik bir yapıya sahip olduğu için eozinofilik ve nötrofilik (non-eozinofilik) fenotiplere ayırmak mümkündür. Nötrofilik astım patolojisinde nötrofillerin hastalığın seyrinde önemli bir yer kapladığı bilinmektedir. Nötrofiller, kandan inflamasyon olan dokulara göç ederek biyolojik ya da kimyasal madde kaynaklı inflamasyonu ortadan kaldırmaya çalışmaktadırlar. Nötrofiller bu fonksiyonu özelleşmiş granüllerinde depolanan proteazlar ve ürettikleri reaktif oksijen türleri aracılığıyla gerçekleştirirler. Hava yolu epitel hücreleri ile nötrofil hücrelerinin etkileşimi ve nötrofil sayısının progresif bir şekilde artmasını takiben proteaz-anti proteaz arasındaki dengenin bozulması sonucu epitelyal hasara neden olarak

konakçıya zarar vermektedir. Nötrofil elastaz ve MMP-9 da dahil olmak üzere bir takım proteolitik enzim, hava yollarında doku yeniden yapılanmasında önemli rol oynar.

Nötrofillerin azurofilik granüllerinde depolanan nötrofil elastaz, katepsin G, proteinaz 3 gibi güçlü sitotoksik etkiye sahip olan antimikrobiyal proteinlerin kontrolsüz salımı hücre harabiyete sebebiyet vermektedir. Yapılan çalışmalarda nötrofil elastazın hücre içi sinyal yollarını aktive ettiği ve doku harabiyetine sebebiyet verdiği görülmektedir. Nötrofillerin özelleşmiş kompartmanlarındaki proteazların kontrolsüz salımının etkilerine karşı sitoplazma içerisinde anti-proteolitik aktivitesi olan çeşitli proteinler bulunmaktadır. Bu proteaz inhibitörleri arasında serin proteaz inhibitörlerinden biri olan ve lökosit elastaz inhibitörü olarak da bilinen SERPINB1'in anti proteaz aktivitelerinin yanı sıra hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla kaspazlar gibi çeşitli ölüm yollarında bulunan molekülleri regüle ederek pro apoptotik ve anti apoptotik etkiler sergileyebildiği bilinmektedir. SERPIN'lerin yarı kararlı moleküller olmaları ve konformasyonel değişime açık çok fazla bölge içermeleri, diğer moleküllerle etkileşerek farklı aktivitelerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Hücre stres sırasında SERPINB1'in P1-P1 bölgesine yapılan proteaz ataklar sonucunda konformasyonel değişime uğrayarak anti-proteaz aktivitesini kaybettiği ve endonükleaz aktivitesi kazanarak nükleusa transloke olduğu gösterilmiştir. Aktivitesindeki değişimle birlikte bu yeni molekül L-DNase II (lökosit elastaz inhibitöründen türeyen DNase II) adını almaktadır. Nükleusa transloke olan L-DNase II DNA'yı oligonükleozomlarına parçalayarak hücreyi apoptoza (programlı hücre ölümü) götürmektedir. DNase'lar apoptoz çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle, L-DNase II molekülünün NE ilişkili apoptotik yollardaki fonksiyonunun aydınlatılması gerekmektedir. Buna karşın, proteazlarla başlayan bu yolağın nötrofil inflamasyonu ile epitel hücreler arasındaki ilişkisiyle ilgili bilgiler literatürde sınırlıdır.

Tez çalışması kapsamında SERPINB1'in nötrofil elastazla ilişkili olarak pro ve anti apoptotik etkileri ALI-kültür yöntemiyle bronş epitel hücrelerinin (BEAS-2B) farklılaştırılması aracılığıyla RNA ve protein düzeyinde araştırılmıştır. BEAS-2B hücrelerinin artan konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılmasının apoptoza sebebiyet verdiği bulunmuştur. LEI/L-DNase II yolağını spesifik olarak aktive edebilecek doza/dozlara karar verilmiştir. Protein ve gen düzeyinde Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 moleküllerinin seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı ortaya konmuştur. Protein seviyesindeki analizler sonucunda nötrofil elastazın SERPINB1'in farklı molekül ağırlıklarına sahip formlarını ortaya çıkardığı tespit

edilmiştir. Epitel hücrelerde sitozolik ve nükleer olmak üzere SERPINB1 miktarının nötrofil elastaz ile birlikte değişkenlik gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Astım, SERPINB1, L-DNase II, nötrofil elastaz



ABSTRACT

THE EFFECT OF EPITHELIAL CELL-DERIVED SERPINB1 ON NEUTROPHIL ELASTASE-ASSOCIATED ANTI-APOPTOTIC AND PRO-APOPTOTIC PATHWAYS

Büşra KILIÇ

Master of Science, Department of BIOENGINEERING

Supervisor: Assos. Prof. İbrahim Çağatay KARASLAN

June 2021, 114 pages

Asthma is a chronic inflammatory lung disease that significantly impacts the quality of life of people of all ages. Shortness of breath, coughing, and chest tightness in the airway are common symptoms in sensitive people. While hereditary factors may play a role in airway obstruction in asthma, other stimuli such as particular allergens, cigarette smoke, and air pollution may also be effective. Although airway obstruction occurs in different phases, inflammatory cells such as neutrophils, eosinophils, and mast cells contribute to the disease's pathophysiology.

As the asthma response has heterogenic nature, it is also possible to divide them into eosinophilic and neutrophilic (non-eosinophilic). It is known that neutrophils occupy an essential place in the course of the disease in the pathology of neutrophilic asthma. By transmigrating from the vascular area to the inflamed tissues, neutrophils attempt to eliminate the response caused by the effects of biological or chemical substances. Proteases and reactive oxygen species with cytotoxic effects that neutrophils store in their specialized granules are critical molecules for neutrophils to perform this function. Although the interaction of airway epithelial cells and neutrophils affects the existing pathogen or chemical, the progressive increase in neutrophil numbers harms the host by disrupting the balance of proteases and anti-proteases. Proteolytic enzymes, including NE and MMP-9, play essential roles in airway remodeling and repair.

The uncontrolled release of antimicrobial proteins with strong cytotoxic effects such as neutrophil elastase, cathepsin G, proteinase 3 stored in the azurophilic granules of neutrophils

causes cellular destruction. Studies have shown that neutrophil elastase activates intracellular signaling pathways and causes tissue damage. Against the effects of uncontrolled release of proteases in specialized compartments of neutrophils, there are various proteins with anti-proteolytic activity in the cytoplasm. The leukocyte elastase inhibitor SERPINB1, which has anti-protease properties in the cytoplasm and is responsible for the inhibition of these proteases, protects against the effects of uncontrolled protease release in specific parts of neutrophils. Furthermore, SERPINB1 has been shown to have pro-apoptotic and anti-apoptotic effects by regulating molecules involved in various death pathways, such as caspases, via the activation or inhibition of intracellular signaling pathways as well as anti-protease activities. It is also seen that SERPINB1 may have a direct or indirect decisive role in determining the fate of the cell. The fact that SERPINs are metastable molecules and contain many regions open to conformational change can encourage the emergence of different activities by interacting with other molecules. It has been shown that during cellular stress, SERPINB1 loses its anti-protease activity by undergoing conformational changes as a result of protease attacks on the P1-P1 region and translocates to the nucleus by gaining endonuclease activity. This new molecule is called L-DNase II (DNase II derived from leukocyte elastase inhibitor) with the change in its activity. L-DNase II, translocated to the nucleus, cleaves DNA into oligonucleosomes and leads the cell to apoptosis (programmed cell death). DNases have an essential place in apoptosis studies. Therefore, the function of L-DNase II molecule in NE-related apoptotic pathways needs to be clarified. However, information on the relationship between neutrophil inflammation and epithelial cells of this pathway, which starts with proteases, is limited in the literature.

Within the scope of this thesis, the pro-and anti-apoptotic effects of SERPINB1 in relation to neutrophil elastase were investigated at the RNA and protein level by differentiation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) by the ALI-culture method. It was shown that the stimulation of BEAS-2B cells with increasing concentrations of neutrophil elastase-induced apoptosis. The dose(s) to specifically activate the LEI/L-DNase II pathway was decided. Consistent with the literature, it was revealed that there was no significant change in Caspase-3, Caspase-8, and Caspase-9 molecules at protein and gene levels. As a result of analyzes at the protein level, it was determined that neutrophil elastase revealed forms of SERPINB1 with different molecular weights. In addition, it was found that the amount of SERPINB1 in the cytosolic and nuclear sections of epithelial cells changes with neutrophil elastase stimulation.

Keywords: Asthma, SERPINB1, L-DNase II, neutrophil elastase

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince ilgi ve destek gösteren, bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, bir amaç uğruna azimle çalışabilmenin ve dünyanın en iyileri bizi notluyormuşçasına her gün bu çalışmayı sürdürebilmenin mahiyetini bana öğreten değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a,

Bilimsel yolculuğumda belirleyici rolü olan, bilgi ve tecrübesiyle bana çok şey katmış olan, her kapısını çaldığımda problemlerimi sabırla dinleyerek çözüm üreten, fikirlerime ciddiyle yaklaşan, her koşulda yanımda durarak destekleyen, sevgisini ve ilgisini hep hissettiğim çok sevgili hocam Dr. Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e,

Tez çalışmamda ve özel hayatımda çok değerli geribildirimleriyle bana her anlamda güç veren, koşulsuz desteğiyle birlikte dostuluğunun sıcaklığını her an hissettiğim sevgili arkadaşım Arş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ'a,

Desteklerini ve sevgilerini her zaman kalbimde hissettiğim, büyük bir özveriyle yardım eden ve çok iyi birer ekip arkadaşı olan Beyza DOĞAN ve Berfin Doğa KOÇKAYA'ya,

Çalışmalarımda ihtiyaç duyduğum anda yardım etmekten çekinmeyen ECRG Laboratuvar arkadaşlarım, Sema TUNCER, Selcan GENÇ, Ali Doruk UZUNKAYA, Seçil SUBAŞI, Araş.Gör. Dilara KARAGÜZEL, Gizem İMRAK'a,

Hayatımın her aşamasında beni kayıtsız şartsız destekleyen, varlıklarıyla bana güç veren, çalışma sürecimi büyük bir sabırla ve sevgiyle destekleyen, en büyük destekçilerim canım annem Ayşe KILIÇ ve babam Regayip KILIÇ'a,

Hayattaki en büyük şansım ve en değerlim olan kardeşim Buse KILIÇ'a,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamda FYL-2019-18081 numaralı Yüksek Lisans Tez Projesi ile maddi destek sağlayan HÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Nötrofil.....	3
2.1.1. Nötrofillerin Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Nötrofillerin Yaşam Döngüsü.....	4
2.1.3. Granülopoez.....	4
2.1.4. Nötrofil Granülleri ve Sınıflandırılması.....	5
2.1.4.1. Azurofilik (Primer) Granüller.....	6
2.1.4.2. Spesifik (Sekonder) Granüller.....	7
2.1.4.3. Jelatinaz (Tersiyer) Granüller.....	7
2.1.4.4. Sekretuvar Granüller (Salgı Vezikülleri).....	7
2.1.5. Nötrofil Aktivasyonu/ Nötrofil Migrasyonu.....	8
2.1.6. Nötrofil Patojen Savunma Stratejileri.....	9
2.1.6.1. Degranülasyon.....	9
2.1.6.2. Fagositozis ile Hücre İçine Alma	10
2.1.6.3. Oksidatif Patlama ve ROS.....	11
2.1.6.4 NETs: Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları.....	11
2.1.7. Nötrofilik Proteazlar ve İnhibitörlerinin Dengesi.....	12
2.2. Serin Proteaz İnhibitörleri (SERPIN).....	13
2.2.1. SERPINB1: Lökosit Elastaz İnhibitörü	13
2.2.2. Lökosit Elastaz İnhibitör Türevi Endonükleaz: L-DNAz II	15

2.2.2.1. LEI/L-DNase II'nin Moleküler Karakterizasyonu.....	15
2.2.2.2 Apoptoz ve LEI/DNAz II İlişkisi.	17
2.2.2.3. L-DNAz II'nin Pro Apoptotik Etkisi.....	17
2.2.2.4. LEI Anti Apoptotik Etkisi.....	18
2.3. Astım.....	19
2.3.1. Astım patofizyolojisi	19
2.3.2.Astım Fenotipleri.....	20
2.3.3. Nötrofilik Astım	21
2.3.4. Nötrofiller ve Hava Yolu Epiteli İlişkisi.....	22
2.3.5. Nötrofillerin Astım Patolojisindeki Rolü.....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	24
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	24
3.2. Nötrofil Elastaz Aktivite Ölçümü.....	25
3.3. BEAS-2B (Bronşiyal Epitel Hücre Hattı) Hücrelerinin Çoğaltılması.....	26
3.4. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi.....	26
3.4.1. MTT Testi.....	26
3.4.2. Propidyum İyodür (PI) / Akridin Orange (AO) Apoptotik/Nekrotik Hücre Floresan Boyama.....	27
3.4.3. Mitokondrial Transmebran Membran Potansiyelinin Ölçülmesi.....	29
3.4.4. Laktat dehidrogenaz (LDH) testi.....	30
3.4.5. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 Aktivite Ölçümü.....	31
3.5. Air Liquid Interface (ALI) Kültürü Yöntemiyle Akciğer Bronş Epitel Hücre Hattı (BEAS-2B) Farklılaştırılması.....	31
3.6. Hücrelerin Belirlenen Doz ve Sürede Nötrofil Elastaz ile Uyarılması.....	32
3.7. RNA İzolasyonu.....	33
3.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	34
3.9. Gerçek Zamanlı PZR (RNA düzeyinde).....	34
3.10. İmmünofloresan Analiz.....	35
3.11. Sitozol/Nükleer Fraksiyonlama.....	37
3.12. Western Blot.....	38
3.13. ELISA (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analiz) Yöntemi.....	41

3.14. İstatistiksel Analiz.....	43
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Nötrofil Elastaz aktivite ölçümü.....	44
4.2. Nötrofil Elastaz ile Uyarılan BEAS-2B Hücrelerinde Canlılık ve Sitotoksitenin Ölçülmesi.....	44
4.2.1. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde MTT testi....	45
4.2.2. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Propidyum İyodür (PI)/ Akridin Orange (AO) Floresan Boyama ile apoptotik/nekrotik hücre tespiti.....	46
4.2.3. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerde SERPINB1 protein seviyesinin western blot yöntemiyle tayin edilmesi.....	47
4.2.4. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde LDH testi....	49
4.2.5. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerde Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktivitesinin ölçülmesi.....	50
4.2.4. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerin mitokondriyal membran potansiyellerinin ölçülmesi.....	51
4.3. Uygun dozda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin apoptotik SERPINB1/L-DNase II yolağında yer alan genlerin ifadesinin belirlenmesi.....	52
4.4. SERPINB1 ve L-DNase II protein miktarlarının western blot ile belirlenmesi.....	55
4.5. Nötrofil Elastaz ile uyarılan hücrelerde immüno Floresan analiz yapılarak SERPINB1 ve L-DNAz II moleküllerinin hücresel konumunun görüntülenmesi.....	58
4.6. Nötrofil Elastaz ile uyarılan hücrelerden toplanan supernatantlardan ELISA yöntemiyle IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF proteinlerinin miktarının tayin edilmesi.....	60
5.YORUM.....	67
6.KAYNAKLAR.....	70
EK 1 - Tezden türetilmiş bildiriler.....	81
EK 2 - Tez orjinallik raporu.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nötrofillerin kemik iliğinde farklılaşmalarının şematik gösterimi

Şekil 2.2. Nötrofil granüllerinin sınıflandırılmasının şematik olarak gösterimi.

Şekil 2.3. Nötrofillerin inflamasyon bölgesine transmigrasyonu

Şekil 2.4. LEI/L-DNase II'nin hücresel lokasyon değişiminin şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 3.1. Mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle MTT tetrazolium halkasının parçalanması ve mor renkli formazan kristalinin oluşumu.

Şekil 3.2. AO/PI ikili floresan boyamasının şematik olarak çalışma prensibinin gösterilmesi.

Şekil 3.3. Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümünde kullanılan JC-1 boyasının monomerik ve dimerik yapılarının floresan mikroskop görüntüleri.

Şekil 3.4. LDH yönteminin çalışma prensibinin şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 3.5. BEAS-2B hücreleri için ALI kültür yöntemi.

Şekil 3.6. Farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin nötrofil elastaz ile uyarılması.

Şekil 3.7. Gerçek zamanlı PZR döngü koşulları

Şekil 3.8. İmmünohistokimya deneyinin şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 3.9. Western Blot transfer kaset düzeninin şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 4.1. Substratı ile etkileştirilen nötrofil elastazın aktivite ölçüm sonuçları.

Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda (10 nM, 25nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM) 1 saat, 3 saat ve 6 saat nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde MTT sonuçları.

Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin apoptotik ve nekrotik ayrımı için yapılan ikili boyama sonuçları. Us: Uyarılmamış. Beyaz ok ile işaretlenmiş hücre grupları erken/geç apoptotik evreyi temsil etmektedir. (A:1 Saat B: 3 Saat C: 6 Saat)

Şekil 4.4. 5 nM, 10 nM, 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde SERPINB1 ve Beta-aktin proteinlerinin Western Blot sonuçları. US: Uyarılmamış

Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda 3 saat süreyle nötrofil elastaz (5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM) ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde LDH testi sonuçları.

Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda (5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM) nötrofil elastaz ve 20 µM kamptotesin ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktivite ölçümünün sonuçları. US: Uyarılmamış.

Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda (5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde JC-1 floresan probu aracılığıyla mitokondriyal transmembran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) analiz sonucu. FCCP: Pozitif Kontrol, US: Uyarılmamış.

Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda (5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerin JC-1 agregat/dimer (kırmızı) ve JC-1 monomer (yeşil) formlarının floresan mikroskopta görüntülenmesi. FCCP: Pozitif kontrol, US: Uyarılmamış.

Şekil 4.9. ALI-kültür yöntemiyle BEAS-2B hücrelerinin 3 saat nötrofil elastaz (25 nM) ve 1 saat kamptotesin (20 µM) ile uyarımı sonucu SERPINB1 (A), BCL2 (B), BAX (C), Cas3 (D), Cas8 (E), Cas9 (F), PARP1 (G), AIF (H) genlerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları. US: Uyarılmamış. (n:3; p:0.0332 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(***))

Şekil 4.10. ALI-kültür yöntemiyle BEAS-2B hücrelerinin 3 saat nötrofil elastaz (10 nM) ve 1 saat kamptotesin (20 µM) ile uyarımı sonucu SERPINB1 (A), BCL-2 (B), Kaspaz-9 (C), Kaspaz-3 (D) Kaspaz-8, (E) Kaspaz-9, genlerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları. US: Uyarılmamış. (n:3; p:0.0332 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(***))

Şekil 4.11. Nötrofil elastaz (10 nM) ile 3 saat süreyle apikal, bazal ve apikal/bazal olmak üzere uyarılan farklılaştırılmış BEAS-2B hücrelerinin sitozolik ve nükleer ekstraktlarındaki SERPINB1 ve Beta-aktin proteinlerinin Western Blot sonuçları. US: Uyarılmamış

Şekil 4.12. Nötrofil elastaz (25 nM) ile 3 saat süreyle apikal, bazal ve apikal/bazal olmak üzere uyarılan farklılaştırılmış BEAS-2B hücrelerinin sitozolik ve nükleer ekstraktlarındaki SERPINB1 ve Beta-aktin proteinlerinin Western Blot sonuçları. US: Uyarılmamış

Şekil 4.13. 3 saat 10 nM nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde SERPINB1 ve L-DNase II düzeylerinin floresan mikroskop görüntü sonuçları (Kırmızı SERPINB1 proteinini, mavi renk (DAPI) çekirdeği göstermektedir) US: Uyarılmamış.

Şekil 4.14. SERPINB1 antikorlarının tanıma bölgelerinin ve RCL, CARD domeinlerinin protein üzerindeki konumlarının şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 4.15. 3 saat 10 nM nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde SERPINB1 ve L-DNase II düzeylerinin floresan mikroskop görüntü sonuçları (Kırmızı SERPINB1 proteinini, mavi renk (DAPI boyası) çekirdeği göstermektedir) SERPINB1 antikorunu 1:50 dilüye edilerek kullanılmıştır.

Şekil 4.16. IL-6 proteininin standart grafiği.

Şekil 4.17. 3D ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 3 saat (10 nM, 25 nM) nötrofil elastaz ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu üst (A, C) ve alt (B, D) süpernatantlarında IL-6 proteininin ELISA sonuçları. US: Uyarılmamış. (n:3; p:0.0332 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(*****)

Şekil 4.18. TNF- α proteininin standart grafiği

Şekil 4.19. IL-8 proteininin standart grafiği

Şekil 4.20. 3D ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 3 saat (10 nM, 25 nM) nötrofil elastaz ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu üst (A, C) ve alt (B, D) süpernatantlarında IL-8 proteininin ELISA sonuçları. US: Uyarılmamış. (n:3; p:0.0332 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(*****)

Şekil 4.21. GM-CSF proteininin standart grafiği.

Şekil 4.22. 3D ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 3 saat (10 nM, 25 nM) nötrofil elastaz ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu üst (A, C) ve alt (B, D) süpernatantlarında GM-CSF proteininin ELISA sonuçları. US: Uyarılmamış. (n:3; p:0.0332 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(*****)

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılan primerlerin gösterilmesi.

Çizelge 3.3. İstifleme jel içerisindeki kimyasal miktarları

Çizelge 3.2. Ayırıcı jel içerisindeki kimyasal miktarları



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
U	Ünite
rpm	Dakikadaki devir sayısı
cm ²	Santimetre kare
°C	Derece santrigat
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometre
μ L	Mikrolitre
Ex/Em	Uyarma/emisyon
mg	Miligram
mL	Mililitre
pH	Hidrojen gücü
μ g	Mikrogram

Kısaltmalar

AHR	Havayolu aşırı duyarlılığı
BEAS-2B	İnsan bronş epitel hücre hattı
cDNA	Komplementer DNA
LDH	Laktat dehidrogenaz
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür)
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfat tamponlu salin

PMN	Polimorfonükleer
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FBS	Fetal bovine serum
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PBS	Fosfat tamponlu salin
ROT	Reaktif oksijen türleri
L-DNase II	Lökosit elastaz türevi DNase II
TLR	Toll-like reseptör
NE	Nötrofil Elastaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
IL	İnterlökin
MMP	Matriks metalloproteazlar
PAMP	Patojen ilişkili moleküler kalıplar
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü - β

1. GİRİŞ

Astım havayolu inflamasyonu ve havayollarının aşırı duyarlılığı ile karakterize olan kronik bir akciğer hastalığıdır. Havayolu inflamasyonuna yapısal hücreler (epitel hücreler, fibroblastlar, endotel hücreler ve düz kas hücreleri) ve inflamatuvar hücreler (nötrofiller, eozinofiller, T hücreleri, mast hücreleri) olmak üzere farklı hücre tipleri aracılık etmektedir. Bu hücreler çeşitli mediatörler aracılığıyla birbirleriyle etkileşim halinde olmakla birlikte inflamasyonu şiddetlendirmekte görev alırlar.

Epitel hücreler vasküler alandan dokulara nötrofil çağırmasını sağlayan kilit hücrelerdir. Sirkülasyon halindeki nötrofiller, kandan ayrılarak dokulara girerek degranülasyon, fagositozis, gibi çeşitli savunma stratejileri ile antijenleri etkisiz hale getirmektedirler. Fagosit edilemeyecek kadar büyük olan patojenleri inflamasyon bölgesinde fiziksel olarak sınırlandırmak için ayrıca nötrofil hücre dışı tuzakları (NETs: Neutrophil Extracellular Traps) oluşturmaktadırlar. NETs'ler içerisinde histonlar, antimikrobiyal enzimler (elastaz, miyeloperoksidaz, proteinaz 3) içeren yapılardır ve bunlar aracılığıyla patojeni etkisiz hale getirmeyi amaçlamaktadırlar.

Nötrofillerin aktivasyonu, nötrofil granüllerinde yüksek konsantrasyonda depolanan proteazların salınımına yol açmaktadır. İnflamasyonun aşırı derecede şiddetlenmesi durumunda nötrofillerden salınan bu proteazlar ile inhibitörleri arasındaki denge bozulmaktadır. Proteazların yıkıcı etkilerine karşı hücreler proteaz inhibitörleri salarak kendilerini korurlar ve proteazlara karşı serin, sistein, treonin, aspartik, glutamik, metalloproteaz inhibitörleri sentezleyerek hücre homeostasisin korunmasında görev alırlar.

Serin proteazlara karşı sentezlenen serin proteaz inhibitörleri (SERPINler) tüm ökaryotik organizmalarda bulunur. SERPINler farklı hücre ve dokularda farklı miktarlarda bulunurlar. SERPIN'lerin proteaz inhibitörü işlevlerinin yanında şaperon ya da tümör baskılayıcı rolleri de vardır. Ayrıca kaspazları ya da papain benzeri proteazları inhibe edebildikleri çalışmalarla desteklenmiştir. Anti-proteaz özelliğe sahip olan SERPIN'ler, özgünlüklerini sağlayan Reaktif Merkez Halkası (RCL: Reactive Center Loop) bölgesinde meydana gelen konformasyonel değişikliklerle hedef proteaza geri-dönüşümsüz olarak bağlanarak inhibe ederler. Ayrılabilir bir hidrofobik sekans barındırmaları SERPIN'leri esas olarak sitozolde konumlandıklarını ortaya koymuştur ancak yapılan çalışmalarla alternatif bir yolakla hücre dışına da çıkabileceği tespit edilmiştir.

In vivo deneyler SERPINB1 geni susturulmasının konak savunmasını ve nötrofillerin sağ kalımını negatif yönde etkilediği göstermiştir. SERPINB1'in özellikle nötrofillerin ağırlıklı olarak bulunduğu akciğer inflamatuvar hastalıklarında merkezi bir regülatör olduğu görülmektedir. SERPINB1'in temel olarak iki aktivesi göze çarpmaktadır. İlki; RCL bölgesinde meydana gelen konformasyonel değişiklikler ile proteaza bağlanarak antiporteaz aktivitesi yoluyla proteazı inhibe etmesi, ikincisi ise RCL bölgesinden P1-P1 rezidularına yapılan proteaz ataklar sonucunda kesime uğrayarak konformasyonel değişim gerçekleştirmesi ve bunun sonucunda bir endonükleaz olan L-DNase II'ye dönüşmesidir.

Astım tedavisinde kullanılan kortikosteroidlerin ve immünoterapi yaklaşımlarının yetersiz kalması, astım alt tiplerinin tanımlanmasına, bu süreçte aktifleşen çeşitli sinyal yollarının ve bu yolda aktifleşen moleküllerin karakterizasyonun yapılması, doğru tanı ve tedavi için önem arz etmektedir. SERPINB1'in pro apoptotik ve anti apoptotik özellikleri birlikte barındırıyor olması, molekülün çalışmaya değer ve ilginç yönünü ortaya koymakla birlikte bu proteini potansiyel bir hedef ve biyobelirteç adayı yapmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nötrofil

Lökositler, sitoplazmasında granül olup olmamasına göre granülosit ve agranülosit olarak temelde 2 sınıfa ayrılırlar. 19.yy. sonlarına doğru Paul Ehrlich lökosit alt popülasyonları incelemek için yeni geliştirilen hücre boyama teknikleriyle bir dizi çalışma yapmıştır. Ehrlich, 'polimorf çekirdek' yapısı ve nötr boya tutma eğilimi ile karakterize olan yeni keşfedilen hücre tiplerinden birini, "nötrofil" olarak adlandırmıştır. Başlangıçta, enfeksiyon esnasında nötrofillerin artışının, bu hücrelerin enfeksiyona teşvik ettiği ve bakteriler için hücresel aracı işlevi görmesi sonucuna götürmüştür. İmmün cevaptaki asıl rolleri olan antimikrobiyal işlevleri ve fagositik kapasiteleri, Elie Metchnikoff tarafından kesin olarak kanıtlanmıştır. Metchnikoff deniz yıldızı embriyolarıyla yaptığı bir çalışmada; yaralanmanın fagositik hücrelerin bölgeye alınmasına neden olduğunu göstermekle birlikte bu hücrelerin mikroorganizma sindirimine katıldığı kuramını ortaya atmıştır. Metchnikoff özgün çekirdek yapılarından dolayı bu hücrelere polimorfonükleer lökositler (veya PMN'ler) adını vermiştir [1, 2]. Nötrofillerin, doğal bağışıklık tepkisinin anahtar bileşenleri oldukları ve bağışıklık işlevinde hayati önem taşıdıklarını bilinmesine rağmen adaptif immün yanıt çalışmalarına kıyasla bu hücrelerin önemi gölgede kalmıştır. Nötrofillerin kısa ömürlü olmaları, terminal olarak farklılaşmış olmaları doku kültürlerinde büyütülmesini zorlaştırmakta ve nötrofil benzeri ölümsüz hücre hatları bu hücrelerin fonksiyonel özelliklerini kısmen yansıtabilmektedir [2].

2.1.1 Nötrofillerin Genel Özellikleri

Nötrofiller (polimorfonükleer hücreler), periferik kandaki lökositlerin %50-70'ini oluşturan, 6-8 saat gibi kısa bir yaşam süresine sahip hücrelerdir. Çok sınırlı transkripsiyonel aktiviteye sahip terminal olarak farklılaşmış hücrelerdir. Doğal bağışıklık sisteminin efektör hücreleri olan nötrofiller, çeşitli immünolojik ve inflamatuvar süreçlerde yer alırlar. Bu hücreler, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını oluştururlar ve istilacı patojenleri ortadan kaldırmak için reaktif oksijen türleri (ROS) ve hidrolitik enzimler gibi antimikrobiyal ajanlara sahiptirler. Nötrofiller ayrıca genel immün ve inflamatuvar yanıtın koordinasyonunda önemli bir konuma sahiptir. Çeşitli özel işlevleri ve genomik DNA'larını hücre dışı nötrofil tuzakları (NET'ler) biçiminde dışarı salımı dahil olmak üzere biyolojik süreçlere katılma biçimleri, nötrofillerin özgün yönlerini ortaya koymaktadır [3]. Enfeksiyöz hastalıklar, sepsis, çeşitli akciğer hastalıkları, kronik otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar, kanser dahil olmak

üzere çok çeşitli insan hastalıklarının patogeneğinde nötrofiller rol oynamaktadır. Bununla birlikte, nötrofillerin patogeneze katkısı hastalığa göre çeşitlilik göstermektedir. Nötrofil işlevi yetersiz olduğunda (örneğin, aşırı bakteri veya mantar enfeksiyonlarında), nötrofil kompartmanlarının genel aktivitesinin artırılması gerekmektedir. Diğer yandan, bazı hastalıklar aşırı nötrofil aktivasyonu ile karakterize edilir, bu durumda nötrofil kompartmalarının zayıflatılması gerekmektedir. Kanser ve sepsis gibi diğer durumlarda nötrofillerin normal işlevi anormal bir fenotipe kaymaktadır. Bu nedenle devam eden bir dizi çalışma, nötrofil gelişimini ve üretimini hedeflemek, inflamasyon bölgesindeki nötrofil birikimine müdahale etmek ve belirli patolojik koşullar sırasında ortaya çıkan nötrofil fenotipinin zararlı değişikliklerini tersine çevirmek gibi terapötik yaklaşımlarla bu hastalıkların bazılarının tedavisi için nötrofilleri regüle etmeyi amaçlamaktadır [4]. Diğer bir temel strateji ise nötrofil savunma sistemlerinden olan hücre dışı tuzakların (NETs) zararlı yönlerini hafifletmeye yöneliktir. Nötrofil kemotaksisinden ve adezyonundan sorumlu olan CXCR2'nin (Chemokine receptor 2) antagonistleri ve nötrofil elastaz inhibitörleri nötrofil hedefli tedavi yaklaşımlarında kullanılmaktadır. AZD5069'u bloke eden CXCR2, faz II aşamada astımlı hastalarda araştırılırken, nötrofil elastaz inhibitörü AZD9668, bronşiyolitıs obliterans hastalarında araştırılmaktadır [3, 4].

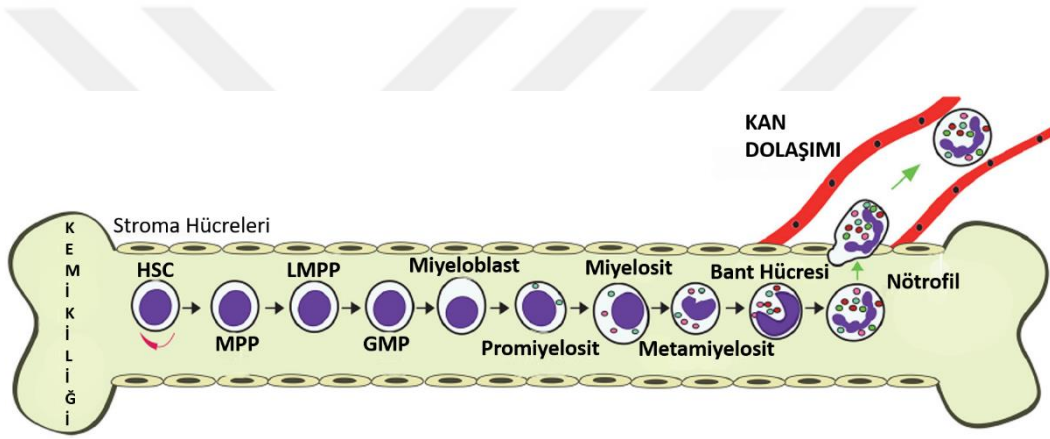
2.1.2. Nötrofillerin Yaşam Döngüsü

Her gün kemik iliğinde 10^{11} 'den fazla nötrofil üretilir. İnflamasyon durumunda bu sayı daha da artmaktadır. Nötrofiller dokulara transmigrasyon yapana kadar kanda sirkülasyon halindedirler. Dokulardaki işlevlerinin ve dolayısıyla yaşam sürelerinin sonuna geldiğinde, çoğunlukla fagositoz aracılığıyla makrofajlar tarafından temizlenirler. Bu üretim ve eliminasyon arasında geçen devridaim sürecindeki denge sayesinde dolaşımdaki nötrofil sayısı nispeten sabit kalır. Ayrıca nötrofiller, farklı zamanlarda veya yerlerde özel işlevleri yerine getirebilmek için aktif alt popülasyonlara ayrılarak değişebilirler [5].

2.1.3. Granülopoez

Hematopoyetik kök hücrelerden kemik iliğinde çok sayıda nötrofil üretilir. Bu hücreler, kendilerini yenileyemeyen multipotent progenitör (MPP) hücrelere farklılaşır. MPP'ler daha sonra, granülosit-monosit progenitörlerine (GMP'ler) farklılaşır ve bunlar da lenfoid ile primer edilmiş multipotent progenitör hücrelere (LMPP'ler) dönüşürler. Granülosit koloni uyarıcı

faktörün (G-CSF) kontrolü altındaki bu GMP'ler, miyeloblastlara dönüşerek nötrofil oluşumunu hazırlar. Bu hücreler daha sonra promiyelosit, miyelosit, metamiyelosit, bant hücresi ve son olarak olgun bir nötrofil aşamalarını içeren bir olgunlaşma sürecini takip eder. Farklılaşma sırasında gelişen nötrofil, çekirdeğini yuvarlak bir şekilden bantlı ve daha sonra loblu bir morfolojiye dönüştürür. Ayrıca çeşitli reseptörlerin ifadesinde düzenlenmeler meydana gelir. İntegrin $\alpha 4 \beta 1$ (VLA4) ve CXC kemokin reseptörü 4 (CXCR4) aşağı yönde düzenlenirken CXCR2 ve Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) yukarı yönde düzenlenir. Olgun nötrofiller ayrıca, işlevleriyle ilgili belirli proteinleri depolayan granüller ve salgı kesecikleri içerir. Bu granüller, belirli farklılaşma aşamalarında oluşturulur. Bu granüller, istilacı patojenleri yok etmek için kullanılan elastaz, miyeloperoksidaz, katelisinler, defensinler ve matris metaloproteinazlar dahil olmak üzere antimikrobiyal enzim depolar [5].



Şekil 2.1. Nötrofillerin kemik iliğinde farklılaşmalarının şematik gösterimi [5]

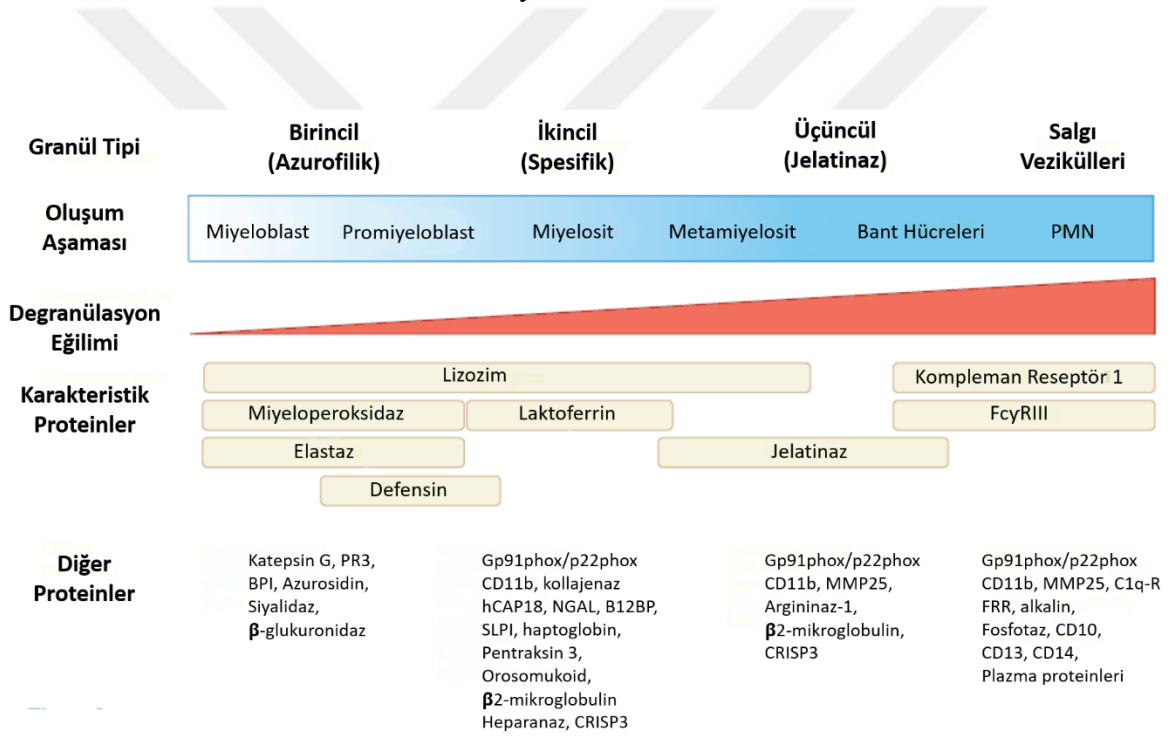
2.1.4. Nötrofil Granülleri ve Sınıflandırılması

Nötrofiller, granüler içeriklerine göre azurofilik (primer), spesifik (sekonder), jelatinaz (tersiyer), sekretuar granüller ve multivesiküler cisimler (MVB'ler) olarak gruplara ayrılmıştır. Granül proteinleri adezyon, transmigrasyon, fagositoz ve nötrofil hücre dışı tuzak (NET) oluşumunu düzenler. Salgılanan proteinler ayrıca insan vücudu tarafından üretilen en toksik faktörlerden bazılarını oluşturmaktadır. Bu nedenle nötrofil degranülasyonu, enfeksiyonları kontrol etmek için önemli olmasına rağmen, güçlü pro inflammatuar cevapları da indükleyebilir [3].

Aktif nötrofiller temelde patojeni yakalamak, elimine etmek, inflamasyon bölgesinde sınırlandırmak aynı zamanda da konakçıya zarar vermemek gibi misyonlara sahiptir. Bu antimikrobiyal faaliyetleri yerine getirirken granüllerinde yer alan içerik hem patojen hem de

konakçı için toksik olabileceği için etkili oldukları yerlerde mükemmel bir hassasiyet ve zamanlama ile işlev görmesi ve kontrollü mekanizmalarla denetlenmesi gerekmektedir. Granüllerin içeriği önemli ölçüde farklılık gösterir bu nedenle inflamasyon sırasında patojenlerin gösterebileceği herhangi bir zayıflıktan yararlanma eğilimindedirler. Bu granüllerin, faaliyetlerinin ve serbest bırakılma yöntemlerinin anlaşılması, nötrofil işlevinin anlaşılması için önem teşkil etmektedir [3, 6].

Nötrofiller, granüllerinde depoladıkları çok miktarda içeriği kan dolaşımı yoluyla güvenli bir şekilde taşımaları ve ardından bunları doğru zamanda doğru şekilde serbest bırakmalarıdır. Bu nedenle, nötrofillerde özel bir depolama organeli olan granüller gelişmiştir. Bununla birlikte, granüller, toksik maddeler için gizli depolama organellerinden çok daha fazlasıdır; inflamasyon sırasında hemen hemen tüm nötrofil faaliyetlerinde aktif ve katılımcılardır [6].



Şekil 2.2. Nötrofil granüllerinin sınıflandırılmasının şematik olarak gösterimi [2].

2.1.4.1. Azurofilik (Primer) Granüller

Azurofilik granüller (peroksidaz pozitif veya birincil granüller olarak da bilinir) içerisinde en büyük olanıdır ve çapı yaklaşık 0,3 μ m'dir ve ilk olarak nötrofil olgunlaşması sırasında oluşur. Bazık azure A boyasını alma ve oksidatif patlamada kritik bir enzim olan miyeloperoksidaz (MPO) içermeleriyle tanımlanırlar. Bu granül sınıfının taşıdıkları diğer proteinler arasında defensinler, lizozim, bakterisidal / geçirgenliği artıran protein (BPI) ve nötrofil elastaz (NE),

proteinaz 3 (PR3) ve katepsin G (CG) gibi bir dizi serin proteaz bulunur. Bu nedenle, bu granüller antimikrobiyal bileşiklerle doludur ve nötrofillerin moleküler silahları için birincil depo olarak işlev görür [6, 7].

2.1.4.2. Spesifik (Sekonder) Granüller

İkinci sınıf granüller, spesifik (veya ikincil) granüller daha küçüktür (0,1 µm), MPO içermemekle birlikte laktoferrin içeriği ile karakterize edilir. Bu granüller, azurofilik granüllerden sonra oluşur. Oksidatif patlamada önem teşkil eden sitokrom b içermektedir. Ayrıca nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin (NGAL), katelisidin (hCAP-18) ve lizozim dahil olmak üzere çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler içerirler [6, 8].

2.1.4.3. Jelatinaz (Tersiyer) Granüller

Üçüncü sınıf, jelatinaz (üçüncül) granüller MPO negatif olmakla birlikte spesifik granüllerden daha küçüktür ve birkaç antimikrobiyal peptitler içerir, ancak bunlar, jelatinaz ve lökolizin gibi bir dizi metalloproteinaz için bir depo işlevi görür. Bu granüller aynı zamanda nötrofil olgunlaşması sırasında oluşan son granül popülasyonudur [6, 8, 9].

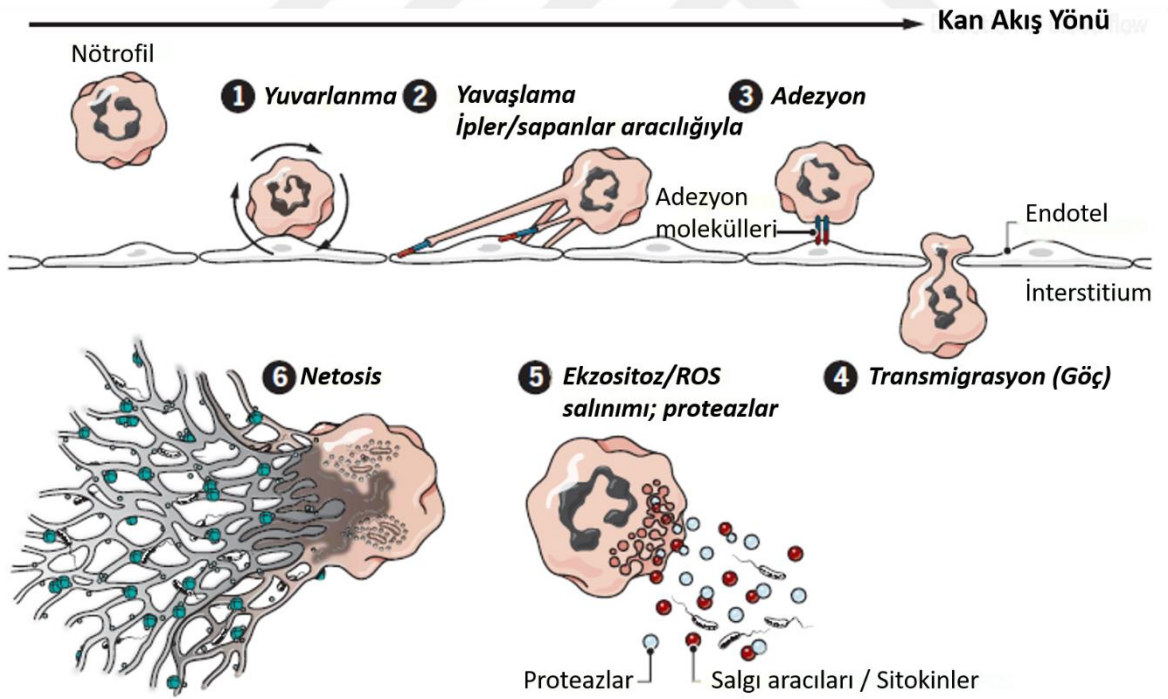
2.1.4.4. Sekretuar Granüller (Salgı Vezikülleri)

Son olarak, dördüncü bir yapı kümesi, salgı vezikülleri de genellikle nötrofil granül ailesinin bir parçası olarak kabul edilir. Klasik granüllerin aksine, bunlar golgi'den tomurcuklanmaz, bunun yerine nötrofil olgunlaşmasının son aşamalarında endositoz yoluyla oluşur. Sonuç olarak, içerikleri ağırlıklı olarak albümin gibi plazma türevli proteinlerden oluşur [9].

Farklı granül sınıfları, inflamatuvar sinyallere yanıt olarak farklı mobilizasyon eğilimleri gösterir. Azurofilik granüller taşınması en zor olanlardır, ardından spesifik granüller, jelatinaz granüller ve son olarak salgı vezikülleri gelir. Bu taşıma işlemi sırasında hücre içi kalsiyum miktarlarının düzenlenmesi de rol oynar. Değişken mobilizasyon eğilimi nedeniyle, her granül alt kümesi nötrofil aktivasyonunun belirli bir aşaması ile ilişkilendirilmiştir [6, 9].

2.1.5. Nötrofil Aktivasyonu ve Nötrofil Migrasyonu (Adezyon, Kemotaksi, Yuvarlanma ve Diyapedez)

Vücut bir patojenle karşılaştığında vaskülerize dokuların bu zararlı ajanları ortadan kaldırmak için konakçı savunma hücrelerini ve onların moleküllerini dolaşımdan ihtiyaç bölgesine taşıması gerekmektedir. Bunun için ilk olarak patojenin tanınması, buna uygun vasküler değişiklikler (vazokonstriksiyon, vazodilatasyon ve vasküler permeabilite artışı) ve son olarak lökosit migrasyonu (marjinasyon, yuvarlanma, adezyon, transmigrasyon) gerçekleşmelidir. Patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs) dokularda belli bir miktar bulunan makrofajların hem hücre zarında hem de hücre içinde bulunan toll benzeri reseptörler (TLRs) tarafından tanınır ve pro inflamatuvar kemokin ve sitokinler aracılığıyla immün sisteme uyarıcı etki yapar ve böylece nötrofil aktivasyonunu başlatır. İnflamatuvar bölgelerde, bakteriden türetilen ve konakçı tarafından üretilen inflamatuvar sinyaller bol miktarda bulunur. Bu bileşikler, inflamatuvar bölgenin yakınındaki endotel hücrelerini de uyarır [10].



Şekil 2.3. Nötrofillerin inflamasyon bölgesine transmigrasyonu [11]

Kemik iliğinden ayrılıp dolaşıma katılan nötrofiller, damar duvarını sürekli ve rastgele denetlerler. Kemotaktik maddelerin gradiyantının yüksek olduğu bölgeye doğru damar

duvarına yakınlaşırlar. Nötrofil marjinasyonu ile birlikte etkilenen bölgeye yakın kan damarlarının endotel hücreleri aktive olur ve E ve P selektinler gibi adezyon reseptörlerini ifade eder ve nötrofil adezyonu başlatılır. Bu reseptörler, nötrofiller üzerindeki glikoprotein ligandlarına bağlanarak bunların endotel üzerinde yuvarlanmasına neden olur. Daha sonra nötrofiller $\beta 2$ integrinlerinde yüksek afinite durumuna neden olan kemokinler tarafından aktive edilir. İntegrinlerin, hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM-1) ve ICAM-2 gibi ligandlarına endotel hücreler üzerinde bağlanması, nötrofilin sıkı yapışmasına neden olur. Endotel hücrelerinin kontraksiyonu sonucu hücreler arası açıklık meydana gelir ve kemotaktik maddelerin olduğu tarafa doğru damar duvarından dışarı çıkarak periferik dokulara göç eder [10, 12].

Nötrofiller periferik dokulara girdikten sonra, işlevlerini tamamlamak için formil-metiyonil-lösil-fenilalanin (fMLF) ve anafilotoksin C5a gibi kemoatraktanların gradyanlarını takip ederler. Dolaşımdaki sabit nötrofil sayısı, sempatik sinir sistemi tarafından iletilen merkezi sinyaller tarafından da kontrol edilir. Bu durumda adrenerjik sinirler, adezyon moleküllerinin endotel hücreleri üzerindeki geçici ifadesini indükleyerek nötrofillerin endotelyuma bağlanmasına ve dolaşımı terk etmesine izin verir. Dokulara nötrofil göçünün düzenlenmesi, sirkadiyen bir modeli izler. Dokulara girdikten sonra nötrofiller apoptoza uğrar ve nihayet yerleşik makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından fagositoz yoluyla temizlenir. Kandaki yaşlı nötrofiller, CXCR4'ün ifadesini yukarı doğru düzenler ve bu da, son temizlik için kemik iliğine dönmelerine izin verir. Apoptotik nötrofillerin temizlenmesi, kemik iliğinde nötrofil üretimini kontrol etmek için de önemlidir. Apoptotik nötrofilin fagositozu, makrofajlar tarafından IL-23'te azalma ile karakterize edilen anti-inflamatuvar tepkiyi tetikler. IL-23 miktarındaki azalma, IL-17 seviyelerinin azalmasına daha az G-CSF üretimine ve son olarak da granülopoezin azalmasına yol açmaktadır [10, 12].

2.1.6. Nötrofil Patojen Savunma Stratejileri

2.1.6.1. Degranülasyon

Nötrofiller aktive olmalarıyla, granülleri harekete geçirilir ve plazma membranı veya fagozom ile kaynaşarak içeriklerini ilgili ortama salmaktadırlar. Her iki durumda da granülün zarı hedef zarın kalıcı bir parçası haline gelir ve böylece moleküler kompozisyonun değişir. Farklı granül sınıfları, inflamatuvar sinyallere yanıt olarak farklı mobilizasyon eğilimleri gösterir: Azurofilik granüller mobilize edilmesi en zor olanlardır, ardından spesifik granüller, jelatinaz granüller ve

son olarak salgı veziküller gelir [13, 14]. Bu taşıma işleminin sırasında hücre içi kalsiyum miktarlarının düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar. Bu değişken mobilizasyon eğilimi nedeniyle, her granül alt kümesi geleneksel olarak nötrofil aktivasyonunun belirli bir aşaması ile ilişkilendirilmiştir [2].

2.1.6.2. Fagositozis ile Hücre İçine Alma

Fagositoz, patojenleri ve hücre kalıntılarını ortadan kaldırmak için önemli mekanizmalardan biridir. Bir partikülün hücre zarı tarafından fagozom adı verilen bir vakuole alındığı aktif, reseptör aracılı bir s  re  ttir. Diğ  er fagositlerde olduğ u gibi bu yutma işleminin nötrofil ve mikroorganizma arasındaki etkileşimin türüne bağılıdır. Etkileşim, PAMP'ların örüntü tanıma reseptörleri (PAR) tarafından tanınması yoluyla veya opsonin aracılığıyla doğ rudan olabilir. İkinci mekanizma ise IgG opsonize parçacıkların yutulmasıyla psödopod uzantılarının oluş umuna dayanan Fc  R aracılı fagositozdur [15]. Hücre içerisine alınan fagozom mikroorganizmalara göreceli olarak zararsızdır ve sitotoksik özelliklerini ancak olgunlaşma sürecinden sonra kazanır. Bu sürecin anlaşılmaması büyük ölçüde makrofajlardaki çalışmalarla dayanmaktadır ve bunlar aydınlatıcı nitelikte olsalar da, nötrofillerde temel farklılıklar mevcuttur. Makrofaj fagositozu, bir endositik olgunlaşma sürecini izler: Nötrofillerde, fagozom olgunlaşması, granüllerin fagozoma boş altılması ile gerçekleşir ve bu sayede antimikrobiyal moleküllerin fagozomal lümene iletilmesi gerçekleşir. Eşzamanlı olarak, NADPH oksidazın fagozomal membran üzerinde toplanması ROS üretimine zemin hazırlar ve birlikte bu iki mekanizma,   oğ u patojen için toksik bir ortam oluş turur. Nötrofil fagozomal pH regülasyonu da makrofajlarda gözlenenden önemli ölçüde farklıdır. Makrofaj fagozomu kademeli olarak asitleş irken, nötrofil fagozomu pH'ı baş langı  ta alkalindir [16] ve uzun süre nötr kalır [17].

Bu alkali pH'ın korunması, baş lıca serin proteazlar NE ve CG'nin aktivasyonu için gereklidir ve asidik granüllerin devam eden giriş ine rağ men NADPH oksidaz aktivitesi aracılığıyla sürdürülür. Tüm patojenler, fagozomun toksik ortamında elimine edilemez. Bazıları nötrofillerin içinde hayatta kalmak için stratejiler geliş tirmişlerdir. Bu stratejiler, yutulmayı engellemeyi, fagozom olgunlaşmasını modüle etmeyi ve patojen için daha elverişli bir intrafagozomal ortam yaratmayı içerir. *Staphylococcus aureus*'da bulunan polisakkarit kapsül, antifagositik özellikler içerir [18]. *Helicobacter pylori*, NADPH oksidazın fagozoma hedeflenmesini bozabilir, böylece süperoksit anyonları fagozomdan ziyade hücre dış ı olarak birikir [19]. *Francisella tularensis* oksidatif patlamanın tetiklenmesini önler ve ayrıca diğ  er

uyaranlara yanıt olarak ROS üretimini inhibe eder [20]. Son olarak, *Salmonella typhimurium* ve *Streptococcus pyogenes* gibi diğer patojenler, fagozom ile granül birleşimini etkili bir şekilde bloke edebilir [21, 22]. Konakçı tarafından elimine edilmesine direnen ve fagozom içinde hayatta kalmayı sağlamak için patojenler tarafından geliştirilen çeşitli mekanizmalar, doğuştan gelen bağışıklık savunmasında fagositozun önemini daha da vurgulamaktadır.

2.1.6.3. Oksidatif Patlama ve ROS

Nötrofillerin aktivasyonu ile solunum patlaması adı verilen bir süreç ile ROS üretimi gerçekleştirilir. [23]. ROS, diğer moleküllerin sinyal iletimini ve antimikrobiyal etkilerini değiştirebilir ve konakçıya zararlı olabilir. NADPH oksidaz kompleksi, fagozomal ve plazma membranları üzerinde birleşir ve moleküler oksijeni süperoksite indirgeyerek reaktif oksijen kademesini başlatır. Süperoksit, güçlü bir oksidan olmasada, hızla parçalanır ve hidrojen peroksit oluşturur [23].

Süperoksit ayrıca inflamasyon olan bölgelerde yüksek seviyelerde üretilen nitrik oksit ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti oluşturabilir. ROS, nötrofillerin antimikrobiyal aktivitesi için oldukça önemlidir. Kronik granülomatöz hastalığına (CGD) sahip bireylerden izole edilen nötrofiller, patojenleri zayıf bir şekilde öldürerek bu hastaları birçok enfeksiyona duyarlı hale getirdiği görülmektedir. Fagosit içinde reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROI) açığa çıkmasını sağlayan nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzim kompleksinin herhangi bir komponentindeki mutasyon fagosite edilen mikrobun öldürülememesine ve granuloma oluşumuna neden olur. NADPH oksidaz ayrıca inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar, bu da CGD hastalarının neden sıklıkla oto inflamatuvar hastalıklardan muzdarip olduğunu açıklar [24]. Doğrudan antimikrobiyal etkiye ek olarak, ROS konakçı molekülleri modifiye edebilir. Ek olarak nötrofil granüllerinde depolanan proteazlar, SLPI, SERPIN grubu gibi inhibitörlerinin oksidatif inaktivasyonu veya doğrudan oksidasyon yoluyla düzenlenebilir [25, 26].

2.1.6.4 NETs: Nötrofil Hücre Dışı Tuzakları

Nötrofiller stimülasyon sonucunda, dekonpanse kromatinlerinin hücre dışı boşluğa salınmasına yol açan aktif bir hücre ölümü formu olan NETosis gerçekleştirebilirler [27, 28]. NET olarak adlandırılan fibröz yapılar, histonların yanı sıra antimikrobiyal granüler ve sitoplazmik proteinler içerir [29]. NETs'lerin birçok patojen türünü ex vivo olarak hapsedtikleri çeşitli

hastalık modellerinde literatürde gösterilmiştir. NETlerin lokal olarak yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal moleküllere maruz bırakarak patojenleri elimine ettikleri düşünülmektedir [30]. Kimyasal ve biyolojik uyaranlara yanıt olarak NET oluşumu için NADPH oksidaz ve MPO gerekli olduğundan reaktif oksijenlerin varlığı söz konusudur [28, 31, 32]. NET oluşum aktivatörleri kullanılan çalışmalarda genellikle ROS üretiminin gerekliliği ortaya konmuştur. NADPH oksidazın yukarı yönde regülasyonunda, Raf-MEK-ERK yolu NET oluşumunda rol oynamaktadır [33] ancak süreç boyunca NE granüllerden çekirdeğe yer değiştirir ve histonları bozarak kromatin dekonkonsansiyonuna yol açmaktadır [34]. Ayrıca, NADPH oksidaz, MPO ve NE gibi NET oluşumu için önemli olan antimikrobiyal faktörler, nötrofil fonksiyonları için kritiktir. Öte yandan, bağışıklık sistemi enfeksiyonla savaşmak için birçok farklı mekanizmaya daha sahiptir ve NET'lerin, kolaylıkla fagosite edilemeyen büyük patojenlerden kaynaklanan enfeksiyonlar gibi belirli koşullar altında özellikle önemli olması mümkün gibi gözükmektedir.

NET'lerin konakçı üzerinde de zararlı etkileri olabilmektedir. NET'ler kendi moleküllerini hücre dışı olarak açığa çıkardıklarından, otoimmüniteye yol açmaktadırlar ve NET'ler, genellikle kromatin ve nötrofil bileşenlerine [35, 36] karşı otoantikor oluşumu ile karakterize olan bir otoimmün hastalık olan sistemik lupus eritematozus (SLE) ile ilişkilendirilmiştir. Sepsis sırasında oluşan platelet kaynaklı NET'ler doku hasarına bağlı hepatotoksisite ile ilişkilidir. Kistik fibroz hastalarının hava yolu sıvılarında da balgam viskozitesini artıracakları ve akciğer fonksiyonunu azaltabilen NET'ler gözlenmiştir [37]. Yapılan bir çalışmada ise eksojen NE inhibitörleri kullanılarak NET oluşumunun baskılanabileceği ortaya konmuştur. Bu da serin proteazların endojen inhibitörlerinin de NETosis'i benzer şekilde düzenleyebileceği sonucuna işaret etmektedir. Özellikle nötrofiller, çoklu serin proteaz inhibitörleri içerir [38, 39], ancak SERPINB1 ve sekretuar lökosit proteaz inhibitörünün (SLPI) rolleri, nötrofil fonksiyonu bağlamında en iyi bilinenlerdir [39, 40].

2.1.7. Nötrofilik Proteazlar ve İnhibitörlerinin Dengesi

Şiddetli inflamatuvar yanıt ile karakterize olan birçok solunum yolu hastalığında proteazlar ve bunların inhibitörleri arasındaki dengede bozulmalar oluşmaktadır. Nötrofil elastaz (NE) ve benzeri proteazların aşırı aktivitesinin doku hasarına neden olduğu ve pnömoni, solunum sıkıntısı ve akut akciğer hasarı gibi birçok klinik durumda havayolu yeniden yapılanması

sürecinin değiştiği bildirilmiştir. NE, nötrofil fonksiyonu için gerekli olan ve astım, sepsis, artrit gibi doku yaralanmalarına karşı inflamatuvar yanıtta yer alan fizyolojik proteolitik enzimlerden (serin proteazlar) biridir. Bunun yanı sıra birçok proteaz, hücre içi ve hücre dışı antibakteriyel veya antifungal aktiviteye sahiptir [41-43].

NE, hücre dışı matrise saldıran ve inflamasyonu ve doku yeniden şekillenmesini modüle eden yıkıcı bir elastazdır. Katılımı doğrudan (doku hasarı), dolaylı (proinflamatuvar veya proapoptotik) olabilir veya sadece lökosit aktivasyonunun bir belirteci olabilir. Yaralanmadan sonra oluşan doku hasarı ve yeniden şekillenme, proteazlar ve onların inhibitörleri arasındaki dengesizliğin bir sonucudur (Şekil 1) [44]. Çok sayıda çalışmada, farklı inflamatuvar doku hasarı modellerinde NE inhibitörlerinin (endojen veya sentetik) potansiyel terapötik rolünü araştırılmıştır. Bu bulguların kliniğe aktarılması bir zorluk olmaya devam etmektedir.

2.2. Serin Proteaz İnhibitör (SERPIN)

SERPİN ailesi proteaz inhibitörlerinin en büyük ve en geniş çapta dağılmış üyelerinden biridir. Ökaryotik çok hücreli canlıların tamamında serpinler mevcuttur [45]. Serpinlerin büyük çoğunluğu serin proteazları inhibe etmesine karşın kaspazları veya papain benzeri sistein proteazlarını inhibe eden serpinler de tanımlanmıştır [46, 47]. İnhibitör serpinler, reaktif merkez halkasında meydana gelen konformasyonel değişim sonucunda hedef proteaza geri dönüşümsüz bağlanarak işlevlerini yerine getirirler [48]. Proteazlar, hücresel stres gibi çeşitli sebeplerle granüllerden sitoplazmaya sızabilir, bu durumda proteaz inhibitörleri ilgili molekülün enzimatik aktivitesini baskılar ve istenmeyen hücresel hasarı önler. Serpinler proteaz inhibitörü işlevinin yanı sıra şaperon, hormon taşıyıcıları veya tümör baskılayıcıları olarak da işlev görürler [49, 50].

2.2.1. SERPINB1: Lökosit Elastaz İnhibitörü

SERPINB1 (kökenine göre farklı isimler alır: insan MNEI; fare elastaz inhibitörü, at ve domuz Lökosit elastaz inhibitörü), birçok hücre tipinde ifade olduğu gösterilmiş olmasına karşın, özellikle granülosit ve makrofajlarda bulunan bir nötrofil elastaz inhibitörüdür. SERPINB1 hem elastaz benzeri hem de kimotripsin benzeri proteazları iki farklı P1 (N terminal yönündeki parçalanmış amino asit) rezidusu yoluyla inhibe eder [47]. Bu serpin, plazminojen aktivatör inhibitörü 2 ve skuamöz hücreli karsinom antijenleri 1 ve 2 (SCCA1 ve SCCA2) ve maspin'leri de içeren Ov-serpin ailesine üyedir [51, 52].

SERPINB1 esas olarak intrasellüler bir proteindir ve öncelikli görevi hücreyi stres sırasında sitoplazmaya sızan proteazlardan korumaktır. Bu görüş, nötrofil canlılığında azalmaya sahip olan KO fareleri tarafından desteklenmekle birlikte hücrelerin kendi granüler proteazlarından koruması işleviyle tutarlıdır [53]. Bu işlev yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada miyeloid koşullu nakavt ve transgenik fareler kullanılarak nötrofil sağkalımı ile SERPINB1 seviyesi (farelerde B1a) arasındaki korelasyonu açıkça göstermektedir [54].

Bölünebilir bir hidrofobik sinyal sekansının olmaması, SERPINB1 esas olarak sitozolde konumlanan bir protein olmasına karşın akciğer inflamatuvar hastalıklarında bronkoalveolar lavaj sıvısında da saptanabilmektedir. SERPINB1'in kronik enfeksiyonlar sırasında, özellikle solunum yolu hastalıklarında hücre dışına salınan nötrofil elastazın kontrolü üzerindeki etkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır [55, 56]. Ayrıca SERPINB1'in insan nötrofil elastazın yanı sıra Granzim H, Katepsin G ve D ve Proteinaz-3'ün güçlü bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır [57]. Kimaz ve kimotripsin gibi diğer kimotripsin benzeri proteazların da SERPINB1 ile etkileşime girdiği bildirilmiştir [47].

SERPINB1 gen ifadesi baskılanan farelerin kullanıldığı çalışmalarda, SERPINB1'in patojen kaynaklı enfeksiyon sırasında akciğerde bulunan antimikrobiyal proteinlerinden konak hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynadığını ve nötrofil rezervlerinin dengesini sürdürmesindeki düzenleyici rolünü ortaya koymuştur [58]. Nötrofil serin proteazlar (NSP'ler) (elastaz, katepsin G ve proteinaz-3) istilacı patojenleri etkisiz hale getirmektedir [59]. Ancak bununla birlikte, akciğerlerdeki fazla sentezlenen NSP'ler, inflamatuvar akciğer hastalığında merkezi bir rol oynamaktadır. Enfeksiyon üzerinde, doğal fenotip (WT) ve SERPINB1-susturulmuş (KO) farelerde benzer erken cevapların, sitokin ve kemokin üretimi, nötrofil alımı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ancak, SERPINB1^{-/-} farelerde yapılan bir çalışmada, akciğere nötrofillerin yetersiz alımı nedeniyle bakterileri verimli bir şekilde temizleyemedikleri görülmektedir. Bunun sebebi ise bu hücreler, hücre dışı alanda daha kısa bir hayatta kalma ve sürekli pro-inflamatuvar sitokin üretimini tetikleyen nötrofil kaynaklı proteazların artan salınımı ile ilişkilendirilmektedir. Pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretiminin olumsuz etkisi, influenza virüsü aracılığıyla belirlenmiştir [53, 60]. SERPIN KO farelerine rekombinant SERPINB1 proteininin uygulanması, bakteri klirensini normalleştirdiği tespit edilmiştir, bu durum SERPINB1 tarafından pulmoner doğuştan gelen bağışıklığın düzenlenmesinin, konakçının patojene karşı yanıtında son derece önemli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlarla paralel olarak, farklı çalışmalar da SERPINB1'in aktif ülseratif kolitin yeni bir belirteci

olabileceğini ve hastaların bağırsak lümeninde ve bağırsak epitel hücrelerinde birikmesi nedeniyle inflamatuvar bağırsak hastalığının patogeneğinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [61]. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında SERPINB1'in inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

2.2.2. Lökosit Elastaz İnhibitör Türevi Endonükleaz: L-DNAz II

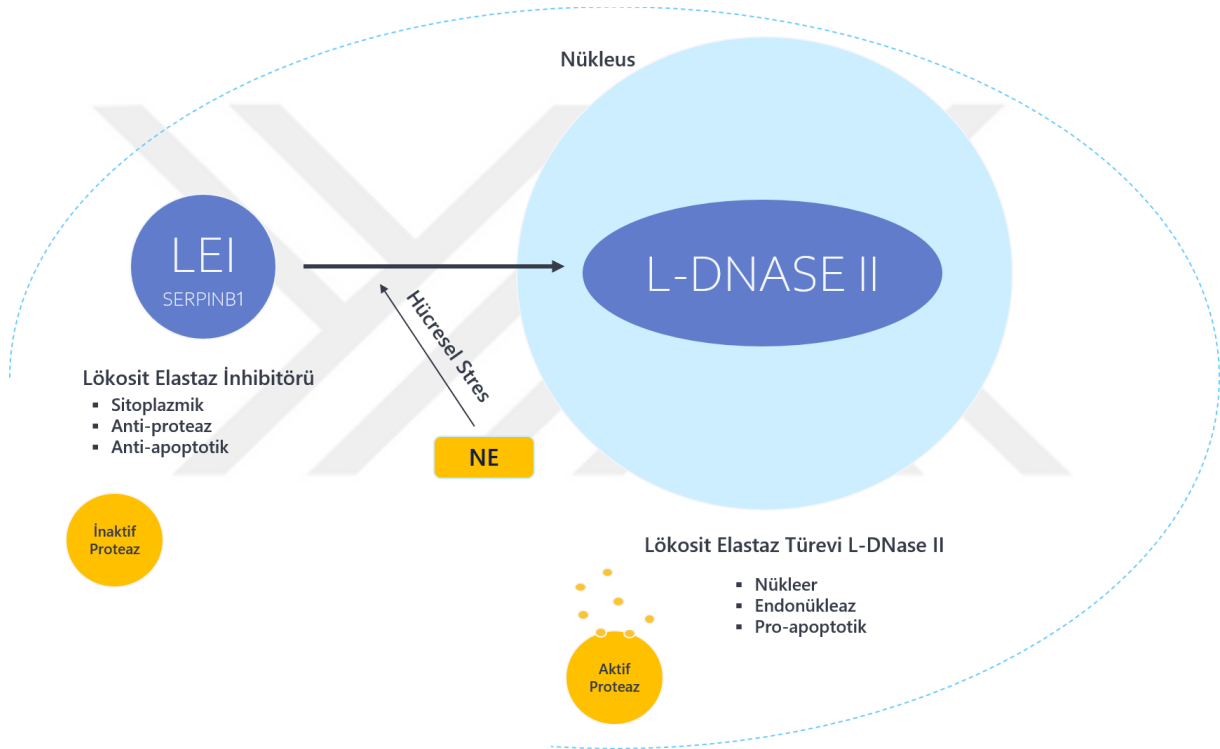
Lens hücre farklılaşmasının incelendiği bir çalışmada, bilinen endonükleazlar dışında farklı bir DNase II'nin varlığı ortaya konmuştur [62, 63]. Domuz dalağından saflaştırılmış DNase II'ye yönelik geliştirilen poliklonal antikorları kullanılarak, lens epitel hücrelerinde sitoplazmik bir lokalizasyona sahip molekülün lif hücrelerinin çekirdeklerinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir [64]. Veritabanlarından elde edilen dizilerle benzerliklerinin araştırılması, bu molekülün serpin ailesinin bir üyesi olan, lökosit elastaz inhibitörü (LEI), spesifik olarak ise SERPINB1 olarak adlandırılan protein ile %100 eşleştiği gösterilmiştir [65]. İlginç olarak 27 kDa'lık bir endonükleazın dizilemesi yapılmıştır fakat 42 kDa'lık bir anti-proteaz sekansı elde edilmiştir. Bunun sebeplerini inceleyen (teknik bir hata olmadığını kanıtlayan) literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır [26]. Çalışma sonuçları gözlenen farkın nedeni olarak post translasyonel modifikasyonları işaret etmektedir. Yeni konformasyona sahip bu proteine LEI'den türetilen bir DNase olduğu için L-DNase II adı verilmiştir.

2.2.2.1. LEI/L-DNase II'nin Moleküler Karakterizasyonu

LEI'nin elastaz ile etkisi, görünür moleküler ağırlığında bir azalmaya neden olmaktadır. Bu azalma, anti-proteaz aktivitesinin kaybı ve bir endonükleaz aktivitesinin ortaya çıkmasıyla ilişkilidir. LEI, enzimatik aktivitesini değiştirme konusunda geniş bir kapasiteye sahiptir. Serpin ailesinin çoğu üyesi gibi LEI de yarı kararlı bir proteindir ve anti-proteaz aktivitesi bununla ilişkilidir. Böylece, iyi tanımlanmış intihar/tek kullanımlık mekanizması aracılığıyla elastazın inhibisyonu, kesilmiş LEI formunu oluşturur [48, 66]. İlginç bir şekilde, ata ait LEI'nin üç boyutlu kristal yapısının analizi değerlendirildiğinde, RCL kutbunda daha yüksek sayıda pozitif yüke sahip oldukça polarize bir molekül olduğu açığa çıkmıştır. Bu, negatif yüklü DNA ile etkileşime girmek için gerekli bir koşuldur [48].

Endonükleaz aktivitesine özgü sekans için herhangi bir fikir birliği ortaya konulmasa da LEI üç boyutlu yapısının analizi sonucunda, daha pozitif yüklü bölgede bulunan iki histidine (H287 ve H368) işaret edilmektedir [66]. Bu histidinler, tüm türlerde korunduğu için aktif bölgede

önemli olmaya aday H368'e odaklanılmıştır. Bir çalışmada bu residue (H368A) üzerinde bir nokta mutasyonunun eklenmesi ile anti-proteaz aktivitesinin korunduğu ancak endonükleaz aktivitesinin kaybedildiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, RCL'nin ana beta tabakasının açığa çıkmasıyla, H368 ile ilgili önceden var olan bir endonükleaz aktif bölgesinin de bununla beraber ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca, aynı grup tarafından gerçekleştirilen bölge hedefli mutagenез çalışmaları, RCL bölgesinin endonükleaz aktif bölge ile aynı zamanda açığa çıkan ve daha sonra kesilen molekülün nükleer translokasyonuna izin veren bir çift taraflı nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) gizlediğini de göstermiştir [66]. LEI'nin enzim aktivitesinde ve hücresel lokalizasyonundaki değişimin moleküler bir modeli Şekil. 2.4 'te verilmiştir.



Şekil 2.4. LEI/L-DNase II'nin hücresel lokasyon değişiminin şematik olarak gösterilmesi.

DNA'nın hücre çekirdeğinde bulunması, genomik bilginin sitoplazmada bulunan süreçlerden ayrılmasına sağlar. Çekirdek ve sitoplazma arasındaki protein aktarımını kontrol etmenin genel yolu, bir NLS'nin (proteinin çekirdeğe girişine izin veren) ve bazı proteinlerde bir Nükleer Ekstrüzyon Sinyalinin (NES) mevcudiyetidir. NES, taşıyıcısını bağlayan üç veya dört hidrofobik residue içeren bir motiften oluşur: Crm1/exportin1. LEI'de Crm1'i bağlayan ve molekülün nükleer translokasyonunu sağlayan bir konsensus NES dizisi bulunmuştur [67].

LEI/SERPINB1, RCL'ye bağlı bir anti-proteaz aktivitesi ve kesilme ile açığa çıkan bir endonükleaz aktivitesi olmak üzere özünde iki enzimatik aktiviteye sahiptir [48]. Ek olarak,

konformasyonel değişiklik, proteinin çekirdeğe translokasyonuna izin veren çift taraflı bir NLS'yi de ortaya çıkarır.

2.2.2.2. Apoptoz ve LEI/DNAz II İlişkisi

Apoptozda görülen düzenli hücre parçalanması, proteolizi ve kromatin değredasyonunu içerir. DNA'nın oligonükleozomlarına ayrılması apoptozun karakteristik özelliği olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda DNazların araştırılması apoptoz çalışmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir [68]. Elde edilen sonuçlar, farklı apoptotik hücre ölümlerinde kaspaz aktivasyonu ve CAD (Kaspazla Aktive Edilmiş DNaz) dışında kalpainler, katepsinler ve granzimler dahil olmak üzere diğer proteazların aktivasyonunun da rol oynayabileceği gösterilmiştir [69]. Bu proteazların, doğrudan veya dolaylı olarak CAD dışındaki diğer endonükleazları aktive edebileceği literatürde gösterilmiştir Bugüne kadar, sadece GAAD (Granzyme A-Activated DNase) ve L-DNase II'nin aktivasyonu, proteazların aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir [70, 71]. AIF'nin (Apoptosis İndükleyici Faktör) salımı, DNA üzerindeki etkisinin DNA'yı parçalamak değil, kromatini yoğunlaştırmak olmasına rağmen, proteaz aktiviteleri (kalpainler) ile de ilişkili olmuştur [72].

2.2.2.3. L-DNase II'nin Pro Apoptotik Etkisi

L-DNase II keşfine giden yol lens hücrelerin farklılaşması sırasında çekirdek bozulmasıyla ortaya konmuştur. İlginç bir şekilde, farklılaşmış çekirdeklerin morfolojik değişiklikleri, apoptotik hücrelerin çekirdeklerine benzer olduğu görölmüştür [62]. Bu nedenle, L-DNase II'nin apoptoza katılımını araştırmak için çekirdekler saflaştırılarak rekombinant L-DNase II ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda DNA'nın oligonükleozomlarına ayrıldığı ve nükleer piknozun indüklendiği görölmüştür [65]. Metabolik strese yol açan indüktörler kullanıldığında enzimin nükleer translokasyonun gerçekleştiği bulunmuştur [73]. Bu koşullar altında LEI'nin aşırı ifadesi hücre ölümünü artırmaktadır. Genotoksik bileşiklerin ise L-DNase II'yi aktive etmediği ve bu koşullar altında LEI'nin aşırı ekspresyonunun, LEI kesilmesi ve L-DNase II oluşumundan kaynaklanan spesifik hücre ölümünü artırmadığı belirtilmektedir [74].

L-DNase II'nin aktivasyonu, retina gelişimi sırasında gerçekleşen nöral apoptozda [75] veya farklı hücre gruplarıyla yapılan çalışmalarda ve ayrıca kornea greft rejeksiyonu ve ışığa bağlı retinal dejenerasyon gibi patolojik durumlarda görölmüştür [73, 76, 77]. Çoğu durumda, bu yolun aktivasyonu, daha önce belirtildiği gibi, genotoksik hasarlarla değil, metabolik streslere

bağlı görünmektedir. L-DNase II çoğunlukla farklılaşmış hücrelerde veya kaspaz yolunu aktive edemeyen tümör hücrelerinde aktive edilmektir [78]. Farklı proteazlar (hücre içi elastaz, nötral proteazlar, katepsin D, bazı asit proteazlar) LEI'yi L-DNase II'ye dönüştürebilir [79-81]. Apoptoz benzeri hücre ölümü sırasında aktive olan diğer elastaz benzeri proteazların da L-DNase II'yi aktive edebildiği gösterilmiştir. Bu durum, AP-24 (apoptotik proteaz 24 kDa) veya diğer serin proteazlarda görülmektedir [82, 83].

2.2.2.4. LEİ Anti Apoptotik Etkisi

Ov-serpin ailesi ekseriyetle hücrel koruyucu protein ailesi olarak kabul edilir. B grubu serpinlerinin çoğu, hücre ölümüyle ilgili enzimleri düzenler. Bazıları lizozomal proteazları (skuamöz hücreli karsinom antijeni) düzenlerken bu ilenin diğer üyelerinin kaspazları inhibe edebildiği bulunmuştur. Bu Fas veya TNF- α ile indüklenen apoptozu inhibe eden viral serpin Crm A'nın durumudur [84]. Benzer şekilde, PI-9'un aşırı ekspresyonu, hücreleri granzim B kaynaklı apoptozdan korur [85]. B grubunun birçok üyesi proteaz salgılayan hücrelerde bulunduğundan, yukarıda belirtildiği gibi hücreleri yanlış yönlendirilmiş proteazlar tarafından kendi kendini yok etmekten korudukları öne sürülmüştür. Ek olarak, eksojen ov-serpinler, komşu hücreleri ve dokuları proteolitik hasardan koruyabilir. Buna paralel olarak, sıçanların hava yollarına verilen rekombinant LEI'nin nötrofil proteazların oluşturduğu akciğer hasarını önlemesi, bu proteinin inflamatuvar akciğer hastalıklarının tedavisinde aday molekül olarak düşünülmesine yol açmıştır [56]. Bu verilere ışığında, LEI'nin kendi doğal biçiminde anti-apoptotik özelliklere sahip olması şaşırtıcı değildir.

Etoposid kaynaklı apoptozda LEI'nin anti-apoptotik aktivitesinin temelini araştırıldığı bir çalışmada, bunun dolaylı olarak katepsin D'nin inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Etoposid ile uyarımın ardından katepsin D, lizozomal membran geçirgenliği (LMP) ile sitoplazmaya salınırken procaspaz-8'i parçalayarak bir kaspaz-8 aktivitesinin yüksek düzeyde artışına neden olur [81]. Bu yol, LEI aşırı ifadesi ile yavaşlatılabilmektedir. RCL bölgesinin ana beta tabakasının katlanmasını yavaşlatan ve katepsin D ile LEI arasındaki kovalent kompleksin stabilitesinde bir azalmaya yol açan bir mutasyon taşıyan AP10T-LEI mutantının hücre koruyuculuğunu ortadan kaldırdığı ortaya konmuştur. Bu sonuç, LEI'nin anti-proteaz aktivitesinin katepsin D'ye bağlanması için gerekli olduğunu göstermektedir [81].

LEI'nin her yerde farklı hücre ve dokularda ekspresyon seviyesi çok değişken olan bir proteindir. Yüksek seviyelerde LEI ifade eden dokular, bu proteini, IAP'ler (Apoptoz Proteini

İnhibitörleri) diğer kaspaz inhibitörleri ile birlikte kaspaz aktivitesini kontrol etmek için kullanabilmektedirler [86].

LEI/L-DNase II'nin pro- veya anti-apoptotik etkilerinin hem LEI'nin L-DNase II'ye moleküler dönüşümüne hem de bu moleküllerin diğer pro ve anti apoptotik yollarla ve bunların düzenleyici molekülleri ile etkileşimine bağlı olması muhtemeldir. LEI ve apoptoza dahil olan hücrel proteinler arasındaki protein-protein etkileşimlerinin taramasının gerçekleştirildiği bir çalışmada PARP-1, BCL-2 protein ailesi üyesi, AIF, Protein kinaz C ζ gibi moleküllerin LEI/L-DNase II düzenlemesine yönelik birkaç adaydan biri olduğu ortaya çıkmıştır [74].

2.3. Astım

Astım, dünya çapında her yaştan 300 milyondan fazla insanı etkileyen, küresel olarak ortaya çıkan en yaygın kronik hastalıklardan biridir. Aynı zamanda, gelişmekte olan birçok ülkede artan hasta yaygınlığı ve artan tedavi maliyetleri, toplum için ağır bir yük haline gelmekte ve bu nedenle astım ciddi bir küresel sağlık sorunu olmaktadır [87]. Sıklıkla nefes darlığı ve öksürük belirtileriyle ortaya çıkan astım hastalığı, yaşam kalitesini düşürmekle birlikte birçok diğer sağlık sorununu da beraberinde getirmektedir. Astım hastalığının ortaya çıkma sürecinde genetik faktörler etkili olabildiği gibi alerjenler gibi spesifik veya sigara dumanı, hava kirliliği gibi uyaranlar da hastalık durumunu tetikleyebilmektedir [88]. Akciğerde oluşan kronik inflamasyon sonucu ortaya çıkan astım durumu başta havayolu epitel hücreleri olmak üzere fibroblastlar, endotel hücreler, hava yolu düz kas hücreleri gibi farklı hücre tiplerini de etkilemektedir [89].

2.3.1. Astım Patofizyolojisi

Astım durumunun şiddetlenmesi, erken evre ve geç evre olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Erken evre, plazma hücreleri tarafından duyarlı hale getirilen ve salınan IgE antikorları tarafından başlatılmaktadır. IgE antikorları daha sonra yüksek afiniteli mast hücrelerine ve bazofillere bağlanır. Bir kirlitici veya risk faktörü solunduğunda, mast hücreleri sitokinleri serbest bırakır ve sonunda bu hücreler degranüle olur. Mast hücrelerinden salınan histamin, prostaglandin ve lökotrienler düz kas kasılması ve hava yolunun daralmasına neden olur. Th2 lenfositler ise diğer hücrelerle iletişime yardımcı olan ve inflamasyonu sürdüren farklı sitokinlerin (IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF) üretiminden sorumludur. IL-3 ve IL-5, eozinofillerin ve bazofillerin hayatta kalmasına yardımcı olurken, IL-13, havayolu yeniden yapılanmasına,

fibroza ve goblet hücrelerinde hiperplaziye yol açmaktadır. Geç evre ise inflamatuvar yanıtın ilerlemesine bağlı olarak ortamda immün hücre yoğunluğunun artmasıyla başlamaktadır. Bu evrede eozinofiller, bazofiller, nötrofiller ve T hücreler (yardımcı/hafıza) akciğerde lokalize olmaktadır. Mast hücreler ayrıca sitokin/kemokin gibi faktörler aracılığıyla geç evrede rol alan diğer immün hücrelerin, inflamasyon bölgesine göç etmesinde önemli rol oynamaktadır [90]. Bu göç hareketine bağlı olarak geç evrede, bronkokonstriksiyon ve inflamasyonun artışı gözlemlenmektedir. İnflamasyon ve bronkokonstriksiyonun bir sonucu olarak, hava yollarında meydana gelen tıkanıklık; solunum güçlüğüne sebep olmaktadır.

Hava yolu aşırı duyarlılığı astımın en belirgin semptomlarından bir tanesi olmakla beraber genellikle bu durum farklı uyaranlara karşı verilen kontrolsüz bir yanıtın sonucudur. Bu yanıt genellikle mast hücrelerinden salınan histaminde ve hava yolu düz kas kütlesinde artış ile ilişkilendirilmektedir. Hava yolu yeniden yapılandırılması, epitel hücrelerin mezenkimal hücre karakteri kazanarak, düz kas hücre kitlesini arttırmasıyla gerçekleşmektedir. Epitel hücreler, hücre yapışmasını sağlayan sıkı bağlantılarını ve bunu takiben fonksiyonel polaritelerini kaybederek mezenkimal hücre fenotipi göstermeye başlamaktadır. Ek olarak, eozinofil-mast hücre etkileşimi sonucunda, eozinofillerden TGF- β ve pro-inflamatuvar sitokin salımı hava yolu yeniden yapılandırılmasında etkilidir [90].

2.3.2. Astım Fenotipleri

Astım şiddeti, doğal seyri ve tedaviye yanıt verme açısından heterojendir ve bu heterojenlik astıma sebep olan farklı moleküler mekanizmaları yansıtmaktadır. Bu nedenle astım için uzun süredir devam eden bir yaklaşım, hastaları klinik, biyolojik ve fizyolojik özelliklerin gözlemlenebilir kombinasyonlarına dayalı olarak fenotipler halinde gruplandırmak olmuştur. Fenotipler kalıtsal ve çevresel etkilerin bir kombinasyonundan kaynaklanan gözlemlenebilir özellikler olarak tanımlanmaktadır. Çocuklukta başlayan alerjik astım, geç dönem başlangıçlı eozinofilik astım, nötrofilik astım, egzersize bağlı astım, obezite ile ilişkili astım ve aspirin ile şiddetlendirilmiş solunum hastalığı gibi klinik olarak önerilen birkaç farklı astım fenotipi vardır. Fakat GINA 2021 raporunda, yaygın olarak görülen astım fenotipleri “alerjik astım, alerjik olmayan astım, geç dönem başlangıçlı astım, obezite ilişkili astım ve kalıcı hava akımı sınırlandırılması olan astım” olarak belirtilmektedir [91]. Alerjik astım kolay teşhis edilebilen bir astım fenotipi olmakla birlikte bu fenotipte balgamda ya da kanda eozinofilik biyobelirteçlere rastlanmaktadır. Alerjik astımın tedavisi genellikle solunan kortikosteroidler ile yapılmaktadır. Alerjik olmayan astım fenotipindeki hastaların balgamında nötrofilik veya eozinofilik

biyobelirteçler bulunabilirken, bu hastaların kortikosteroide verdikleri yanıt düşük seviyede kalmaktadır. Geç başlangıçlı astım hastaları alerjik reaksiyon göstermeme eğilimindedirler. Bazı obezite hastalarında belirgin solunum semptomları ve eozinofilik hava yolu inflamasyonları gözlemlenmektedir ve bu durum obezite ilişkili astım fenotipini ortaya çıkarmaktadır. Kalıcı hava akımı sınırlaması olan astım fenotipinde ise astımın neden olduğu havayolu yeniden yapılandırılması kalıcı olarak hava akımı sınırlamasına neden olmaktadır [91].

2.3.3. Nötrofilik Astım

Astımlı hastaların yaklaşık %50'sinde Th2'ye bağlı eozinofilik astım bulunurken, kalan %50'sinde nötrofilik ve pausigranülositik alt tiplere ayrılabilen eozinofilik olmayan astım fenotipleri bulunmaktadır. Eozinofilik astım, astımın iyi karakterize edilmiş klinik fenotiplerinden biridir fakat, nötrofilik astım fenotipi henüz eozinofilik astım fenotipi kadar iyi karakterize edilememektedir. Nötrofilik astımı olan hastaların balgamında %40 ila %76 arasında değişen yüksek nötrofil sayısı görülmektedir. Balgamda artan nötrofiller şiddetli kalıcı astımın belirteci olabildiği gibi, saniyedeki düşük ve zorlu ekspirasyon hacmi (FEV1), sabit hava yolu obstrüksiyonu ve brokodilatör sonrası FEV1 ile ilişkilendirilmiştir [90, 91].

Nötrofilik astım eozinofilik astıma göre daha zor teşhis ve düşük yaşam kalitesine yol açan zor bir endotiptir. Nötrofilik astımı olan hastaların bir kısmı, yüksek doz kortikosteroidlere ve yeni tanıtilan eozinofilik astım endotipi için hedeflenen biyolojik ilaçlara yeterli yanıt verememektedir. Nötrofilik astım profiline ait biyobelirteçler günümüzde hala net olarak belirlenemediği için, hastalık teşhisi ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri bu alanda yetersiz kalmaktadır. Genel olarak, nötrofilik hava yolu inflamasyonunun ortaya çıkmasının patobiyolojisi henüz tam olarak anlaşılmamış olmasına karşın Th1 ve Th17 hücrelerinin aktivasyonu bu tip astımla bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Th17 sitokinlerinden olan ve artan düzeyde salgılanan IL-17A ve IL-17F nötrofilik astım fenotipinde önemli rollere sahiptir. Ayrıca Th17 hücreleri tarafından salgılanan CXCL1 ve CXCL8 ortama daha fazla nötrofil çağrılmasına neden olur. Hava yollarında artan nötrofiller çok sayıda inflamatuvar sitokin salınmasına (TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi), lokal doku hasarına, hava yolunun yeniden şekillenmesine ve bronko-konstriksiyona yol açar. Nötrofilik astımda hava yolu aşırı duyarlılığı, nötrofillerin aktivasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu süreç, hava yolunun yeniden şekillenmesi, subepitelyal fibrozis ve düz kas kütlesinde artışı takiben daha da şiddetlenmektedir [90].

Alerjen maruziyeti sonrasında, dentritik hücreler gibi antijen sunan hücreler alerjeni fagosit ederek naif T hücrelerinin Th1 veya Th17 hücrelerine farklılaşmasını uyarmak için peptitler haline getirir. Th1 hücrelerinden salınan IFN- γ ve TNF- α gibi faktörler bronşlarda havayolu aşırı duyarlılığı, bronko-konstriksiyon ve düz kas hücre hiperplazisini indükleyebildikleri gibi, nötrofil fonksiyonuna da katkıda bulunur. Bunun yanı sıra yine bu hücrelerden üretilen IFN- γ mast hücrelerinden histamin, prostaglandin ve lökotrien salımını uyatarak hastalık profiline etki eder. İnflamasyonun gerçekleştiği bölgedeki epitel ve diğer bazı immün hücreler tarafından üretilen IL-8 ve TNF- α ise bölgeye nötrofil göçünü sağlar [90].

2.3.4. Nötrofiller ve Havayolu Epiteli İlişkisi

Nötrofilik astım durumunda, nötrofiller NET'ler sayesinde patojenleri elimine edebilecek koruyucu bir rol oynamakla birlikte salgıladığı pro-inflamatuvar sitokinler (IL-8, TNF- α) ve nötrofil elastaz ve proteinaz-3 gibi bazı proteinlerle epitel hücre hasarına neden olabilirler [92]. Genel olarak bakıldığında nötrofiller, pulmoner enfeksiyon sırasında ilk savunma hattını oluşturur ve ürettikleri bir dizi faktör patojenleri hedef alarak ortadan kaldıracaktır [93]. Bunun yanı sıra nötrofiller, monositleri ve makrofajları enfeksiyon bölgesine çeken kemotaktik faktörleri ve önceden oluşturulmuş granül proteinleri serbest bırakarak inflamasyona katkı sağlar [94].

Nötrofiller, hava yollarının yeniden yapılandırılmasına bağlı hava yolu daralması, nötrofil elastazın aracılık ettiği aşırı mukus salgılanması [95], hava yolu düz kas kütlesinde artış [96] ve akciğer fonksiyonunda düşüş [97] dahil olmak üzere hava yolları üzerinde olumsuz etkiler gösterebilir. Hava yolu yeniden yapılandırılması genellikle astım hastalarında artan hava yolu inflamasyonu sonucunda meydana gelmektedir [98]. Hem yapısal hücreler hem de inflamatuvar hücreler tarafından salınan faktörler, hava yolunun yeniden yapılandırılmasında rol oynar. Örnek olarak TGF- β , nötrofiller de dahil olmak üzere astımlı hava yolundaki çoklu hücre tipleri tarafından üretilen bir faktördür ve astımda hava yolu yeniden yapılandırılması ile en çok ilişkilendirilen pro-fibrotik sitokindir [99]. Periferik kanda bulunan nötrofiller, hem astım hastalarında hem de sağlıklı kontrollerde yapısal olarak TGF- β eksprese ederken, astım hastalarında bu üretim daha fazladır [100]. Hava yolunun yeniden yapılandırılması, nötrofiller tarafından oluşturulan matriks metaloproteaz-9 (MMP-9) [101] ve elastaz [102] tarafından da desteklenebilir. Nötrofil elastaz, hava yolu epitel hücrelerinden IL-8 üretimini artırarak, hava yollarına nötrofil göçüne katkıda bulunur ve bu sayede mevcut inflamatuvar yanıtı artırıcı rol oynar. Nötrofil elastaz seviyesinin akciğer fonksiyonu ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir

[103]. Nötrofil elastaz enzimi ayrıca MMP-9'u inhibe eden protein olan TIMP metallopeptidaz inhibitörü 1 (TIMP-1) inaktive etme yeteneğine de sahiptir [104]. Proteaz (MMP-9)/antiproteaz (TIMP-1, SLPI) seviyelerinde bir dengesizlik, MMP-9 ve nötrofil elastaz gibi proteazların kalıcılığı ve düşük antiproteaz seviyeleri ile karakterize edilen astım patogenezinde rol oynar [105, 106]. Epitel bariyer fonksiyonu, hava yollarında artan nötrofil yükünden de etkilenebilir. 2017 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, nötrofillerin şiddetli astımı olan hastaların hava yollarındaki epitel bariyer fonksiyonunu etkileyen bazı sitokinlerin ana kaynağı olduğu gösterilmiştir [107].

2.3.5. Nötrofillerin Astım Patolojisindeki Rolü

IL-8 ve TNF- α , astım durumunda akciğerdeki inflamasyon bölgesine nötrofil göçünü sağlamakta görevli sitokin ve kemokinlerdir. Nötrofilik astımda, inflamasyon bölgesine gelen nötrofiller, akciğerlerdeki ilk antibakteriyel savunma hattıdır. Nötrofiller patojenleri ortadan kaldırmak için antimikrobiyal faktör genlerinin ekspresyonunu artırarak nötrofil hücre dışı tuzaklara (NET) antimikrobiyal peptitler yerleştirirler ve NET'leri hücre dışı boşluğa bırakırlar. NET'ler nötrofil DNA'sını içerir ve histonlar ve antimikrobiyal peptitler dahil olmak üzere antimikrobiyal faktörlerle kaplanarak patojen yayılmasına karşı fiziksel ve biyolojik engeller olarak işlev görürler [108]. Nötrofillerden salınan bu NET'ler sayesinde patojenlerin yayılması önlenir. Salınan antimikrobiyal peptitler astım durumunda akciğer için koruyucu bir rol üstlenirse dahi bölgeye gelerek aktifleşen nötrofillerden pro-inflamatuar sitokinler ve bazı proteinlerin salınmasıyla akciğer dokusu zarar görebilmektedir. NET oluşumu proinflamatuar sitokinler tarafından da kolaylaştırılır ve NET'ler patojen eliminasyonuna katılırken astım ve KOAH gibi hava yolu hastalıklarını da şiddetlendirebilir. Yapılan çalışmalar NET'leri hem astımda hem de KOAH'ta hava yolu obstrüksiyonu ile ilişkilendirmiştir [109, 110].

Nötrofilik astım durumunda Th17 ve Th1 hücreleri tarafından üretilen IL-17A ve IL-17F, nötrofillerde ROS faktörü, MMP-9 proteaz, elastaz ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu faktörler astım hastalarından alınan bronş alveolar lavaj örneklerinde ve biyopsilerinde fazla miktarda tespit edilmektedir ve akciğer fonksiyonunun kötüleşmesi, bronşiyal epitel bozulmaları ve amfizem benzeri durumun oluşumu ile ilişkilidir. Proteaz üretimine ek olarak, aktive edilmiş nötrofiller proteaz inhibitörleri olan TIMP-1 ve SLPI'yi serbest bırakabilir. Proteazların ve onların inhibitörlerinin bu şekilde düzensizliği, solunum yollarının yapısal bozukluklarına katkıda bulunur ve sonuç olarak, ana astım özelliklerinden biri olan bronşiyal obstrüksiyona yol açar [92].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan insan bronş epitel hücre hattı BEAS-2B (Katalog no. CRL-9609) American Type Cultural Collection firmasından ticari olarak satın alınmıştır. Hücre büyüme ortamı olarak BEBM bronş epitel hücre büyüme ortamı ve Tripsin Nötralizasyon Solüsyonu (Katalog no. CC-5002) Lonza (İsviçre), DMEM ortamı Gibco (ABD) ve retinoik asit çözeltisi Sigma (ABD) firmalarından temin edilmiştir. FBS (S181H-500) Biowest (Fransa), Tripsin/EDTA çözeltisi (Katalog no. 25200-056) Thermo Fisher (ABD) firmasından ve penisilin/streptomisin (P/S) çözeltisi (Katalog no. PS-B) Capricorn Scientific (Almanya) firmasından satın alınmıştır. PBS (Katalog no. A9162) ve DMSO (Katalog no. A3672) AppliChem (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Trypan Blue (Katalog no. 15250061) Thermo Fisher (ABD) firmasından satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 96, 24 kuyucuklu ve 75 cm², 175 cm²'lik hücre kültür kapları ile floresan ölçümler için kullanılan siyah altı şeffaf 96 kuyucuklu plakalar ise Greiner (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücrelerde apoptozun uyarılması için kullanılan Nötrofil Elastaz (Katalog no. ab91099) Abcam firmasından temin edilmiştir. Nötrofil elastaz aktivite ölçümü için kullanılan N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide substratı (Katalog no. S4760) Sigma (ABD) firmasından temin edilmiştir. Epitel hücrelerinin farklılaştırılması için kullanılan 24 mm ve 6,5 mm 0,4 µm çaplı pora sahip transwell malzemesi Corning (ABD) firmasından satın alınmıştır.

Hücre canlılığı ve sitotoksite tespiti için kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) difeniltetrazolyum bromür) (Katalog no. M2128) Sigma (ABD) ve Propidyum iyodür/akridin oranj boyası (Katalog no. 30002) Biotium (ABD) firmalarından temin edilmiştir. LDH ölçümü için kullanılan kit LDH-Cytox™ Assay Kit, Biolegend (Katalog no.426401) firmasından tedarik edilmiştir. Mitokondriyal transmembran potansiyeli JC-1 -Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Katalog no. ab113850) Abcam firmasından temin edilmiştir.

Spektrofotometrik ve floresan ölçümler için Perkin Elmer firmasının (ABD) Multimode Plate Reader cihazı kullanılmıştır. Floresan görüntü çekmek için Thermo Fisher firmasının (ABD) EVOS FLoid floresan mikroskobu kullanılmıştır. Hücrelerden gen ifadesi analizi için kullanılan RNA izolasyon kiti ve Revertaid cDNA Sentez Kit, Thermo Fisher (ABD) firmasından temin

edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR deneyleri için Thermo Fisher marka Power SYBR Green PZR kiti Applied Biosystems 7500 Fast RT-PCR cihazı kullanılmıştır. Sitozol ve nükleer fraksiyonlama uygulaması için Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Katalog no. 78840) Thermo Fisher (ABD) firmasından temin edilmiştir. DNA Fragmentasyon analizinde pozitif kontrol olarak kullanılan topoizomeras inhibitörü Kamptotesin (Katalog no.1100) Tocris firmasından tedarik edilmiştir. Kaspaz ölçümü için Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 Multiplex Activity Assay Kit (Fluorometric) (Katalog no. ab219915) Abcam firmasından satın alınmıştır. İmmünofloresan analiz için kullanılan primer antikorlar: Recombinant Anti-SERPINB1/PI2 antibody (Katalog no. ab181084) Abcam firmasından ve SerpinB1 Antibody (4D7) (Katalog no. sc-293462) Santa Cruz Biotechnology satın alınmıştır. Sekonder antikorlar: m-IgGκ BP-CFL 488 (Katalog no. sc-516176) Santa Cruz Biotechnology firmasından; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (Katalog no. ab150080) ise Abcam firmasından tedarik edilmiştir. Protein ölçümleri için kullanılan Human IL-6 DuoSet ELISA (Katalog no: DY206-05) Human IL-8 DuoSet ELISA (Katalog no: DY208-05), Human GM-CSF DuoSet ELISA (Katalog no: DY215-05), Human TNF-α ELISA (Katalog no: 3512-1H-6) sırasıyla R&D ve Mabtech firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Nötrofil Elastaz (NE) Aktivite Ölçümü

Hava yolu epitel hücrelerinin uyarımında kullanıla NE enziminin aktivitesini ölçmek için susbratı olan Succinyl-alanyl-alanyl-alanyl-p-nitroanilide (SLAPN) kullanılmıştır. SLAPN; serin endopeptidaz, pankreatik elastaz ve kimotripsin benzeri serin proteazların aktivite ölçümünde rutin olarak kullanılan kromojenik bir substrattır. Bir ünite elastaz dakikada 1 µmol Succinyl-alanyl-alanyl-alanyl-p-nitroanilide'ni hidroliz edebilmektedir. Bu analiz yüksek oranda tekrarlanabilir ve birçok kolorimetrik analiz gibi, 30 dakika ve daha kısa sürede sonuç alınabilen etkili bir yöntemdir [111].

Ticari olarak satın alınan substrat 0,05 M Tris HCl solüsyonunda 2,5 mg / ml olacak şekilde çözünmüştür.

- Temiz bir ependorf tüpüne 1,25 µl Nötrofil Elastaz (0.05 ünite) ve 150 µl hazırlanan substrat solüsyonundan eklenmiştir.
- 96 kuyucuklu plaka içerisine 200 µl (150 µl substrat solüsyonu/ 50 µl Nötrofil Elastaz) substrat ve enzim karışımı konulmuştur.
- 410 nm'de 5'er dakikalık periyotlarla 7 ölçüm yapılmıştır.

Sürekli spektrofotometrik analiz aşağıdaki reaksiyona dayanır:



SucAla3-pNA = N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide

SucAla3 = N-Succinyl-Ala-Ala-Ala

pNA = p-Nitroanilide

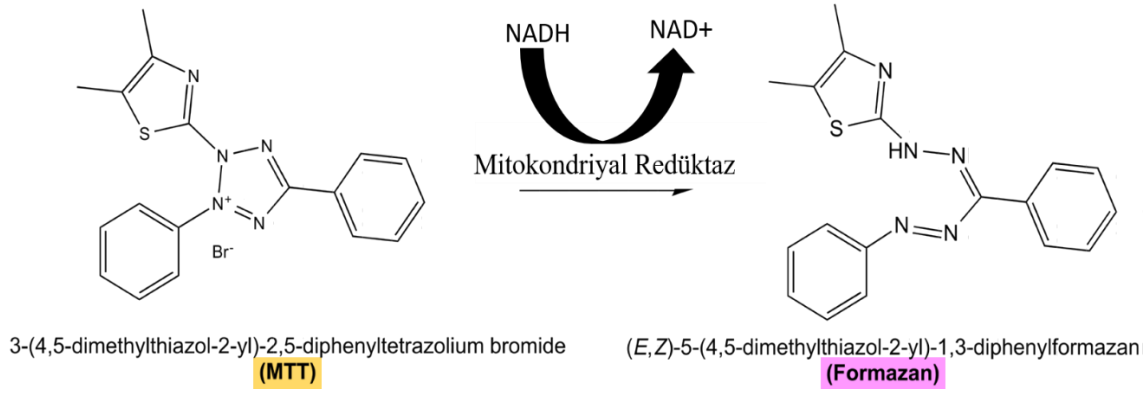
3.3. BEAS-2B (Bronşiyal Epitel Hücre Hattı) Hücrelerinin Çoğaltılması

BEAS-2B hücreleri 75 cm² flaskta %80 konfluent (yüzey kaplama oranı) olana kadar 0,5 mg/mL hidrokortizon , 5 mg/mL insülin , transferrin (10 mg/mL), epinefrin (0,5 mg/mL), triiodotironin (6,5 mg/mL), gentamisin (50 mg/mL), amfoterisin-B (50 mg/ mL), retinoik asit (0,1 ng/mL), EGF (epidermal growth factor, 0,5 ng/mL human recombinant), BEGM (Lonza, Clonetics) besiyeri içerisinde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler tripsinize edilip thoma lamında sayıldıktan sonra hücre canlılığı ve sitotoksosite deneyleri için plakalara alınmıştır. 96 kuyucuklu plaka üzerine 1,5x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Hücreler 37 °C 'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

3.4. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi

3.4.1. MTT Testi

Metabolik aktivite ölçümüne dayalı yöntem, mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] adı verilen bir tetrazolium tuzunu substrat olarak kullanarak formazan kristallerine dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan kristaller dimetil sülfoksit (DMSO) veya asitli izopropanolle çözülür. Mor renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometre kullanılarak, 570 nm dalga boyunda ölçülür. MTT metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki (enzimler ile parçalanacağından elde edilen absorbans değerleri canlı hücre oranlarıyla ilgili bilgi vermektedir [112].

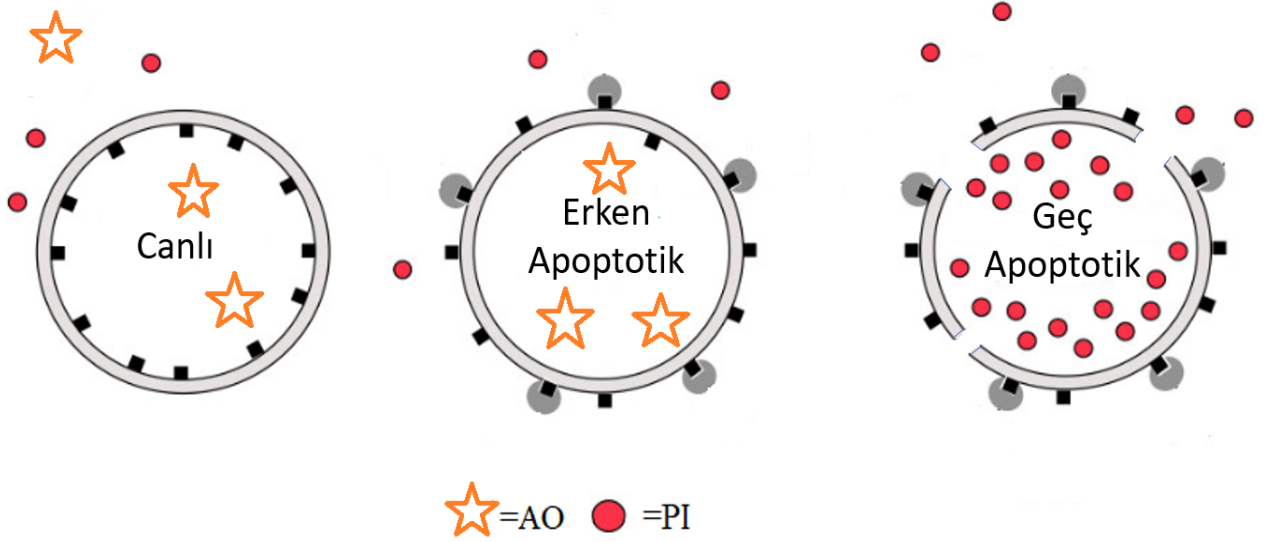


Şekil 3.1. Mitokondriyal dehidrogenaz enzimiyle MTT tetrazolium halkasının parçalanması ve mor renkli formazan kristalinin oluşumu.

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl'de 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Bir sonraki gün hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılmış ve belirlenmiş doz/zamanlarda NE ile uyarılmıştır.
- İnkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl besiyeri konulmuştur.
- Hücrelerin üstüne 10 µl MTT (5 mg/ml) solüsyonundan eklenmiştir.
- Hücreler 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiş, besiyeri uzaklaştırılmış ve 100 µl DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.
- Plaka okuyucuda 570 nm'de absorbans okunmuş ve yüzde canlılık hesaplanmıştır [113].

3.4.2. Propidyum İyodür /Akridin Oranj (PI/AO) İkili Floresan Boyama

Akridin oranj ve propidyum iyodür boyama yöntemi floresan özellikteki iki boya vasıtasıyla canlı, erken-geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayırt edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Akridin oranj (AO) ve Propidyum İyodür (PI) DNA'ya interkale olarak sırasıyla turuncu ve yeşil floresan ışımaya yayan nükleik asite özgü florokrom boyalardır. Bu boyalardan AO sadece canlı ve erken apoptotik hücrelerin plazma zarından geçebilirken, PI membran bütünlüğü bozulmuş geç apoptotik ve/veya sekonder nekrotik hücrelerin membranından geçebilmektedir [114].

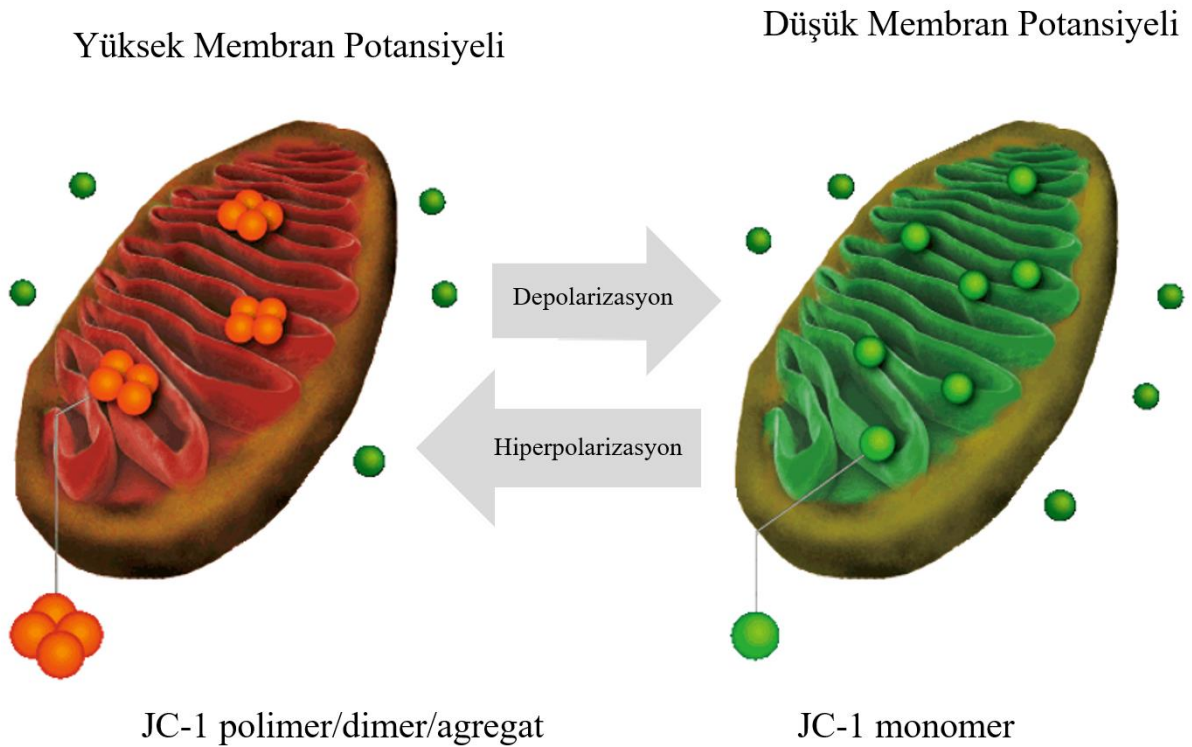


Şekil 3.2. AO/PI ikili floresan boyamasının şematik olarak çalışma prensibinin gösterilmesi.

- 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µl'de 4×10^4 olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.
- %70 konfluent olan hücreler 6, 3 ve 1 saat boyunca 5, 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 nM NE ile muamele edilmiştir.
- Hücreler %5 CO₂ ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Uyarım sonunda hücreler PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- Hücreler PBS içerisinde 1:6 oranında seyreltilen 1 µg/mL AO ve 6 µg/mL PI karışımı ile oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon sonunda boya uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl PBS eklenmiştir.
- Floresan mikroskop altında görüntüleme yapılmıştır.

3.4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Ölçülmesi

Mitokondriyal Membran Potansiyeli ölçümü için JC-1- Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Abcam) kullanılmıştır. Programlanmış hücre ölümü erken evrelerinin ayırt edici özelliği mitokondrinin bozulmasıdır. Reaktif oksijen türleri gibi faktörlerin zamanla artmasıyla membran potansiyeli değişmektedir. Bu değişim sitokrom c ve AIF gibi apoptotik yolaktaki moleküllerin sitozele salınması sağlamaktadır. Membran geçirgen olan floresan JC-1 boyası, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri izlemek için apoptoz çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. JC-1 boyası, mitokondride potansiyele bağlı farklı yapılarda (monomer ve agregat) birikim sergilemektedir. Yüksek membran potansiyelinde JC-1 boyası dimerik/agregat yapı gösterirken düşük membran potansiyelinde monomerik yapısı gösterir. Bu nedenle, agregat sayısında azalma depolarizasyonun (hasarlı hücrede) göstergesi iken, artış hiperpolarizasyonun (sağlıklı hücrede) göstergesidir [115].



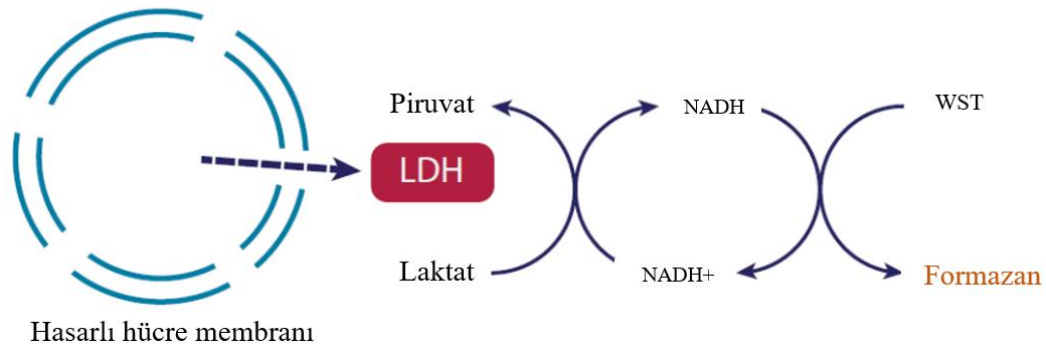
Şekil 3.3. Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümünde kullanılan JC-1 boyasının monomerik ve dimerik yapılarının floresan mikroskop görüntüleri.

- Hücreler siyah 96 kuyucuklu plakaya 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. İlave olarak boyanmayan kontrol hücre grubu da ekilmiştir.
- Her bir kuyucuk 100 μ l 1x PBS ile yıkanmıştır.

- Hücrelerin üzerine 100 µl PBS içerisinde 1 µM JC-1 boyası olacak şekilde hazırlanan karışım eklenir ve 10 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir.
- Hücreler 100 µl 1x PBS ile 2 kere yıkanmıştır.
- Farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile muamele edilmiştir. (Pozitif kontrol olarak kullanılan FCCP uyarımının son 1 saati ilave ekilen kuyucuklara uygulanmıştır)
- Plaka okuyucuda 475 ± 20 nm ve 530 ± 15 nm’de ölçüm yapılmıştır.

3.4.4. Laktat dehidrogenaz (LDH) testi

LDH ölçümünde LDH-Cytox™ Assay Kit (Biolegend) kullanılmıştır. LDH (laktat dehidrogenaz) tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir proteindir. Hücreler sitotoksik ajanlara veya hücresel strese sebep olan diğer faktörlere maruz kaldığında plazma membranı zarar görerek LDH dışarı salınmaktadır. LDH, laktatın piruvata dönüşümünü katalize ederek NAD^+ ’ı NADH ’ye indirir. NADH , bir elektron alıcısı varlığında suda çözünerek tetrazolyum tuzunu, turuncu renkte formazan kristaline dönüştürmektedir. Bu analiz sonucunda supernatana salınan LDH’nin aktivitesi ölçülerek canlılık tayini yapılmıştır [116].



Şekil 3.4. LDH yönteminin çalışma prensibinin şematik olarak gösterilmesi.

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl’de 2×10^4 hücre olacak şekilde uyarım ve pozitif kontrol için ekim yapılmıştır.
- Farklı konsantrasyonlarda hücreler nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. (Uyarımın son 30 dakikasında 10 µl LDH Kontrolü/Lizis Buffer boş bir kuyucuğa eklenmiştir)
- İnkübasyon sonunda her bir kuyucuktan 50 µl besiyeri alınarak yeni bir plakaya konulmuştur.
- Ayrı bir plakaya alınan besiyeri üzerine 100 µl çalışma solüsyonu eklenerek 30 dakika inkübe edilmiştir.

- İnkübasyonun sonunda 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Plaka okuyucuda 490 nm’de ölçüm yapılmıştır.

3.4.5. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 Aktivite Ölçümü

Hücrelerde, apoptozda rol oynayan ana kaspazların aktivasyonunu belirlemek için kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 Multipleks Aktivite ölçüm kiti (Abcam) kullanılmıştır.

Florojenik indikatör olarak Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 için sırasıyla DEVD-ProRed™, IETD-R110 ve LEHD-AMC kullanılır. Kaspazların kesilmesi ile ProRed™ (kırmızı floresan), R110 (yeşil floresan) ve AMC (mavi floresan) olmak üzere üç ayrı florofor serbest bırakılır. Bu spektral ayrışım sayesinde 3 farklı kaspazın aktivitesinin aynı anda ölçümü sağlanır.

- Siyah altı şeffaf 96 kuyucuklu plakalarda tutunan hücreler için kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde 2×10^4 hücre ekilmiştir. 24 saat sonra belirtilen doz ve sürelerde uyarım yapılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde kaspaz analiz solüsyonu eklenmiştir. (Kaspaz substratları 1:200 oranında analiz tamponu ile sulandırılmıştır)
- Plaka 30 dakika 37°C’de karanlıkta inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonucunda aşağıda belirtilen dalga boylarında floresan okuma yapılmıştır.

Kırmızı: Eksitasyon / Emisyon = 535/620 nm (Kaspaz-3)

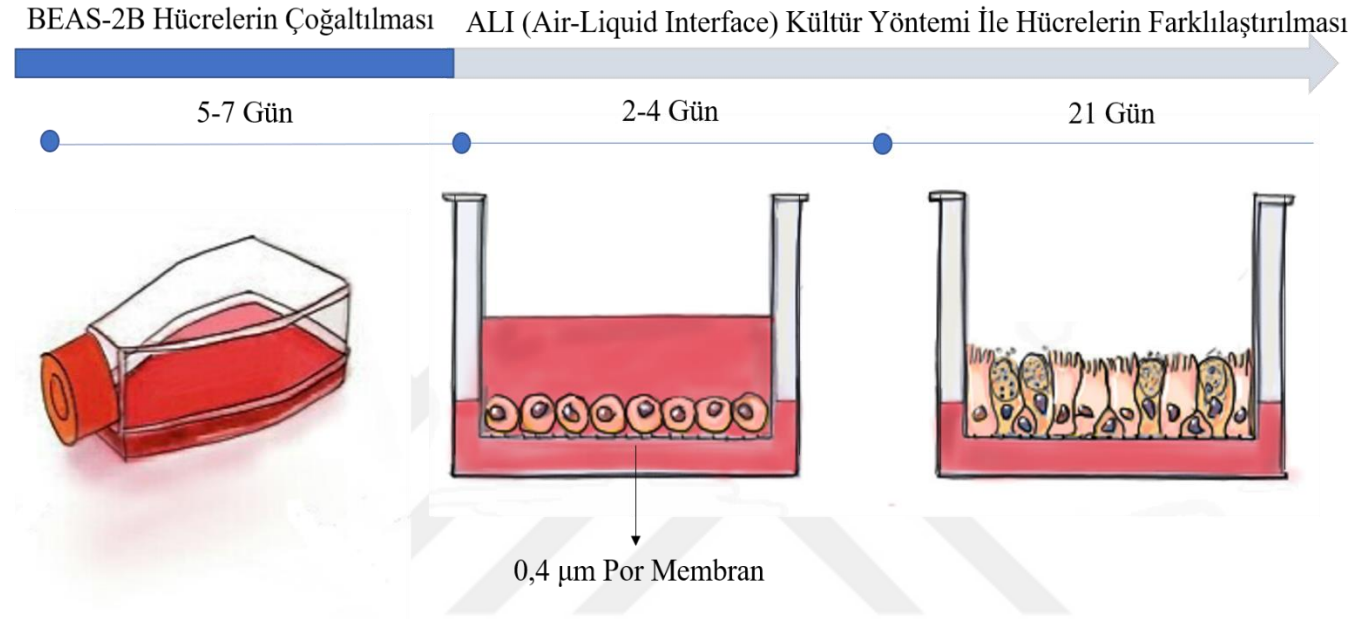
Yeşil: Eksitasyon / Emisyon = 490/525 nm (Kaspaz-8)

Mavi: Eksitasyon / Emisyon = 370/450 nm (Kaspaz-9)

3.5. Air Liquid Interface (ALI) Kültürü Yöntemiyle BEAS-2B Hücrelerinin Farklılaştırılması

BEAS-2B hücreleri ALI kültürü için 75 cm² flaskta %80 konfluent (yüzey kaplama oranı) olana kadar BEGM (Lonza, Clonetics) besiyeri içerisinde çoğaltılır; tripsinize edilip thoma lamında sayıldıktan sonra $0,7 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hydrocortisone (0,5 mg/mL), insülin (5 mg/mL), transferrin (10 mg/mL), epinephrine (0,5 mg/mL), triiodothyronine (6,5 mg/mL), gentamycin (50 mg/mL) ve amphotericin (50 mg/ mL), retinoic acid (0,1 ng/mL), EFG (epidermal growth factor, 0,5 ng/mL) içeren B-ALI growth besiyeri içerisinde 0,4 µm porlara sahip 6,5 mm ve 24 mm olmak üzere iki farklı boyuttaki transwell insert üzerine yayılır.

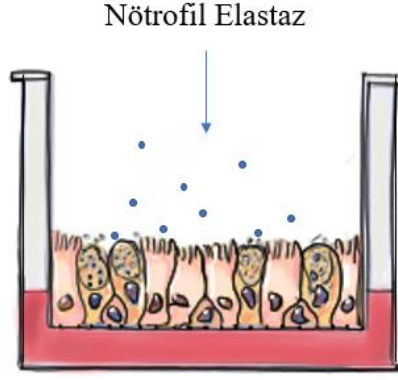
Hücreler başlangıçta bu besiyeri içerisinde her 2 günde bir besiyeri değiştirilerek 3-4 gün inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerindeki ve alt çemberdeki besiyeri uzaklaştırılır. Alta 25 μ M retinoik asit içeren 1:1 oranında BEGM:DMEM besiyeri konulduktan sonra üste besiyeri koymadan hücrelerin hava ile teması sağlanarak ve 37 °C 'de %5 CO₂ ortamında alt çemberdeki besi yeri 2 günde bir değiştirilerek hücreler inkübe edilir.



Şekil 3.5. BEAS-2B hücreleri için ALI kültür yöntemi.

3.6. Hücrelerin Belirlenen Doz ve Sürede Nötrofil Elastaz ile Uyarılması

Nötrofiller epitel hücrelerin hem apikal hem de basolateral yüzeyinde bulunmaktadır. Bu nedenle 21 gün boyunca farklılaştırılan BEAS-2B hücreleri hem bazal hem de apikal yüzeyden 10 ve 25 nM nötrofil elastazla uyarılmıştır. Daha sonra hücre lizatları toplanarak RNA ve protein izolasyonları yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak topoizomerez inhibitörü olan kamptotesin kullanılmıştır (20 μ M -1 saat).



Şekil 3.6. Farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin nötrofil elastaz ile uyarılması.

3.7. RNA İzolasyonu

- Hücreler %1 β -Merkaptoetanol ilave edilmiş 350 μ l RLT tamponu ile pipetle çekip bırakmak suretiyle parçalanmıştır.
- Üzerine DEPC su ile sulandırılmış 350 μ l %70 etanol ilave edilmiştir. Daha sonra 2 ml'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan kolon üzerine pipetlenmiştir.
- Tüpler 13000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır ve kolon üzerine 700 μ l RW1 yıkama tamponu ilave edilmiştir.
- Tüpler 13000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 500 μ l RPE solüsyonu ilave edilerek, 13000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır. Kolon üzerine tekrar 500 μ l RPE solüsyonu ilave edilmiştir.
- Tüpler 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır. Üzerine hiçbir şey ilave edilmeden tektar 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon steril 1,5 ml ependorf tüp üzerine alınmış ve üzerine 50 μ l RNaz içermeyen su ilave edilerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA'dan cDNA eldesi için Thermo Fisher-RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622) kullanılmıştır.

- İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüş ve bütün örneklerin konsantrasyonları 250 ng olacak şekilde hesaplanmıştır.
- Hesaplanan RNA örneklerinin üzerine totalde 11 µl olacak şekilde distile su PZR tüplerine eklenmiştir.
- Kitin içerisinde bulunan Oligo dT solüsyonundan 1 µl ilave edilmiş ve 65°C'de 5 dakika boyunca thermal cycler'da bekletilmiştir.
- Bu sırada her bir örnek için 4 µl reaksiyon tamponu, 2 µl dNTP, 1 µl Reverse Transcriptase ve 1 µl Ribolock RI içeren reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır.
- 5 dakika bitiminde reaksiyon karışımından örnek başına 8 µl alınarak PZR tüplerine eklenmiştir.
- Hazırlanan PZR tüpleri tekrar termal döngüleyiciye konulmuştur ve 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika bekletilmiştir.
- Sonrasında cDNA'ye çevrilen örnekler, Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür.

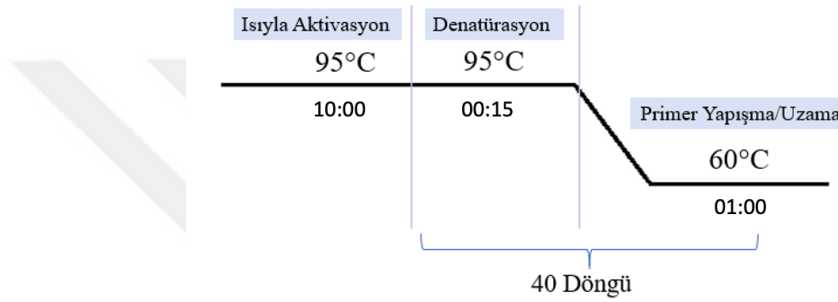
3.9. Gerçek Zamanlı PZR (RNA düzeyinde)

Gerçek zamanlı PZR ile gen ifadelerinin belirlenmesi için hücre lizatlarından elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir. Gerçek zamanlı PZR için Power SYBR Green PCR kiti ABI 7500 fast cihazında kullanılmıştır. *SERPINB1*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX* ve *BCL2* gen ifadelerine gerçek-zamanlı PZR ile bakılmıştır. Kontrol olarak Peptidylprolyl Isomerase A (*PPIA*) geni kullanılmıştır. Reaksiyon için kullanılan malzemeler ve PZR koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Gerçek zamanlı PZR için kullanılacak primer dizileri aşağıda belirtilmiştir. Çizelge 3.1.'de gösterilen genlerin ifadesi reaksiyon sonunda eşik döngüsü (CT) değerlerinden $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3. 1. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılan primerlerin gösterilmesi.

Gen	İleri Primer (3'-5')	Geri Primer (5'-3')
PPIA	TCTTTCACCTTGCCAAACACC	CATCCTAAAGCATACGGGTCC
CASP3	CCTCAGAGAGACATTCATG	GCAGTAGTCGCCTCTCTGA
CASP8	AGAGTCTGTGCCCAAATCAC	GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA

<i>CASP9</i>	AGCCAGATGCTGTCCCATAC	CAGGAGACAAAACCTGGGAA
<i>BAX</i>	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>BCL2</i>	GTGGTGGAGGAACCTCTTCAG	GTTCCACAAAGGCATCCCAG
<i>SERPINB1</i>	TCCTTCCTGAGTTCTTGGTTTC	ACCCACTGGTTTATGGTCTTC
<i>PARP1</i>	AGAGTATGCCAAGTCCAACAG	TCAATCATGCCTAGCTGTGG
<i>AIF</i>	AAGCACGCTCTAACATCTGG	TTCTCCAGCCAATCTTCCAC

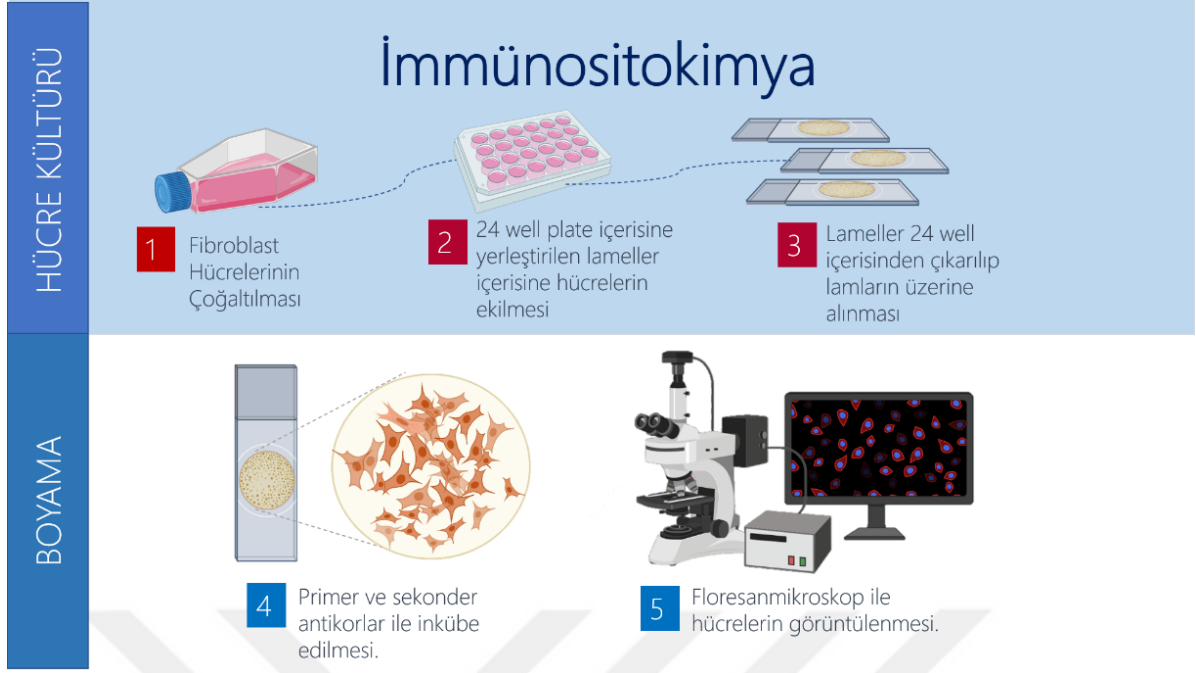


Şekil 3.7. Gerçek zamanlı PZR döngü koşulları

- Nanodrop kullanılarak konsantrasyonları ölçülen cDNA örnekleri, en yüksek değere oranlanarak hesaplanmıştır.
- Hesaplanan cDNA örnekleri distile su kullanılarak uygun oranlarda seyreltilmiştir.
- Bir örnek için gerekli reaksiyon karışımı; 5 µl 2X SYBR Green, 0,1 µl ileri primer, 0,1 µl geri primer ve 1,8 µl distile su ile hazırlanmıştır.
- Örnekler belirlenen 96-kuyucuklu plaka dizaynındaki yerlerine kuyucuk başına 3 µl olacak şekilde konulmuştur.
- Örneklerin üzerine her kuyucuk için 7 µl hazırlanan reaksiyon karışımı eklenmiştir.
- Şekil 3.7 ‘deki PZR koşullarına göre gerçek zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir.

3.10. İmmunofloresan Analiz

Sitoplazmik ve nükleer SERPINB1 miktarını görüntülemek için immunofloresan analiz yapılmıştır. Analiz için SERPINB1 proteininin farklı aminoasit bölgelerini tanıyan (201-300 aa ve 250-350 aa) iki ayrı SERPINB1 antikoru kullanılmıştır.



Şekil 3.8. İmmünositokimya deneyinin şematik olarak gösterilmesi.

- Hücreler 24 kuyucuklu plaka içinde yuvarlak lamel (cover) üzerinde çoğaltılmıştır.
- %60 kaplama oranına ulaşan hücreler 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz ile muamele edilmiştir.
- Lamellerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve 3 kere PBS ile yıkanmıştır.
- Lameller, hidrofobik kalem ile işaretlenmiş lamalar üzerine iğne yardımıyla yerleştirilmiştir.
- Fiksasyon için Hücrelere 200 µl %10 NBF eklenerek +4°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- %NBF lamellerden uzaklaştırılmıştır ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
- Geçirgenlik artırımı için 200 µl %0,2 Triton X-100 + PBS lamellerin üzerine eklenmiştir ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Triton x-100 lamellerden uzaklaştırılmıştır ve 3 kere PBS ile yıkanmıştır.
- Primer antikorlar 1:50 oranında %1 BSA içerisinde seyreltilmiş ve 150 µl lamellere eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.
- Primer antikor uzaklaştırılmıştır ve lamellerin etrafındaki hidrofobik çizgi yenilenmiştir.
- Lameller 4 kere PBS + % 0,2 Triton X-100 ile yıkanmıştır.

- Sekonder antikorlar 1:50 oranında olacak şekilde %1 BSA içerisinde seyreltilmiştir ve 150 ul lamellere eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Sekonder antikor uzaklaştırılmıştır ve lameller 4 kere PBS + %0,2 Triton X-100 ile yıkanmıştır.
- Çekirdek boyaması için 1 damla mounting medium lamellere damlatılmıştır.
- Lamellerin üzeri kapatılarak floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

3.11. Sitozol/Nükleer Fraksiyonlama

Sitoplazmik ve nükleer komponentleri aşamalı olarak ayırmak için Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher) kullanılmıştır.

a) Hücre Kültürü Hazırlığı:

- 6 kuyucuklu transwell aparatına $1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Farklılaştırılan hücreler tanımlanan doz ve sürelerde nötrofil elastaz ile uyarılmıştır.
- Hücreler tripsin/EDTA solüsyonu ile kaldırılmıştır ve 500 x g' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Hücre peleti soğuk PBS'de süspanse hale getirilerek yıkanmıştır.
- Hücreler 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve 500 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatlice atılmış ve hücre peletinin olabildiğince kuru kalması sağlanmıştır.
- Hücre peletine, miktarına uygun hacimde proteaz inhibitörleri solüsyonu eklenmiştir.

b) Hücre İçi Proteinlerin Fraksiyonlanması

Sitoplazmik Ekstraksiyon

- Hücre peletine sitoplazmik ekstraksiyon solüsyonu eklenmiş ve 10 dakika 4°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler 500 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant (sitoplazmik ekstrakt) buz üzerinde yeni bir tüpe alınmıştır.

Membran Ekstraksiyonu

- Pelete proteaz inhibitörleri içeren soğuk Membran Ekstraksiyon Solüsyonu eklenmiştir. Hücreler en yüksek devirde 5 saniye boyunca vortekslenmiştir. Tüp

4°C'de 10 dakika inkübasyon sonrası 3000 × g'de 5 dakika santrifüjedilmiştir.

Süpernatant (membran ekstraktı) buz üzerinde yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Nükleer Ekstraksiyon

- Pelete proteaz inhibitörleri içeren soğuk Nükleer Ekstraksiyon Solüsyonu eklenmiştir. En yüksek devirde 15 saniye vortekslenmiştir. Tüp 4°C'de 30 dakika karıştırılarak inkübasyon sonrası 5000 × g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant (çözünür nükleer özüt), buz üzerinde önceden soğutulmuş temiz bir tüpe aktarılmıştır.

3.12. Western Blot

A) Tek Tabaka Hücre Kültüründen Protein Tayini

BEAS-2B hücreleri kuyucuk içerisinde 5 x10⁵ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Uygun kaplama oranına ulaştığında hücreler farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. Uyarım sonucunda hücrelerden protein izolasyonu yapılarak Western blot yöntemiyle miktarları tayin edilmiştir.

B) ALI-Kültür Yöntemiyle Farklılaştırılan Hücrelerden Protein Tayini

BEAS-2B hücreleri her bir transwellde 1 x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 21 gün farklılaştırılmanın sonunda hücreler 10 ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. Uyarım sonunda hücreden fraksiyonlama yapılarak sitozolik ve nükleer ekstraktlar elde edilmiştir. Bu ekstraktlardaki protein miktarı western blot yöntemiyle tespit edilmiştir.

SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması:

Çizelge 3.2. Ayırıcı jel içerisindeki kimyasal miktarları.

AYIRICI JEL	
İçerik	Miktar
%30 Akrilamid / %8 Bisakrilamid Karışımı	5 ml
1,5 M Tris-HCl pH:8.8	3,75 ml
%10 Sodyum Dodesil Sülfat	150 µl
%10 Amonyum Persülfat	150 µl
Tetrametiletildiamin (TEMED)	15 µl
Distile Su	6,25 ml

Çizelge 3.3. İstifleme jel içerisindeki kimyasal miktarları

İSTİFLEME JELİ	
İçerik	Miktar
%30 Akrilamid / %8 Bisakrilamid Karışımı	1 ml
0,5 M Tris-HCl pH:8.8	1,25 ml
%10 Sodyum Dodesil Sülfat	50 µl
%10 Amonyum Persülfat	75 µl
Tetrametiletildiamin (TEMED)	15 µl
Distile Su	3,05 ml

- Ayırıcı jel Çizelge 3.2’de verilen miktarlara göre hazırlanıp western camları arasına belirli bir hizaya kadar döküldükten sonra üzeri izopropanol ile kapatılmıştır.
- Jelin polimerleşme oranına göre yaklaşık 25-30 dakika bekledikten sonra jelin üzerindeki izopraponal kurutma kağıdı ile çekilmiştir.
- Ayırıcı jelin polimerleşmesi beklenirken istefleme jeli Çizelge 3.3’de belirtilen miktarlara göre hazırlanmıştır. İzopropanol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra istifleme jeli ayırıcı jelin üzerine dökülür.
- İstifleme jeli döküldüğü anda polimerleşme başlamadan kuyucukları oluşturacak olan tarak sisteme yerleştirilmiştir.
- Yaklaşık 35-40 dakika boyunca jelin polimerleşmesi beklenmiştir.

Örnek Hazırlama:

- Bradford analiziyle protein miktarları tespit edildikten sonra örneklerin protein miktarı birbirlerine eşitlenecek şekilde hesaplama yapılmıştır.
- Yapılan hesaplamaya göre, uygun miktarlarda protein, yükleme boyası (1:9 oranında B-merkaptetanöl ve 4X Laemmli Tamponu) ve PBS içeren yükleme örnekleri hazırlanmıştır.
- Proteinlerin zincirlerini kırmak için yükleme örnekleri termal döngüleyicide 95°C de 5 dakika bekletilmiştir.

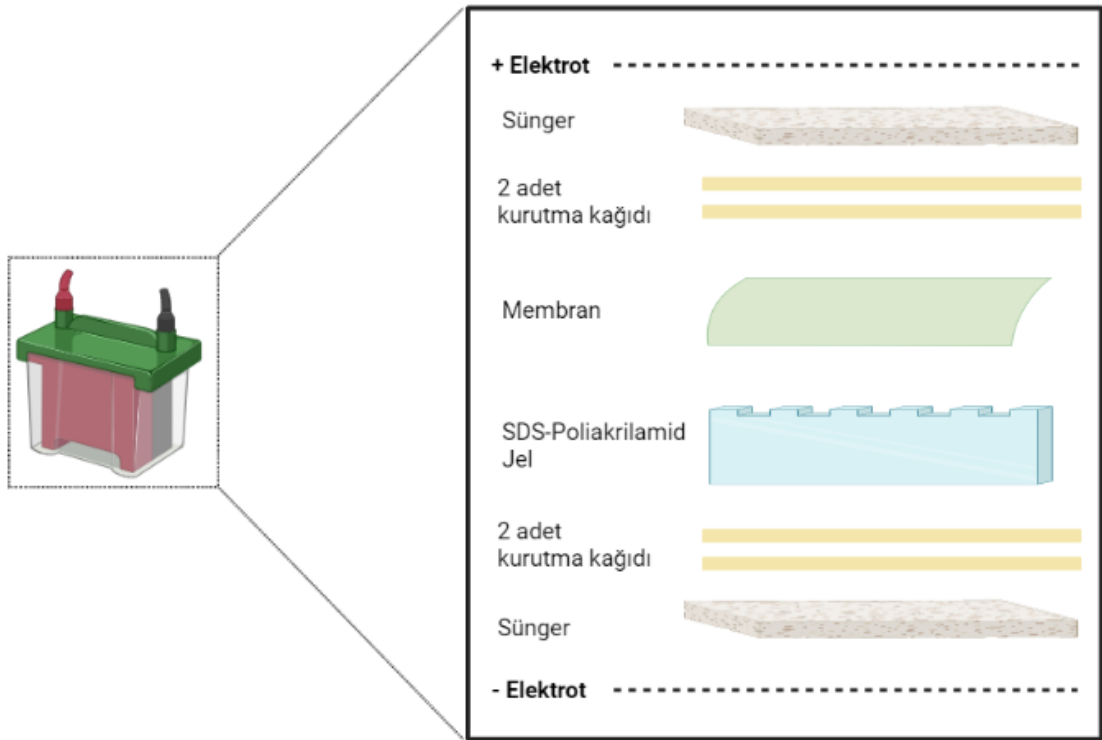
Örneklerin SDS-Poliakrilamid Jele Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi:

- Hazırlanan jel yürütme tankına yerleştirilmiştir. Tarak seviyesine gelinceye kadar yürütme tamponu eklendikten sonra tarak çekilerek yüklemenin yapılacağı kuyucuklar açılmıştır. Bu işlemin ardından yükleme sırasında sorun yaşamamak adına kuyucukların içi yürütme tamponu ile yıkanarak temizlenmiştir.

- Hazırlanan örneklerden her kuyucuğa 20 µl yükleme yapılırken protein markerdan (PinkPlus Prestained Protein Ladder, SP005-0500) ise 5 µL jele yüklenmiştir.
- Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra yürütme tankı güç kaynağına bağlanarak yürütme işlemi başlatılmıştır.
- 15 dakika boyunca 70V'da yürütülen örnekler süre sonunda jelin en aşağısına inene kadar 100V'da yürütülmüştür.

Jelde Yürütülen Proteinlerin Membrana Aktarılması:

- İlk aşamada aktarımın yapılacağı membran transfer tamponu kullanılarak aktifleştirilmiştir.
- Bu işlemle birlikte aktarım sırasında kullanılacak olan süngerler metanol içerisinde bekletilmiştir. Bu süngerler sisteme yerleştirilmeden önce iyice sıkılarak nemli kalmaları sağlanmıştır.
- Aktarım sırasında kullanılacak membran ve süngerler hazırlandıktan sonra yürütmenin yapıldığı jel dikkatli bir şekilde hazırlanan transfer sistemine aktarılır. Transfer sistemin dizaynı Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Western Blot transfer kaset düzeninin şematik olarak gösterilmesi.

- 150 ml transfer tamponu transfer sistemine eklenmiştir. Hazırlanan sistem 20 voltta yaklaşık 2 saat yürütülmüştür.
- Membrana aktarma işlemi bittikten sonra membran sistemden çıkarılıp kaba alınmış ve 20 ml TBS-T ile 160 rpm çalkalayıcıda 5 dakika boyunca 3 tekrarlı olarak yıkanmıştır.
- Sonrasında 20 ml bloklama solüsyonu (%5 BSA) membran üzerine dökülmüş ve 160 rpm çalkalayıcıda 1,5 saat bekletilmiştir.
- Bloklama bittikten sonra solüsyon kaptan uzaklaştırılmış ve membran 20 ml TBS-T ile 160 rpm çalkalayıcıda 5 dakika boyunca 3 tekrarlı olarak yıkanmıştır.
- Bu işlem sırasında Abcam SERPINB1 (ab181084) antikoru, %0,5 BSA içeren 5 ml TBS-T içerisinde 1/1000 seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Yıkama işlemi bittikten sonra membran gece boyunca +4°C, 160 rpm çalkalayıcıda primer antikor ile bekletilmiştir.
- Sonrasında primer antikor membrandan uzaklaştırılmış ve membran 20 ml TBS-T ile 160 rpm çalkalayıcıda 5 dakika boyunca 3 tekrarlı olarak yıkanmıştır.
- Sekonder antikor, %0,5 BSA içeren 5 ml TBS-T içerisinde 1/1000 seyreltilerek hazırlanmış ve membran üzerine sekonder antikor konularak oda sıcaklığında 160 rpm çalkalayıcıda 1,5 saat bekletilmiştir.
- Sekonder antikor membrandan uzaklaştırılmış ve 20 ml 1X TBS-T ile 5 dakika boyunca 240 rpm çalkalayıcıda yıkanmıştır. Bu yıkama işlemi toplamda 3 kere tekrar edilmiştir.
- Yıkama işlemi esnasında 2 ml substrat solüsyonu (1:1 oranında Peroksit solüsyonu ve Luminal Enhancer Solüsyonu) hazırlanmıştır.
- Membran, ChemiDoc™ (Bio-Rad Laboratories) görüntüleme sistemine yerleştirilmiştir.
- Substrat solüsyonu membran üzerine dökülüp 5 dakika boyunca bekletildikten sonra, görüntü alınmıştır.

3.13. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

RNA izolasyonu öncesi her bir örnekten süpernatantlar toplanmış ve hücre dışına salınmış olan IL-8, IL-6, TNF- α ve GM-CSF'in ölçümü ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Kitlerin hassasiyet aralıkları Human IL-8 (R&D Systems, DY208-05) için 31,2 - 2000 pg/mL, Human IL-6 (R&D Systems, DY206-05) için 9,38 – 600 pg/ml ve Human GM-CSF (R&D Systems, DY215-05) için 15,6 – 1000 pg/mL Human TNF- α (MabTech, 3512-1H-6) için 4 - 400 pg/ml olarak

belirtilmiştir. Deneylerin optimizasyonu sırasında elde edilen standart grafiklere göre gerekli sulandırmalar yapılmıştır.

Plaka Hazırlanması:

- Sitokinlerin her biri için farklı kitler satın alınmıştır. Bu kitlerin içindeki yakalama antikoru (capture antibody), kit içerisinde bulunan plaka kaplama tamponu (plate coating buffer) ile önerilen konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan yakalama antikoru 96-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmış ve plakalar gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Kuyucukların içinden yakalama antikoru uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 400 µl yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkamaların bitiminde kuyucuk içindeki bütün sıvının tamamen uzaklaşmış olmasına dikkat edilmiştir.
- Yıkama tamponu ile temizlenen kuyucuklara, 300 µl ayıraç seyreltme tamponu (reagent diluent) eklenmiş ve plakalar oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edilerek bloklanmıştır.
- Daha önce yapılmış olan yıkama işlemi bu aşamada da yine 3 kere tekrarlanmıştır.
- Kitlerin önerdiği konsantrasyonlara göre hazırlanan standartlar ve uygun seyreltme oranı ile hazırlanan örnekler kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Hazırlanan plakalar oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Daha önce yapılmış olan yıkama işlemi bu aşamada da yine 3 kere tekrarlanmıştır.
- Kitlerin önerdiği konsantrasyonlarda her bir protein için ayıraç seyreltme tamponu ile hazırlanmış olan belirleyici antikor (detection antibody), kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Plakalar oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Daha önce yapılmış olan yıkama işlemi bu aşamada da yine 3 kere tekrarlanmıştır.
- Kit içeriğinde bulunan Streptavidin-HRP, önerilen konsantrasyonda ayıraç seyreltme tamponu ile seyreltilmiş ve kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Bu aşamada plakalar oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- Daha önce yapılmış olan yıkama işlemi bu aşamada da yine 3 kere tekrarlanmıştır.
- Kit içeriğinde tedarik edilmiş olan renk reaktifi A (Color Reagent A) ve renk reaktifi B (Color Reagent B) 1:1 oranında taze olarak hazırlanmış ve kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Bu aşamada oda sıcaklığında karanlıkta yaklaşık 20 dakika boyunca plaka kontrol edilerek, plakada oluşacak olan mavi renk gözlemlenmiştir.
- Kit içeriğinde bulunan durdurma solüsyonu (stop solution) seyreltme yapılmadan kuyucuk başına 50 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Plaka hafifçe sallanarak durdurma solüsyonunun iyice karışması sağlanmıştır.

- Kuyucuklarda sarı renk gözlemlenmesi durdurma solüsyonunun iyice karıştığını gösterdiğinden, bu aşamada plakalar 450 nm ve 540 nm değerlerine ayarlanan mikroparka okuyucu kullanılarak optik yoğunlukları ölçülmüştür.
- Hesaplama yapılırken spesifik olmayan okuma değeri veren 540 nm değerleri, spesifik okuma veren 450 nm değerlerinden çıkarılmıştır. Elde edilen standart grafik kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.14. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 7 programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler tekrarlı ölçüm yapılan analizler için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ikiden fazla grup karşılaştırması için iki yönlü ve tek yönlü ANOVA ve Dunnett's post hoc testi kullanılmış, iki grup karşılaştırmalarda normal dağılan veriler için Student's t test, normal dağılmayan veriler için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve p-değerinin 0,05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılık derecesi her bir analizin sonucu altında belirtilmiştir

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasının ilk aşamasında nötrofil elastazın aktivitesinin ölçülmesi deneylerin güvenilirliği açısından öncelikli bir öneme sahiptir. Nötrofil elastazın aktivitesi Succinyl-alanyl-alanyl-alanyl-p-nitroanilide (SLAPN) substratı ile ölçülmüştür. BEAS-2B hücreleri çoğaltılarak farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. Nötrofil elastazın hücre canlılığı ve sitotoksitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin tespiti için AO/PI ikili boyama tekniği kullanılmıştır. Apoptotik indikatör moleküllerden olan Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktiviteleri tek tabaka hücre kültüründe test edilmiştir. Mitokondriyal transmembran potansiyeli JC-1 boyası aracılığıyla incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastazla uyarım sonucunda, epitel hücrede bulunan ve konformasyonel dönüşüm göstermesi beklenen SERPINB1 ve SERPINB1'den türeyen L-DNase II molekülünün protein seviyeleri western blot yöntemiyle tayin edilmiştir.

ALI-kültür yöntemiyle 21 gün süreyle farklılaştırılan BEAS-2B hücreleri elde edilen sonuçlar doğrultusunda belirlenen doz/dozlar ve sürede NE ile uyarılmıştır. Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle *SERPINB1*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BCL2*, *BAX*, *AIF* ve *PARP1* gen ifadeleri belirlenmiştir. L-DNase II ve SERPINB1'in hücresel komponentlerdeki lokalizasyonu

immunofloresan analiz yöntemiyle görüntü düzeyinde analiz edilirken, hücrelerin nükleer ve sitozolik alt birimleri fraksiyonlanarak western blot yöntemiyle ise protein seviyeleri tayin edilmiştir. Ek olarak farklılaştırılmış hücrelerin alt ve üst süpernatantlarından IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF proteinlerinin miktarı ELISA yöntemiyle ölçülmüştür.

4.1. Nötrofil Elastaz aktivite ölçümü

Tez deneylerinde kullanılan nötrofil elastaz enziminin aktivitesi kromojenik substratı olan Succinyl-alanyl-alanyl-alanyl-p-nitroanilide (SLAPN) vasıtasıyla ölçülmüştür. Bir ünite elastazın birim zamanda hidroliz ettiği substrat miktarı aracılığıyla elastazın aktivitesi tayin edilmiştir. Elastaz aktivitesinin test edilmesi deneylerin güvenilirliği açısından öncelik teşkil etmektedir. Yapılan analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.1. Substratı ile etkileştirilen nötrofil elastazın aktivite ölçüm sonuçları.

Enzim aktivitesi ile dönüştürülen substrat miktarı arasında doğrudan bir korelasyon olduğu ve birim zamanda harcanan substrat miktarı göz önünde bulundurulduğunda enzim aktivitesinin deneyleri gerçekleştirmeye uygun olduğu belirlenmiştir.

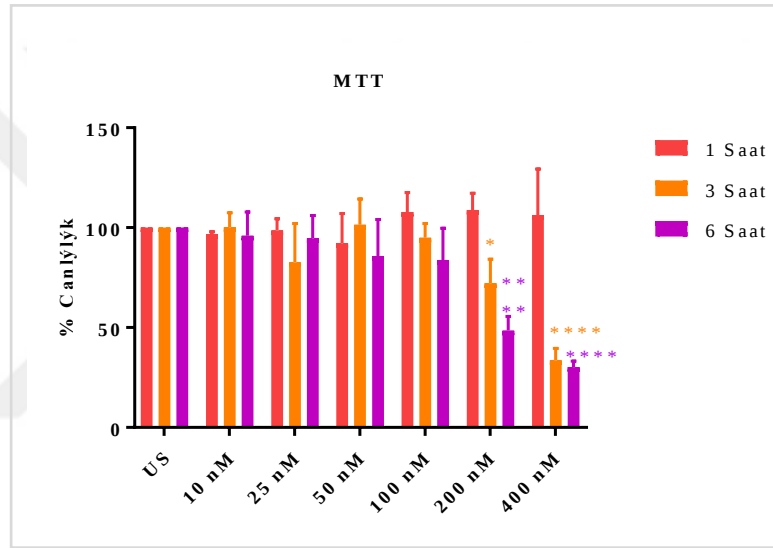
4.2. Nötrofil Elastaz ile Uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Canlılık ve Sitotoksitenin Ölçülmesi

Tez çalışması kapsamında hücrelere verilen nötrofil elastazın doğru süre/konsantrasyonda uygulanması apoptotik ya da nekrotik yolların ayrımı için önemlidir. NE'nin optimum

konsantrasyon ve uyarım süresini bulmak için hücre canlılığı ve sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla MTT Testi, LDH testi, Propidyum İyodür/Akridin Oranj ikili boyama, Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümü, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 fluorometrik ölçümü ve Western Blot yöntemiyle SERPINB1 proteininin analizi yapılmıştır.

4.2.1. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde MTT testi

BEAS-2B hücreleri 3 tekrarlı olacak şekilde 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM ve 400 nM konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile 1,3 ve 6 saat uyarıma maruz bırakılmıştır. Uyarım sonunda ilgili dozların sitotoksik etkisi MTT testi ile analiz edilmiştir (Sekil 4.2.)



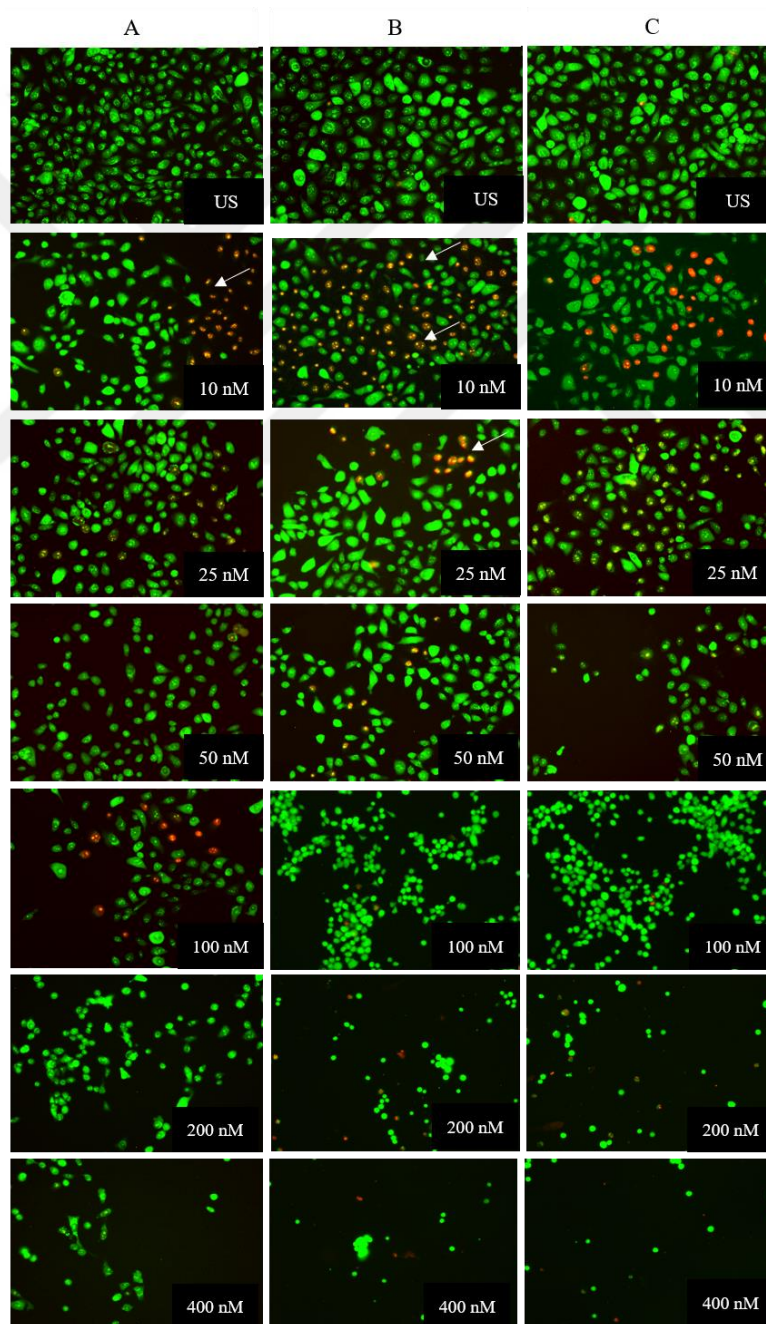
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda (10 nM, 25nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM) 1 saat, 3 saat ve 6 saat nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde MTT sonuçları.

Nötrofil elastaz ile uyarım sonucunda özellikle yüksek konsantrasyonlarda, doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu tespit edilmiştir. 1 saatlik uyarımın hiçbir dozunda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilememiştir. 3 saat ve 6 saat süreyle 200 nM üzeri nötrofil elastaz uyarımının hücre canlılığını anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmektedir. 3 saat ve 6 saat 200 nM NE elastaz uyarımı hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %72 ve %48' e düşürmüştür. 3 saat ve 6 saat 400 nM NE elastaz uyarımı ise yaklaşık %30 canlılık tespit edilmiştir. BHK hücreleriyle yapılan bir çalışmada insan nötrofil elastazının (HNE) 40 uM HNE ile farklı sürelerde (1,2,3,4 ve 24 saat) uyarım

sonucunda süreye bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar literatürle uyumludur [73].

4.2.2. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Propidyum İyodür (PI)/ Akridin Orange (AO) Floresan Boyama ile apoptotik/nekrotik hücre tespiti

Florokromatik boyalar aracılığıyla hücrelerin apoptotik ve nekrotik durum tespiti floresan boyama ile analiz edilmiştir. Yeşil renkteki ışımlar sağlıklı hücreleri gösterirken, sarı/turuncu ışımlar erken/geç apoptotik evreleri, koyu turuncu/kırmızı renkteki ışımlar ise nekrotik hücreleri temsil etmektedir.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin apoptotik ve nekrotik ayrımı için yapılan ikili boyama sonuçları. Us: Uyarılmamış. Beyaz ok ile işaretlenmiş hücre grupları erken/geç apoptotik evreyi temsil etmektedir. (A:1 Saat B: 3 Saat C: 6 Saat)

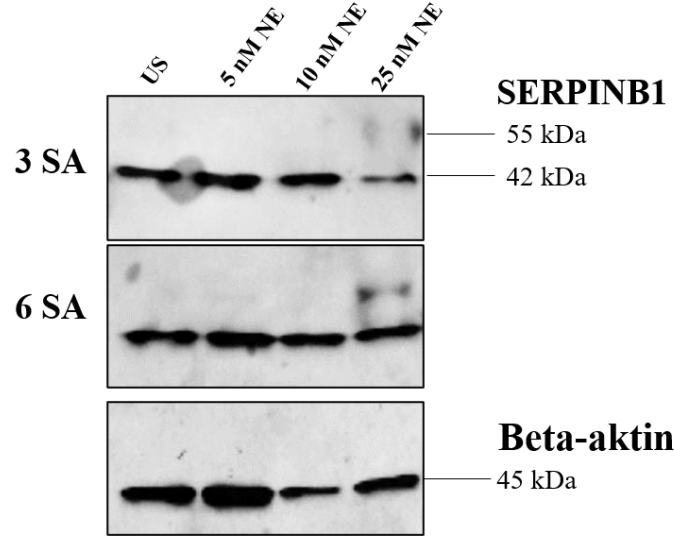
Hücreler için sitotoksik bir proteaz olan nötrofil elastazın uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı arasında doğrudan bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Bir çalışmada Suzuki ve arkadaşları akciğer epitel hücrelerini ve başka bir çalışmada ise Ginzberg ve arkadaşları intestinal epitel hücrelerini nötrofil elastazın 0,1 ve 0,3 U/ml konsantrasyonu ile uyarılmış ve hücre ölümünün indüklendiği gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürdeki bu bilgilerle benzerlik göstermektedir [117, 118].

Yüksek dozlarda (50 nM, 100 nM, 200 nM ve 400 nM) nötrofil elastazın hücreler arası sıkı bağlantıları ve yüzey bağlantı proteinlerini bozarak, hücrelerin birbirlerinden ve plaka yüzeyinden ayrılmasına sebebiyet verdiği yapılan ikili boyamalar sonucunda görülmektedir. Bronş epitel hücreleriyle yapılan bir çalışmada nötrofil elastaz ile uyarmı sonucunda sıkı bağlantı proteinlerinden olan e-kaderinin yapısını bozduğu gösterilmiştir [119].

Ayrıca doz ve süre artışı ile birlikte hücre morfolojilerinde değişiklik tespit edilmiştir. Artan dozlardaki kırmızı renkteki ışımlar nekrotik hücre profiline kaymaların olduğuna işaret etmektedir. Özellikle 1 saat 10 nM ve 3 saat 10 nM ve 25 nM konsantrasyonlarda nötrofil elastaz uyarımının hücreleri erken/geç apoptoza geçirdiği görülmektedir. Literatürde LEI/L-DNase II yolağı erken/geç apoptoz evrelerinde aktifleştigiğine dair bilgiler mevcuttur [76, 120].

4.2.3. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerde SERPINB1 proteinin western blot yöntemiyle tayin edilmesi

24 kuyucuklu plakalara ekilen BEAS-2B hücreleri farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. NE uyarımı sonunda protein izolasyonu yapılmış ve elde edilen proteinlerdeki SERPINB1 miktarı Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.4. 5 nM, 10 nM, 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde SERPINB1 ve Beta-aktin proteinlerinin Western Blot sonuçları. US: Uyarılmamış

Kontrol olarak kullanılan Beta-aktin proteinine göre SERPINB1 protein bantları değerlendirilmiştir. Canlılık sitotoksitite deneyleri (MTT, AO/PI ikili boyama) değerlendirildiğinde 50 nM ve üzeri dozların hücre için radikal bir sitotoksitite göstermesi nedeniyle daha düşük dozlar üzerinden protein tayini yapılmasının uygun bulunmuştur. Bu nedenle yalnızca 5, 10 ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarım sonucu protein analizi yapılmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde 3 saat ve 6 saat, 5 nM ve 10 nM NE uyarımı sonrasında bant profillerinde kontrole kıyasla belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir. Ancak elde edilen sonuçlar doğrultusunda 3 ve 6 saatlik 25 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucunda protein markerı ile karşılaştırılığında yaklaşık olarak 50-60 kDa arası ikinci bir bant oluştuğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu bantın yoğunluğunun, hücrelerin 25 nM nötrofil elastaza maruziyet süresi uzadıkça arttığı gözlemlenmiştir. İkinci bant yoğunluğunun uyarım süresi ile artması nötrofil elastazın bu bantın oluşumunda etkili olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

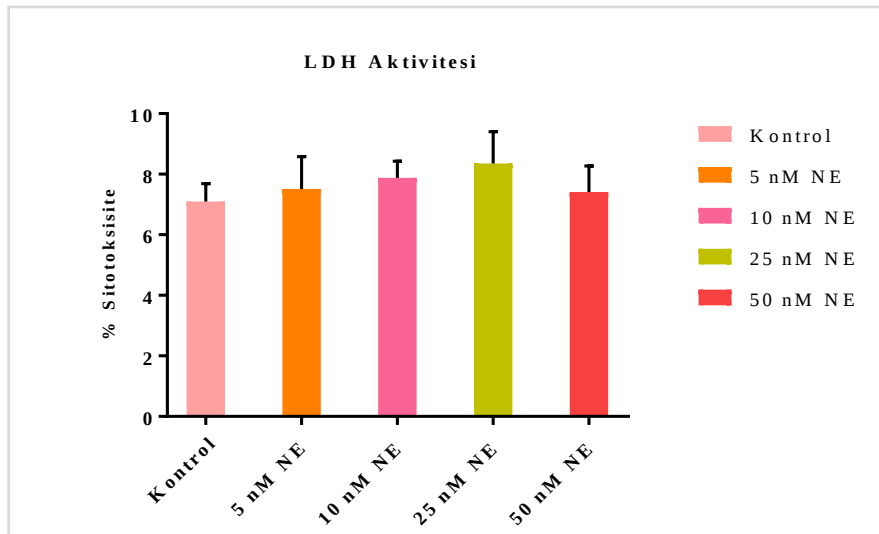
Oluşan ikinci bantların uyarım sonrasında proteinde meydana gelebilecek değişikliklerle birlikte farklı bir molekül ile kompleks yapı oluşturmaları ya da proteinin 3 boyutlu yapısında meydana gelebilecek konformasyonel değişiklikler sonucunda ara bir molekül formu olabileceği olası çıkarımlar arasındadır. Rekombinant SERPINB1 mutant proteinleri ile nötrofil elastaz, proteinaz 3 ve katepsin G proteazlarının birlikte inkübasyonlarının gerçekleştirildiği bir çalışmada, western blot analizi sonucunda özellikle nötrofil elastaz ile muamele edilen farklı mutant SERPINB1 proteinlerinin 42 kDa'lık doğal formu dışında ayrı bant profilleri gösterdiği görülmüştür. SERPINB1'in konformasyonel değişime açık bölgelerinin fazla olması, stimülana

karşı post translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla farklı formlara geçebileceği ihtimalini ortaya koymaktadır [74].

Tez kapsamında yapılan sitotoksosite ve canlılık testleri sonucunda farklı konsantrasyonlar ve uyarım süresi ile gerçekleştirilen MTT testinde 3 ve 6 saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. AO/PI ikili boyama analizleri sonucunda ise erken/geç apoptotik evreler değerlendirildiğinde 3 saatlik nötrofil elastaz uyarımının 6 saatlik uyarıma göre daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Western blot analizinde nötrofil elastazın 3 ve 6 saat 25 nM uygulanmasının ikinci bir bant oluşumuna neden olmasına rağmen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde 3 saatlik uyarımın daha uygun bir süre olabileceği sonucuna varılmıştır ve bundan sonraki deneylerin 3 saatlik nötrofil elastaz uyarımı ile gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.

4.2.4. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde LDH testi

BEAS-2B hücreleri 3 tekrarlı olacak şekilde 5nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM konsantrasyonlarında 3 saat süreyle nötrofil elastazla uyarılmıştır. Uyarım sonunda süpernatantlardan LDH (Laktat dehidrogenaz) analizi yapılarak nekroz değerlendirilmesi yapılmıştır. İki önemli hücre ölüm yollarından olan apoptoz ve nekroz ayırımında kullanılan dozların nekroza sebebiyet durumu ortaya konarak hücrelerin nekroz dışında farklı bir ölüm yolağı aracılığıyla uyarana yanıt verdiği test edilmiştir.

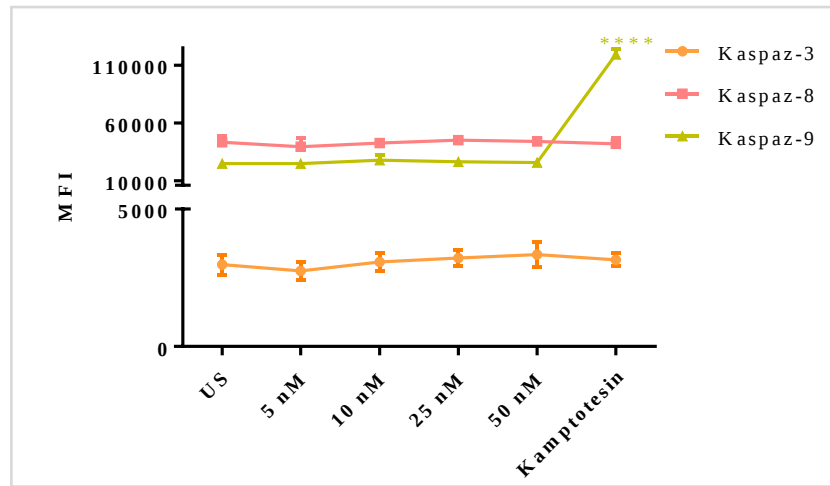


Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda 3 saat süreyle nötrofil elastaz (5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM) ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde LDH testi sonuçları.

Farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerin LDH sonucu değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda 5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda nötrofil elastazın hücrelerde nekrotik bir hasara sebep olmadığı bunun dışında bir hücre ölüm yolağı aracılığıyla hücre canlılığına etki etmesi olası çıkarımlar arasındadır.

4.2.5. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerde Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktivitesinin ölçülmesi

BEAS-2B hücreleri 96 kuyucuklu siyah plakaya ekilerek 3 saat süreyle artan konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. Uyarım sonucunda Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktivitesi ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak topoizomerez inhibitörü olan kamptotesin 20 μ M konsantrasyonda kullanılmıştır. Kamptotesin ile uyarım sonucunda Kaspaz-9 aktivitesinde 4,8 kat artış görülmektedir. Elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak intestinal epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada kamptotesin ile uyarım sonucunda Kaspaz-9 aktivitesinde anlamlı derecede artış olduğu tespit edilmiştir [121]. 5 nM, 10 nM ve 25 nM, 50 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucunda Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9'da anlamlı derecede bir artış tespit edilememiştir.



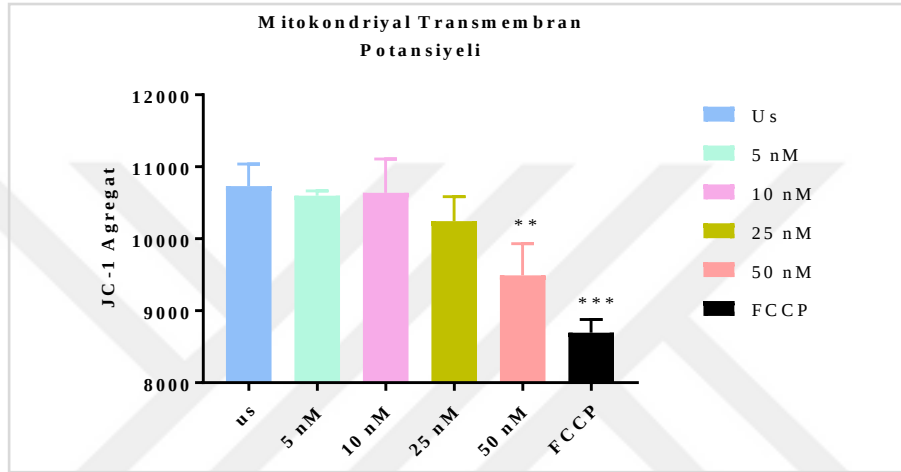
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda (5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM) nötrofil elastaz ve 20 μ M kamptotesin ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 aktivite ölçümünün sonuçları. US: Uyarılmamış.

BHK ve HeLa hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise, apoptotik ve anti apoptotik koşullar altında kaspaz bağımlı ve bağımsız yolların birbiriyle etkileşim halinde olabileceği gibi

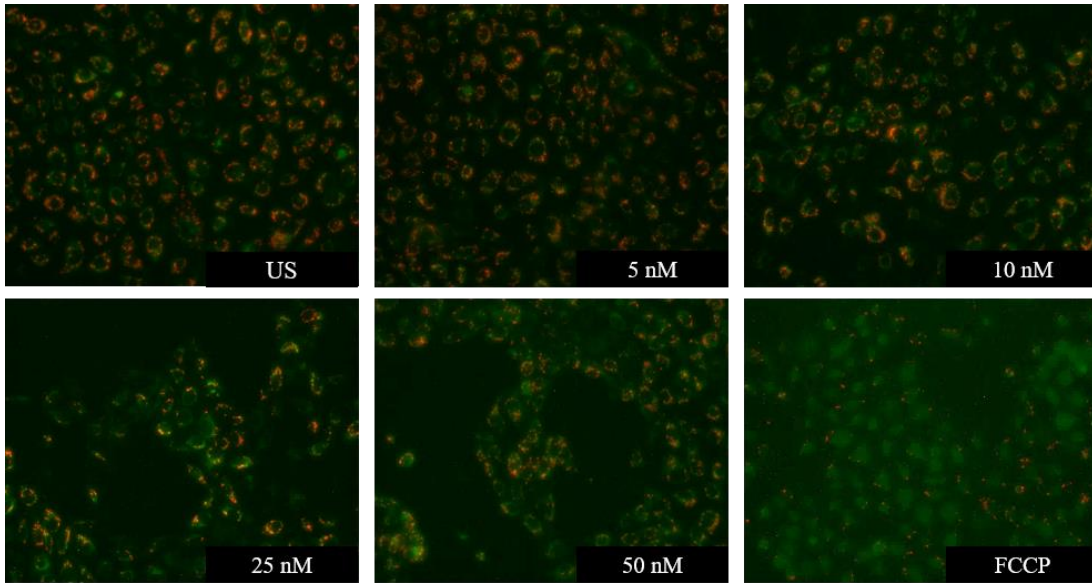
LEI/L-DNase II yolağının kaspaz bağımsız bir mekanizmayla da gerçekleşebileceği ortaya koyulmaktadır [122].

4.2.6. Farklı dozlarda nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerin mitokondriyal membran potansiyellerinin ölçülmesi

BEAS-2B hücreleri siyah plakada çoğaltılarak 3 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılması sonucu mitokondriyal transmembran potansiyelindeki ($\Delta\Psi$) değişimler JC-1 floresan boyası aracılığıyla tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda (5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde JC-1 floresan probu aracılığıyla mitokondriyal transmembran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) analiz sonucu. FCCP: Pozitif Kontrol, US: Uyarılmamış.



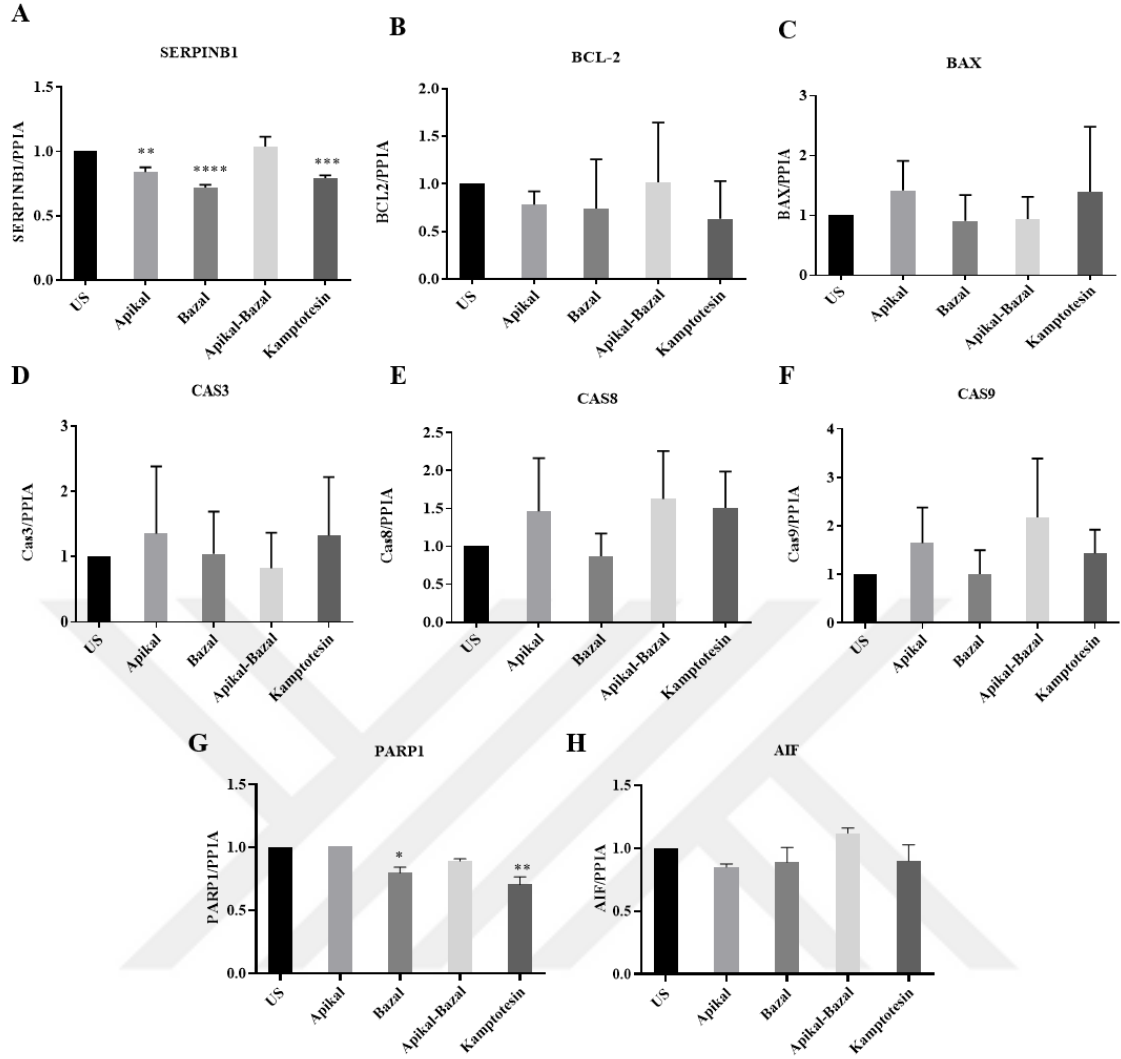
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda (5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerin JC-1 agregat/dimer (kırmızı) ve JC-1 monomer (yeşil) formlarının floresan mikroskopta görüntülenmesi. FCCP: Pozitif kontrol, US: Uyarılmamış.

Mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma, apoptozun erken evrelerinin karakteristik özelliklerinden biridir. Bu azalma/bozulma membran geçirgenliğini artırarak mitokondri iç zarında bulunan AIF, sitokrom c gibi pro apoptotik moleküllerin salımına ve apoptozun indüklenmesini sağlar [123]. BEAS-2B hücrelerinin nötrofil elastazla uyarılması sonucunda görüntü düzeyinde doza bağlı olarak mitokondriyal geçirgenlikte artış olduğu gözlemlenmiştir. Uyarım sonucunda 5 nM, 10 nM ve 25 nM konsantrasyonlardaki agregat ölçümünde anlamlı bir değişim gözlenmezken 50 nM uyarım sonucunda %20 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuç JC-1 agregat ve monomerlerinin floresan mikroskop görüntüleri ile uyumludur. Agregat ve monomer yoğunluğu görüntü düzeyinde karşılaştırıldığında, 5 nM, 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucunda elde edilen görüntüler hücrelerin erken/geç apoptotik evrelerde olabileceğinin göstergesidir.

Yapılan sitotoksosite/ canlılık ve western blot deneyleri sonucunda 3 saat/ 10 nM ve 25 nM konsantrasyonlardaki hücresel cevabın erken/geç apoptoz evresinde aktifleşen LEI/L-DNase II yolağına benzerlik gösterdiği sonucuna varılarak ALI-kültür deneylerinin bu doz ve sürelerde gerçekleştirilmesine karar verilmiştir [66, 76].

4.3. Uygun dozda nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinin apoptotik SERPINB1/L-DNase II yolağında yer alan genlerin ifadesinin belirlenmesi

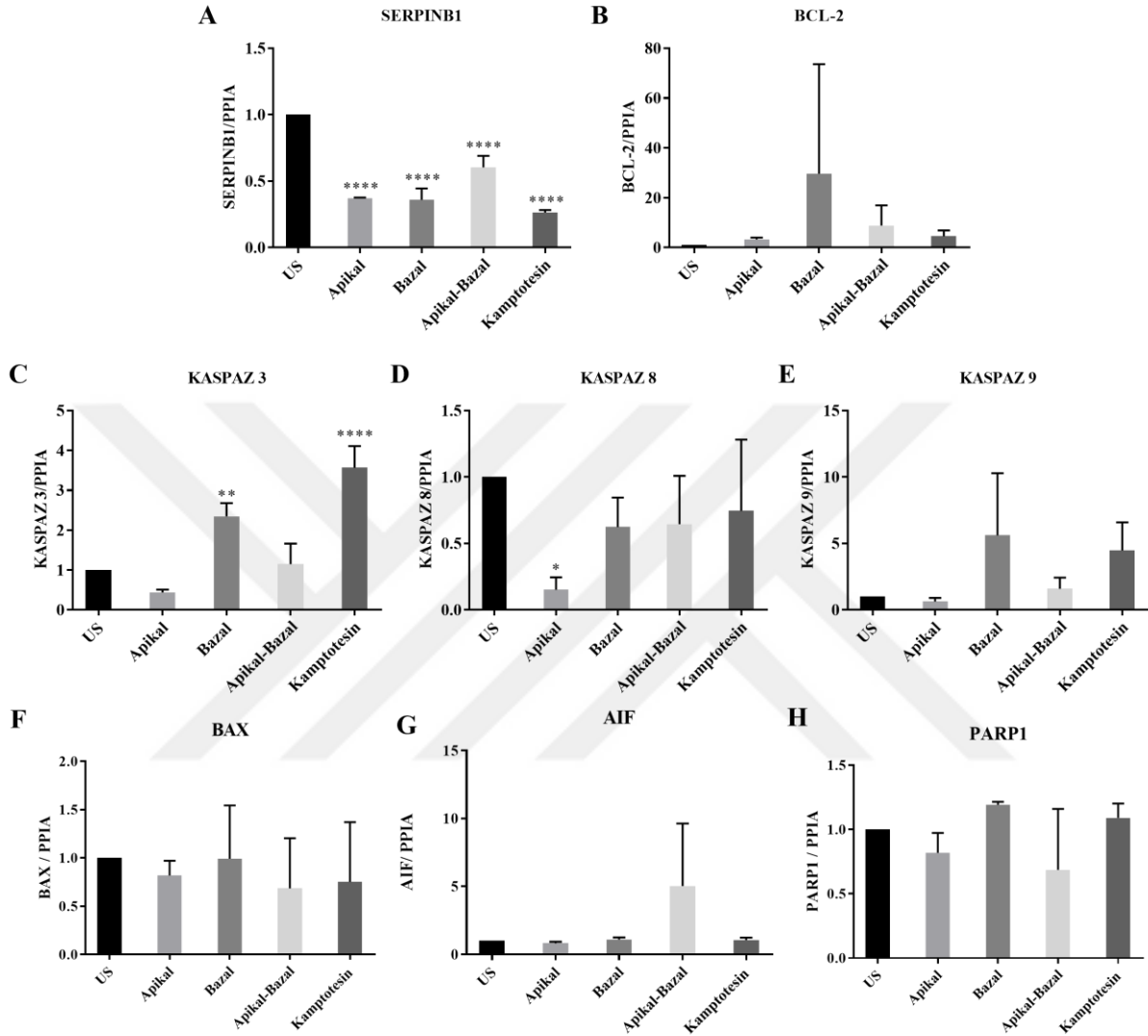
ALI-kültür yöntemiyle 21 gün süreyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 25 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucunda SERPINB1, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9, BCL-2, BAX, AIF, PARP1 genlerinin ifadesine bakılmıştır.



Şekil 4.9. ALI-kültür yöntemiyle BEAS-2B hücrelerinin 3 saat nötrofil elastaz (25 nM) ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu SERPINB1 (A), BCL2 (B), BAX (C), Cas3 (D), Cas8 (E), Cas9 (F), PARP1 (G), AIF (H) genlerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları. US: Uyarılmamış. (n: 3; p: 0,1234 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(****))

SERPINB1 gen ifadesinde, apikal ve bazal uyarımı sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. *SERPINB1*'in nötrofil elastaz uyarımı sonucunda mRNA seviyesinde azalış göstermesi *SERPINB1*'in çekirdeğe translokasyonu üzerine transkripsiyon faktörleri üzerine etkisinin bir sonucu ile açıklanabilmektedir. Apikal ve bazal uyarımda anti apoptotik moleküllerden *BCL2* gen ifadesinde azalma görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamamıştır. *CAS8* ve *CAS9*'un ifadelerinde apikal ve apikal/bazal nötrofil elastaz kaynaklı uyarımlarda ortalama 1,5 kata yakın artış olmasına karşın bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. *PARP1* gen ifadesinde bazal uyarım sonucunda anlamlı bir azalma tespit edilirken

apikal ve apikal/bazal uyarımlarda değişim gözlenmemiştir. *CAS3*, *BAX* ve *AIF* genlerinde ise hiçbir koşulda anlamlı bir değişim görülmemiştir.



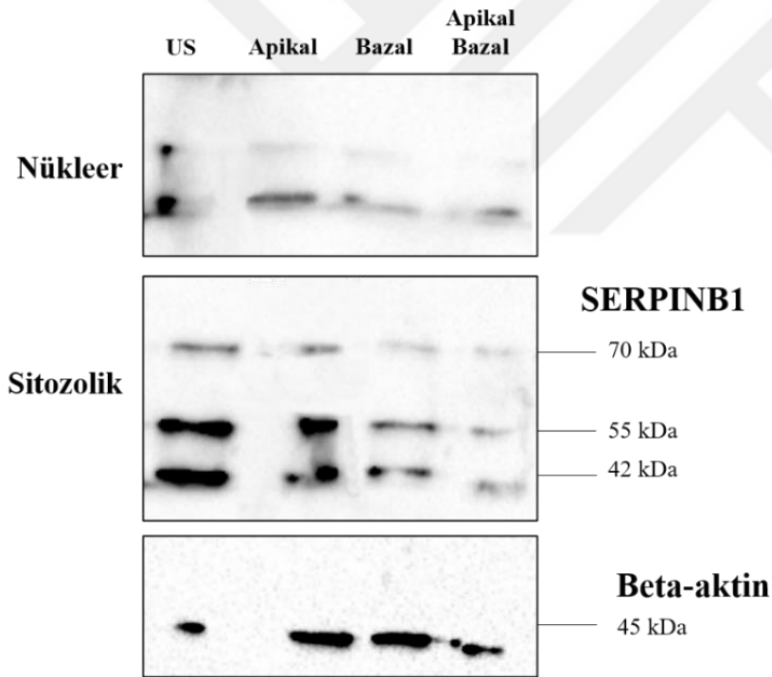
Şekil 4.10. ALI-kültür yöntemiyle BEAS-2B hücrelerinin 3 saat nötrofil elastaz (10 nM) ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu *SERPINB1* (A), *BCL-2* (B), *CAS3* (C), *CAS8* (D) *CAS9* (E), *BAX* (F), *AIF* (G), *PARP1* (H) genlerinin gerçek zamanlı PZR sonuçları. US: Uyarılmamış. (n: 3; p: 0,1234 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(****))

Farklılaştırılmış BEAS-2B hücreleri apikal, bazal ve hem apikal hem bazal olmak üzere 10 nM nötrofil elastazla uyarılarak *SERPINB1*, *CAS3*, *CAS8*, *CAS9*, *BCL-2*, *BAX*, *AIF*, *PARP1*'in gen ifadelerine bakılmıştır. Kaspaz-9 ifadesinde hiçbir koşulda anlamlı bir değişim gözlenmezken, bazal olarak uygulanan nötrofil elastaz koşulunda Kaspaz-3 gen ifadesinde yaklaşık 2,5 kat artış

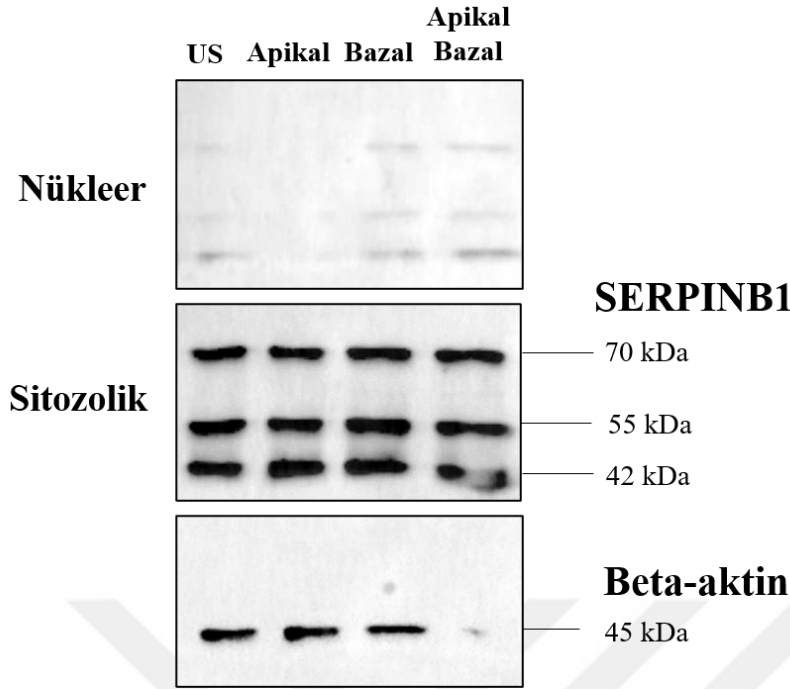
görülmüştür. Apikal, bazal ve apikal/bazal tüm nötrofil elastaz uyarımları neticesinde *SERPINB1* gen ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır. *SERPINB1* gen ifadesindeki bu azalma, 25 nM apikal ve bazal NE uyarımda da görülmektedir. NE uyarımı sonrasında BCL-2 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. *CAS8* gen ifadesinde apikal uyarım sonucunda azalma tespit edilmiştir.

4.4. SERPINB1 ve L-DNase II protein miktarlarının Western Blot ile belirlenmesi

ALI-Kültür yöntemiyle 21 gün süreyle farklılaştırılan BEAS-2B hücreleri apikal, bazal ve hem apikal hem bazal olmak üzere 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılmıştır. Uyarım sonucunda hücrelerden sitozolik ve nükleer kompartmanlar fraksiyonlanarak, hücre alt birimlerindeki SERPINB1 proteinin seviyeleri western blot yöntemiyle tayin edilmiştir.



Şekil 4.11. Nötrofil elastaz (10 nM) ile 3 saat süreyle apikal, bazal ve apikal/bazal olmak üzere uyarılan farklılaştırılmış BEAS-2B hücrelerinin sitozolik ve nükleer ekstraktlarındaki SERPINB1 ve Beta-aktin proteinlerinin Western Blot sonuçları. US: Uyarılmamış



Şekil 4.12. Nötrofil elastaz (25 nM) ile 3 saat süreyle apikal, bazal ve apikal/bazal olmak üzere uyarılan farklılaştırılmış BEAS-2B hücrelerinin sitozolik ve nükleer ekstraktlarındaki SERPINB1 ve Beta-aktin proteinlerinin Western Blot sonuçları. US: Uyarılmamış.

Elde edilen bant görüntüleri incelendiğinde sitozolik ekstraktlarda daha yoğun olmak üzere doğal formun dışında 2 ayrı bant gözlemlenmiştir. Görüntülenen bantlar içerisinde yaklaşık 70 kDa'da bir bant görülmesi, uyarım için kullanılan 30 kDa'lık nötrofil elastaz ile SERPINB1'in kompleks bir yapı oluşturduğu fikrini ortaya koymaktadır. Rekombinant SERPINB1 ile yapılan bir çalışmada, serin proteaz ailesine üye olan Proteinaz 3 ile birlikte inkübe edilmesi sonucu Proteinaz-3/SERPINB1 kompleksini temsil eden yaklaşık 70 kDa'lık ayrı bir bant ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da nötrofil elastazın inhibitörü ve yarı kararlı bir molekül olan SERPINB1 ile etkileşimi sonucu RCL bölgesinde meydana gelen değişikliklerle birlikte kompleks bir form oluşturabileceği kanısını ortaya konmaktadır [124]. SERPINB1'in esas olarak sitozolde konumlanan bir protein olduğu göz önünde bulundurulduğunda daha yoğun olarak sitozolik kompartmandaki bantların çıkması literatür bilgileriyle uyumludur [125]. Bant değerlendirilmesi protein markerı ve sitozolik beta-aktin proteinine göre yapılmıştır. Chan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sitozolik ve nükleer beta-aktin bant profilleri incelendiğinde nükleer kompartmanlarda tespit edilememiştir [126]. Bunun sonucunda beta-aktinin nükleer protein bant analizine uygun bir kontrol olmadığı belirlenmiştir.

Farklılaştırılmış bronş epitel hücrelerinin 10 nM nötrofil elastaz ile uyarımı sonucunda ise hücre alt birimlerinden fraksiyonlanan nükleer ve sitozolik SERPINB1 protein düzeyi western blot

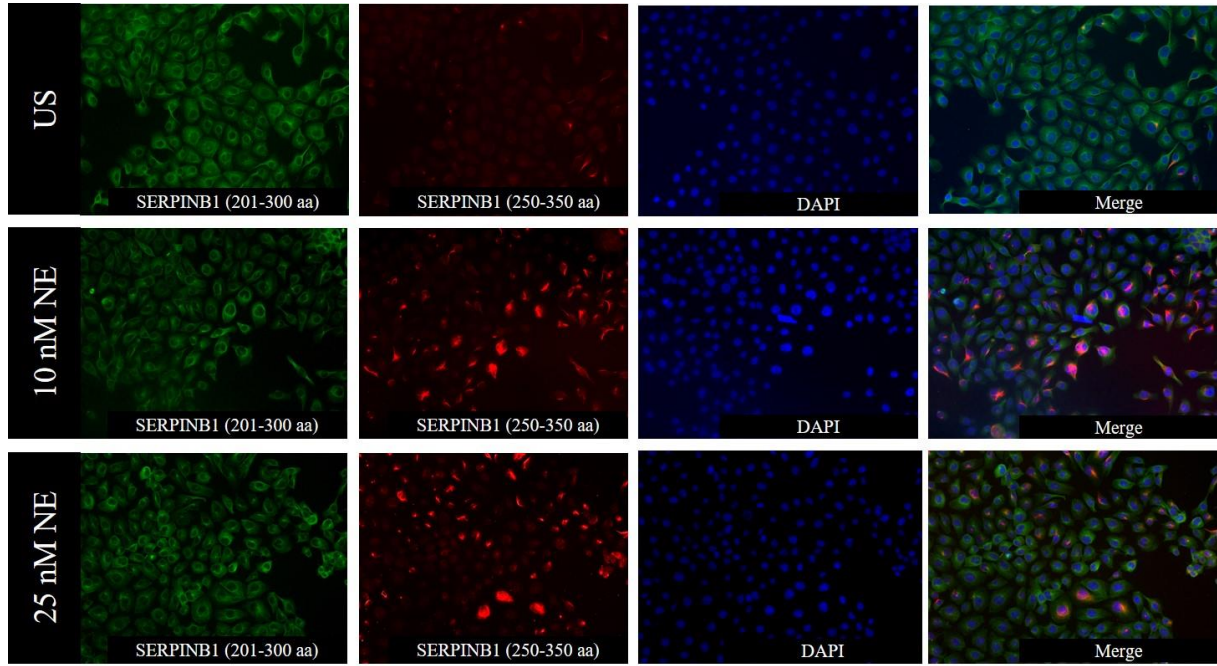
yöntemiyle tayin edilerek bant analizleri yapılmıştır. 25 nM'lık nötrofil elastaz uyarımının bant sayısı 10 nM nötrofil elastaz uyarımıyla benzerlik gösterirken bantların yoğunlukları 10 nM uyarımda daha az çıkmıştır.

Bant yoğunluğunda, konsantrasyonla ilişkili olarak meydana gelen değişim, ortamdaki nötrofil elastaz konsantrasyonunun SERPINB1'in konformasyonel değişikliğinde etkili olabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Özellikle doza bağlı olarak sitozolik ve nükleer fraksiyon örneklerinde değişen bant yoğunluğu, uyarım sonucunda SERPINB1'in farklı kompartmanlarda farklı seviyelerde bulunabileceği sonucunu desteklemektedir. Bu sonuç literatürde var olan, farklı uyarana maruziyet sonucunda SERPINB1'in hücre içerisindeki konumunu değiştirebileceğine dair verilerle de örtüşmektedir [125].

10 nM nötrofil elastazın apikal, bazal, apikal/bazal uyarımı ile birlikte sitozolde konumlanan 3 ayrı bantta da uyarılmamış koşula göre azalma olduğu görülmektedir. Nükleer kompartmanda bulunan SERPINB1 seviyeleri incelendiğinde apikal uyarımdaki bant yoğunluğunun bazal ve apikal/bazal uyarımın gerçekleştiği koşullara göre daha yüksek miktarda olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada yeni izole edilmiş ve olgun (24 saat) nötrofillerden fraksiyonlanan sitozolik alt birimlerin ve tüm hücre lizatındaki SERPINB1 protein seviyelerinde farklılıklar olduğu ortaya konmuştur [125].

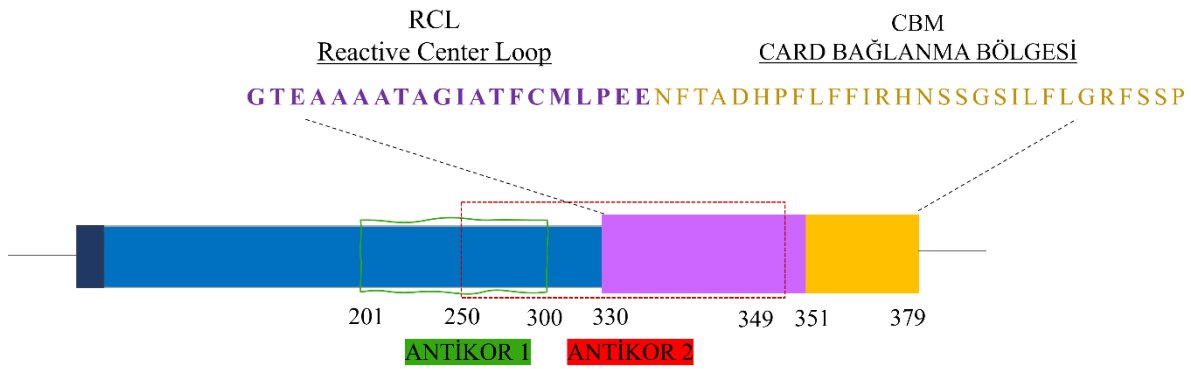
Ek olarak literatürde 27kDa büyüklüğünde olduğu belirtilen L-DNase II molekülüne yapılan protein analizlerinde rastlanamamıştır. Bunun sebebini açıklamaya yönelik yeni hücre kültür ve görüntüleme deneylerinin yapılması planlanmıştır.

4.5. Nötrofil Elastaz ile uyarılan hücrelerde immünofloresan analiz yapılarak SERPINB1 ve L-DNAz II moleküllerinin hücresel konumunun görüntülenmesi



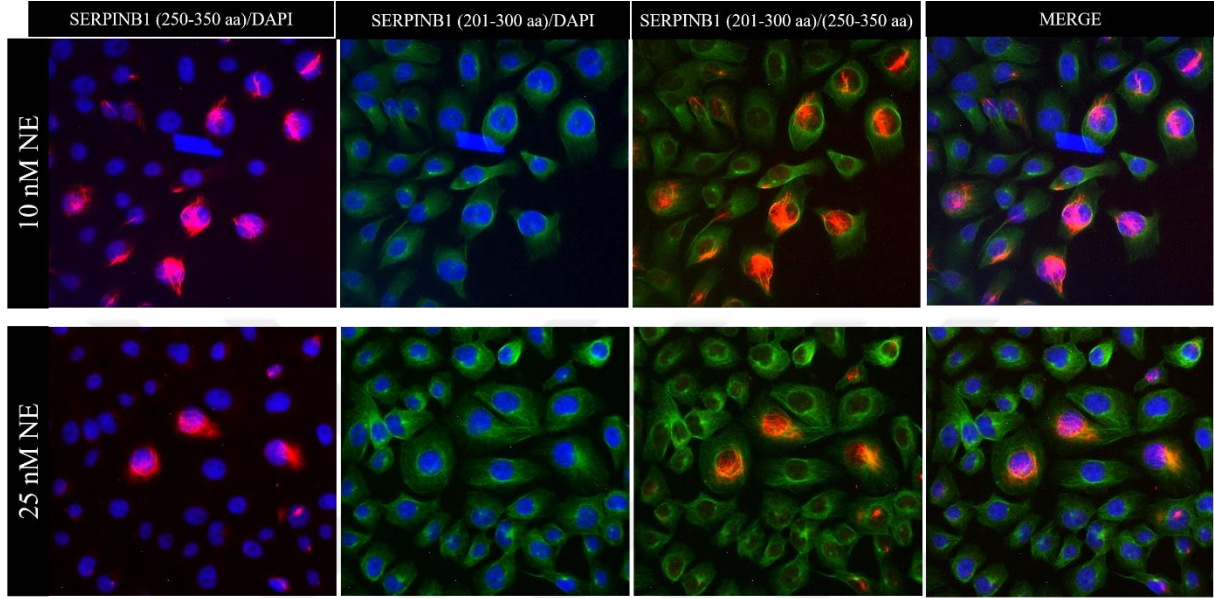
Şekil 4.13. 3 saat 10 nM nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde SERPINB1 ve L-DNase II düzeylerinin floresan mikroskop görüntü sonuçları (Kırmızı SERPINB1 proteinini, mavi renk (DAPI) çekirdeği göstermektedir) US: Uyarılmamış.

SERPINB1 protein miktarlarını görüntülemek için 24 kuyucuklu plakalar içerisindeki lamellerde çoğaltılan BEAS-2B hücrelerinin 10 ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarımı sonunda iki ayrı aminoasit dizisine özgü olan SERPINB1 antikorları kullanılarak immünofloresan analiz yapılmıştır.



Şekil 4.14. SERPINB1 antikorlarının tanıma bölgelerinin ve RCL, CARD domeinlerinin protein üzerindeki konumlarının şematik olarak gösterilmesi.

Uyarılmamış koşula göre, 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz uyarımının 250-350 amino asit aralığını tanıyan kırmızı floresan ışımaya veren SERPINB1 antikorunu tanıdığı protein miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Doza bağlı olarak ilgili antikorun tanıdığı protein seviyesinde artış tespit edilmiştir. 201-300 aa arasını tanıyan SERPINB1 antikorun ise uyarılmamış koşula göre hücre içerisindeki miktarının değişkenlik göstermediği görülmektedir.

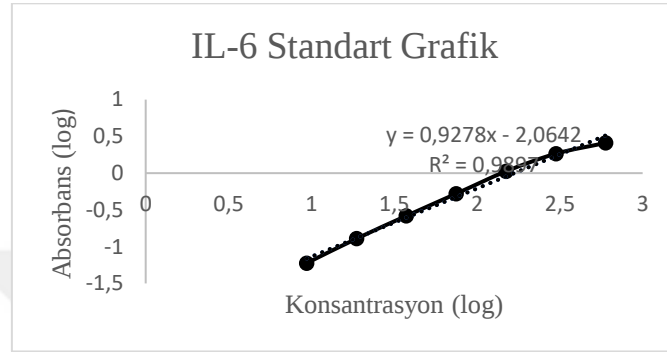


Şekil 4.15. 3 saat 10 nM nötrofil elastaz ile uyarılan BEAS-2B hücrelerinde SERPINB1 ve L-DNase II düzeylerinin floresan mikroskop görüntü sonuçları (Kırmızı SERPINB1 proteinini, mavi renk (DAPI boyası) çekirdeği göstermektedir) SERPINB1 antikor 1:50 dilüye edilerek kullanılmıştır.

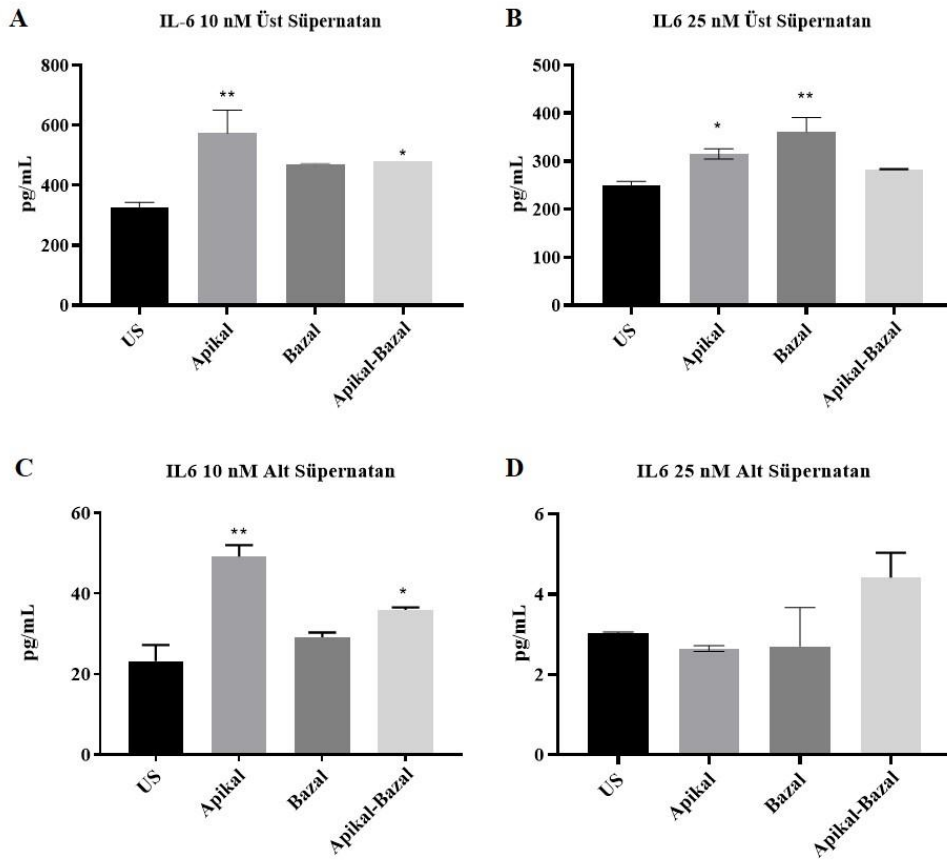
Boyama sırasında kullanılan iki ayrı diziye özgü SERPINB1 antikorunun bağlanma spesifiteleri incelendiğinde 250-350 aa dizisini tanıyan antikorun çoğunlukla çekirdeğin etrafında ya da içinde konumlandığı, 201-300 aa dizisini tanıyan antikorun ise hücrenin tüm alt birimlerinde konumlanabildiği tespit edilmiştir. Yeşil floresan ışımaya sebep olan antikorun çekirdek içerisine girmediği elde edilen görüntülerde gözlemlenmiş olsa da kırmızı floresan ışımaya sebep olan antikorun uyarım sonucunda çekirdekte konumlandığı belirlenmiştir. Nötrofil elastaz uyarımı sonucunda nükleer kompartmana geçiş yapan SERPINB1 formunda artış olabileceği, kırmızı floresan ışımaya sebep olan antikorun çekirdekteki miktarının artışı ile açıklanabileceği olası çıkarımlar arasındadır.

4.6. Nötrofil Elastaz ile uyarılan hücrelerden toplanan supernatanlardan ELISA yöntemiyle IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF proteinlerinin miktarının tayin edilmesi

Farklılaştırılmış BEAS-2B hücrelerinin apikal, bazal ve hem apikal hem bazal olmak üzere 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarımı sonucunda üst ve alt supernatanlardaki IL-6 protein seviyeleri ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir.



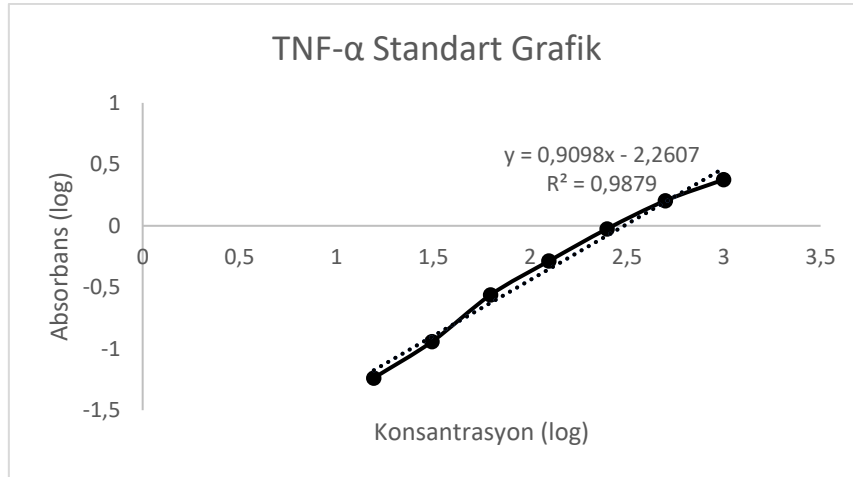
Şekil 4.16. IL-6 proteinin standart grafiği.



Şekil 4.17. 3D ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 3 saat (10 nM, 25 nM) nötrofil elastaz ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu üst (A, C) ve alt (B, D) süpernatantlarında IL-6 proteinin ELISA sonuçları. US: Uyarılmamış. (n: 3; p: 0,1234 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(*****)

10 nM ve 25 nM apikal nötrofil elastaz varlığında IL-6 seviyesi seviyesi anlamlı olarak değişirken, bazaldaki fark yalnızca 25 nM konsantrasyon NE varlığında ortaya çıkmıştır. 10 nM apikal ve bazal NE uyarımı IL-6 ifadesini anlamlı olarak arttırmıştır. 2012 yılında yapılan in vivo bir çalışmada, nötrofil elastaz ifadesi baskılanmış fare modeli kullanılarak, kontrol farenin ve NE^{-/-} farenin bronş alveolar lavaj sıvılarındaki IL-6 protein düzeyinde araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda da NE^{-/-} farelerin IL-6 protein seviyesi kontrol farelere oranla daha düşük miktarda tespit edilmiştir [127]. Tomas ve arkadaşlarının, insan bronş epitel hücre hattı ile yaptıkları bir çalışmada, hücreler 100 nM nötrofil elastaz ile 4 saat boyunca uyarılmış ve bu uyarım sonrasında IL-6 protein seviyesinde anlamlı bir artış tespit etmişlerdir [128]. Literatürdeki bu sonuçlar, 10 nM ve 25 nM apikal nötrofil elastaz uyarımı sonucu artış gösteren IL-6 seviyesiyle benzerlik göstermektedir.

Farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 10 ve 25 nM nötrofil elastaz ile apikal, bazal ve hem apikal hem bazal olarak uyarımı sonucunda alt ve üst supernatantlardan TNF-α proteinin seviyesine bakılmıştır.

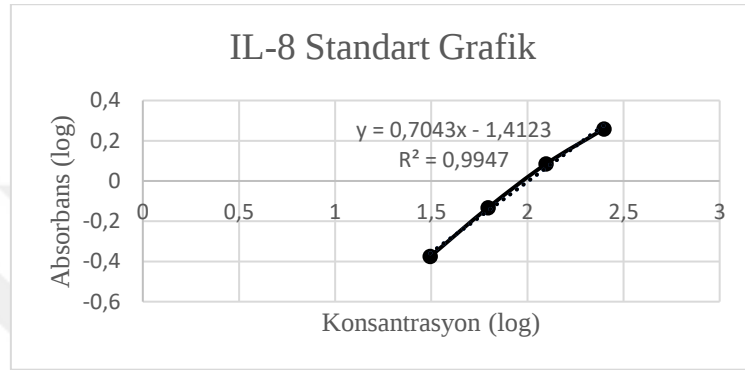


Şekil 4.18. TNF-α proteinin standart grafiği

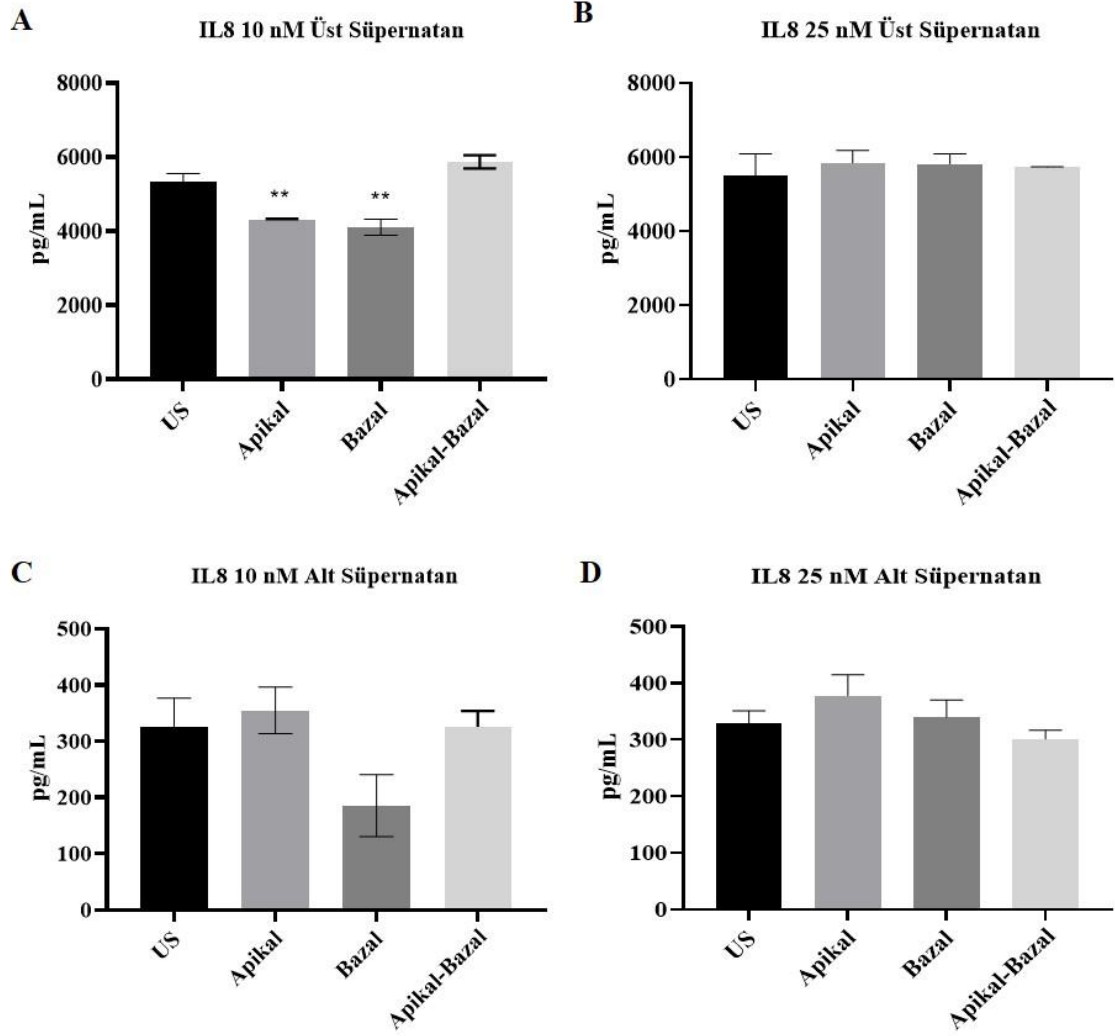
Kistik fibroz hastalarından izole edilen nötrofiller ile yapılan bir çalışmada, IL-8 ve TNF-α'nın nötrofil aktivasyonu ve nötrofil elastaz salımında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [129]. 2012 yılında Julien ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise nötrofil elastaz ifadesi baskılanmış fare modelleriyle çalışılmış ve NE^{-/-} fare modellerinin bronş alveolar lavaj

sıvılarında kontrol fare grubuna göre TNF- α seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir [130]. Tez kapsamında yapılan analiz sonucunda ise alt ve üst supernatanlarda TNF- α protein miktarının kitin tespit aralığının altında kaldığı belirlenmiştir. (Kitin hassasiyet: 4 – 400 pg/mL)

Farklılaştırılmış hücrelerin apikal, bazal ve hem apikal hem bazal olmak üzere 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılması sonucunda üst ve alt supernatanlarındaki IL-8 protein seviyeleri ELISA yöntemiyle bakılmıştır.



Şekil 4.19. IL-8 proteinin standart grafiği

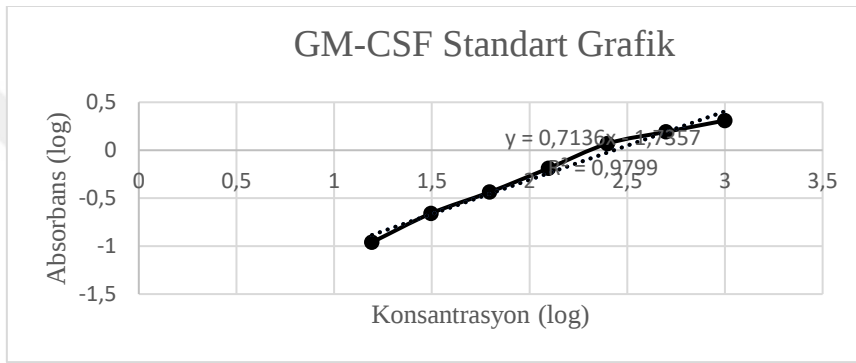


Şekil 4.20. 3D ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 3 saat (10 nM, 25 nM) nötrofil elastaz ve 1 saat kamptotesin (20 uM) ile uyarımı sonucu üst (A, C) ve alt (B, D) süpernatantlarında IL-8 proteinin ELISA sonuçları. US: Uyarılmamış. (n: 3; p: 0,1234 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002(***), <0.0001(*****)

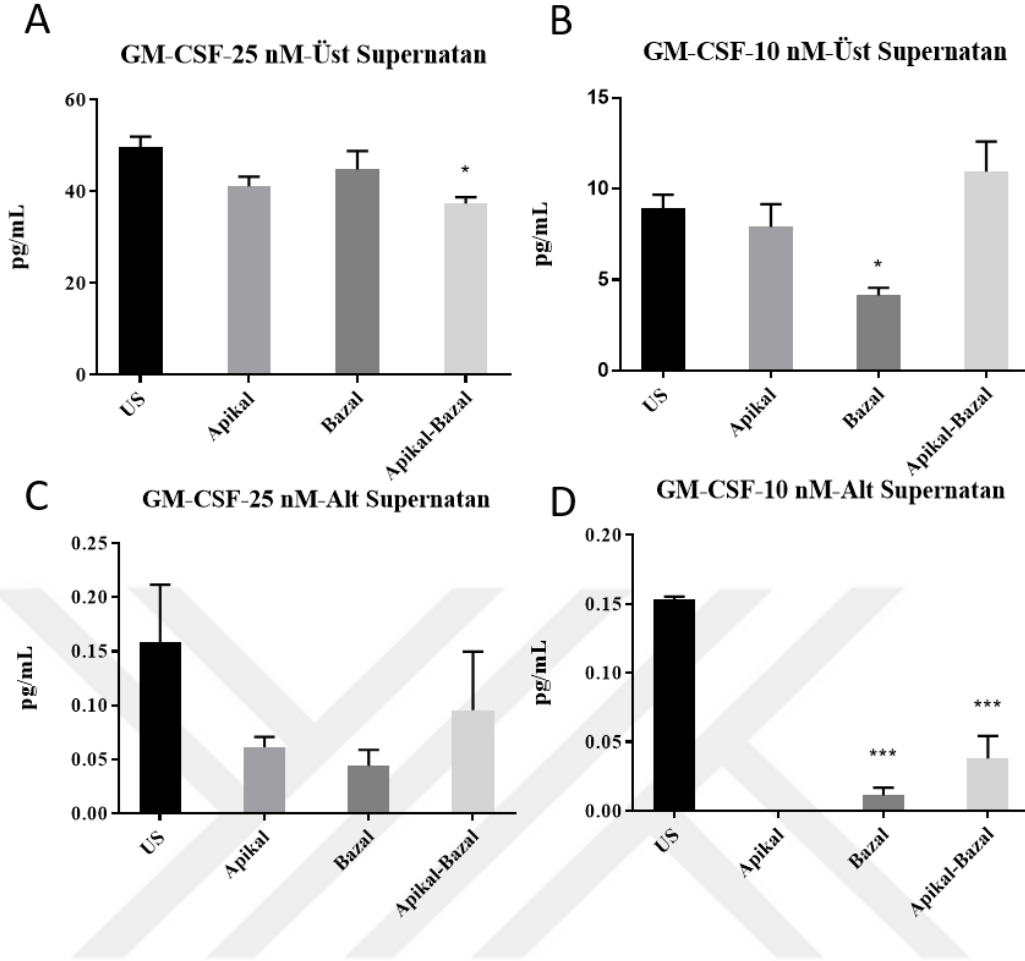
Yapılan ELISA analizlerinde apikal ve bazal 10 nM NE uyarımının IL-8 protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir. İnsan bronş epitel hücre hattının 4 saatlik 100 nM nötrofil elastaz uyarımı sonrasında IL-8'in protein seviyesindeki değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı Tomas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [128]. Fakat literatürdeki bir başka makalede, primer nazal epitel hücrelerinin ve nazal epitel hücre hattının 24 saat boyunca 1 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucu IL-8 seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiş [131] ve bunun sonucunda nötrofil elastazın hem primer epitel hücreler için hem de epitel hücre hatları için IL-8 salınımını tetikleyici bir molekül olabileceği görüşü benimsenmiştir. Catherine ve arkadaşları tarafından yürütülen bir başka

çalışmada da insan bronş epitel hücre hattı, 10 nM nötrofil elastaz ile 4 saat inkübe edilmiş ve IL-8'in protein seviyesinde bir artış olduğu tespit edilmiştir [132]. Literatürdeki bu bilgilerde, NE uyarımının epitel hücrelerden IL-8 sitokin cevabının çelişkili olduğu bulunmuş olup, elde ettiğimiz ELISA sonuçlarında da 25 nM NE uyarımının IL-8 protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı değişime neden olmadığı görülmektedir.

Farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin apikal, bazal ve hem apikal hem bazal olmak üzere 10 nM ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılması sonucunda üst ve alt supernatanlarındaki GM-CSF protein seviyeleri ELISA yöntemiyle bakılmıştır.



Şekil 4.21. GM-CSF proteinin standart grafiği.



Şekil 4.22. 3D ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin 3 saat (10 nM, 25 nM) nötrofil elastaz ve 1 saat kamptotesin (20 μ M) ile uyarımı sonucu üst (A, C) ve alt (B, D) süpernatantlarında GM-CSF proteinin ELISA sonuçları. US: Uyarılmamış. (n: 3; p: 0,1234 (ns) 0.0332(*), 0.0021(**), 0.0002***), <0.0001****))

Nötrofil elastaz uyarımı sonucunda epitel hücrelerde GM-CSF'in protein düzeyinde tespitine ilişkin sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada, 100 nM nötrofil elastaz ile bronş epitel hücreleri 4 saat uyarılmış ve bu uyarım sonucunda süpernatanttaki GM-CSF seviyesinin kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiş [133]. Marie ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da, 24 saat boyunca 1 nM ve 10 nM NE ile uyarılmış nazal epitel hücrelerin, GM-CSF salımında artış olduğu tespit edilmiş ve elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda nötrofil elastazın, epitel hücreler için GM-CSF indükleyicisi olabileceğini çıkarımında bulunulmuştur [131]. Fakat ELISA deneylerinde elde edilen sonuçlar literatür ile benzerlik göstermemektedir. 10 nM NE uyarımının alt süpernatantları incelendiğinde ekseriyetle bütün koşullarda azalma tespit edilmekle birlikte,

apikal olarak verilen uyarım sonucunda GM-CSF protein seviyesi kitin tespit aralığının altında bir sonuç gösterdiği için değeri sıfır olarak kabul edilerek grafiğe yansıtılmıştır. Aynı şekilde 25 nM NE uyarımının alt supernatanlarındaki hücre dışına salınan GM-CSF seviyesi incelendiğinde uyarılmamış koşula göre azalma görülmektedir.



5. YORUM

Nötrofillerin granüllerinden salınan bir proteaz olan nötrofil elastazın birçok kronik inflamatuvar akciğer hastalığında arttığı ve hastalığın patogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir. Nötrofil elastazın progresif şekilde artması, epitel hücre hasarına neden olmakla birlikte hücrelerde çeşitli sinyal yollarını aktive etmektedir. Nötrofil elastazın en etkili inhibitörlerinden birisi nötrofil serin proteaz inhibitörü olan SERPINB1'dir. Bu tez çalışması kapsamında bronş epitel hücreleri, nötrofil elastaz ile stimüle edilerek bu hücrelerdeki SERPINB1 ve SERPINB1'den türeyen L-DNase II molekülü aracılı anti apoptotik ve pro apoptotik cevaplar RNA ve protein düzeyinde incelenmiştir. Canlılık ve sitotoksikite deneyleri yapılarak uygun doz ve süre belirlenmiştir. ALI-kültür yöntemiyle BEAS-2B hücreleri farklılaştırılarak belirlenen doz ve sürelerde uyarım gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtildiği gibidir.

- Literatürle uyumlu olarak hücrelerin farklı konsantrasyonlarda nötrofil elastaz ile uyarılması hücre canlılığını etkilediği görülmüştür. Yapılan MTT testi sonucunda 50 nM ve üzeri dozların hücreler için radikal bir sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. 3 saat ve 6 saat NE uyarımı hücre canlılığını sırasıyla %28 ile %52 oranında azaltmıştır. Ayrıca 400 nM NE uyarımı sonucunda ise %70 oranında azalmıştır.
- AO/PI ikili boya analizi sonucunda nötrofil elastazın 50 nM ve üzeri dozlarının hücrelerin morfolojilerinde değişikliklere sebep olduğu görülmüştür. Özellikle 1 saat 10 nM ve 3 saat 10 nM, 25 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucunda hücrelerde görüntü düzeyinde erken/geç apoptoz evresi gözlemlenmiştir.
- Hücrelerin farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde nötrofil elastaz ile uyarılmasının SERPINB1'in molekül ağırlığında değişikliklere yol açabileceği ve bu değişimlerin, uyarının konsantrasyonuna bağlı olarak ara formlar oluşabileceği ihtimali protein analizleri sonucu ortaya konmuştur. Hücrelerin 3 ve 6 saat 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılmasıyla 50-60 kDa arası ikinci bir bant oluşumu gözlemlenmiştir. İkinci bantın yoğunluğu maruziyet süresine bağlı olarak artmıştır.
- 5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda NE uyarımının LDH salımına yol açmadığı ve nekroza sebebiyet vermediği ortaya konmuştur.

- 5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda nötrofil elastaz uyarımının Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 aktivitelerini etkilemediği görülmektedir.
- 5 nM, 10 nM, 25 nM NE uyarımıyla mitokondriyal transmembran potansiyelinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiş, 50 nM NE uyarımında ise %20 oranında membran potansiyelinde azalmaya yol açmıştır. Görüntü düzeyinde JC-1 boyası aracılığıyla agregat ve monomer seviyeleri incelendiği artana dozlarda membran geçirgenliğinin arttığı görülmektedir.
- Yapılan sitotoksosite ve canlılık deneyleri sonucunda 3 saat 10 ve 25 nM NE elastaz uyarımının uygun olduğuna karar verilmiştir.
- ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan hücreler 10 ve 25 nM NE ile uyarımı sonucu CAS3, CAS8, CAS9 ifadelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuç literatürde kaspaz bağımsız ölüm yolağı olarak belirtilen LEI/L-DNase II yolağıyla benzerlik göstermektedir.
- 10 ve 25 nM nötrofil elastaz uyarımı sonucunda SERPINB1 gen ifadesi azalmıştır. Nötrofil elastaz uyarımı ile görülen bu düşüşün hücrenin uyarana karşı farklı bir anti-apoptotik molekül üzerinden cevap oluşturma ihtimalini ya da LEI/L-DNase II yolağında gen düzeyinde müdahalesi olası çıkarımlar arasındadır.
- 10 ve 25 nM nötrofil elastaz ile uyarılan hücrelerden fraksiyonlanan nükleer ve sitozolik kompartmanlardaki SERPINB1 miktarının farklılık gösterdiği görülmektedir.
- SERPINB1'in RCL bölgesini içeren (250-350 aa) antikorunun ekseriyetle çekirdekte konumlanan SERPINB1 proteinini tanıdığı görülmüştür. RCL dışında bir bölgeye özgü seçilen (201-300 aa) antikor ise hücrenin çekirdek haricinde farklı alt birimlerinde lokalize olabildiği görülmektedir.
- SERPINB1'in NE gibi proteazlar ile atağa uğraması sonucu kesilerek RCL bölgesindeki endonükleaz ve NLS (nükleer lokalizasyon sinyali) kısımlarının açığa çıktığı bilinmektedir. Bu nedenle NE ile uyarılan hücrelerde SERPINB1 molekülünün konformasyonel değişikliğe uğrayarak çekirdeğe göç ettiği ve antikor bağlanma bölgesinin açığa çıkmış olabileceği çıkarımlar arasındadır.
- Hücrelerin apikal ve bazal 10 nM NE uyarımı sonucu IL-6 ifadesini anlamlı olarak arttırdığı, IL-8 seviyesini ise düşürdüğü görülmüştür. 10 ve 25 nM her iki konsantrasyonda da GM-CSF seviyesinin azaldığı görülmüştür.
- TNF- α için yapılan ELISA deneylerinde kitin tespit aralığının altında kaldığı için sonuç alınamamıştır.

- ALI-kültür yöntemiyle farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin apikal, bazal ve apikal/bazal olmak üzere nötrofil elastaz ile uyarılması sonucu SERPINB1 molekülünde ara form oluşumuna ve hücre alt birimleri arasında uyarının konsantrasyonuna bağlı olarak miktarında değişkenlik yaratmasında aracılık edebileceğinin gösterilmesi bu çalışmanın özgün yönlerinden birisidir.



6. KAYNAKLAR

- [1] A. W. Segal, "How neutrophils kill microbes," (in eng), *Annual review of immunology*, vol. 23, pp. 197-223, 2005, doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.
- [2] B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, and A. Zychlinsky, "Neutrophil function: from mechanisms to disease," (in eng), *Annu Rev Immunol*, vol. 30, pp. 459-89, 2012, doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.
- [3] E. Mortaz, S. D. Alipoor, I. M. Adcock, S. Mumby, and L. Koenderman, "Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation," (in English), *Frontiers in Immunology*, Review vol. 9, no. 2171, 2018-October-02 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02171.
- [4] J. W. Leiding, "Neutrophil Evolution and Their Diseases in Humans," (in eng), *Frontiers in immunology*, vol. 8, pp. 1009-1009, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01009.
- [5] C. Rosales, "Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?," (in English), *Frontiers in Physiology*, Review vol. 9, no. 113, 2018-February-20 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00113.
- [6] S. Völs, R. Sionov, and Z. Granot, "Always Look On the Bright Side: Anti-Tumor Functions of Neutrophils," *Current pharmaceutical design*, vol. 23, 07/04 2017, doi: 10.2174/1381612823666170704125420.
- [7] F. Mollinedo, "Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis," (in eng), *Trends Immunol*, vol. 40, no. 3, pp. 228-242, Mar 2019, doi: 10.1016/j.it.2019.01.006.
- [8] C. Yin and B. Heit, "Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules," (in eng), *Cell Tissue Res*, vol. 371, no. 3, pp. 455-471, Mar 2018, doi: 10.1007/s00441-017-2731-8.
- [9] N. A. Louis and C. A. Parkos, "Chapter 45 - The Neutrophil," in *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*, J. Mestecky, W. Strober, M. W. Russell, B. L. Kelsall, H. Cheroutre, and B. N. Lambrecht Eds. Boston: Academic Press, 2015, pp. 915-928.
- [10] S. L. Maas, O. Soehnlein, and J. R. Viola, "Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta," (in English), *Frontiers in Immunology*, Review vol. 9, no. 2739, 2018-November-27 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02739.
- [11] K. Ley *et al.*, "Neutrophils: New insights and open questions," (in eng), *Sci Immunol*, vol. 3, no. 30, Dec 7 2018, doi: 10.1126/sciimmunol.aat4579.
- [12] A. Zarbock and K. Ley, "Neutrophil adhesion and activation under flow," (in eng), *Microcirculation*, vol. 16, no. 1, pp. 31-42, 2009, doi: 10.1080/10739680802350104.
- [13] L. Kjeldsen, D. F. Bainton, H. Sengeløv, and N. Borregaard, "Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation," (in eng), *Blood*, vol. 82, no. 10, pp. 3183-91, Nov 15 1993.
- [14] N. Borregaard, L. Kjeldsen, K. Lollike, and H. Sengeløv, "Ca²⁺-dependent translocation of cytosolic proteins to isolated granule subpopulations and plasma membrane from human neutrophils," *FEBS Letters*, vol. 304, no. 2, pp. 195-197, 1992/06/15/ 1992, doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80617-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80617-P).

- [15] D. M. Underhill and A. Ozinsky, "Phagocytosis of microbes: complexity in action," (in eng), *Annu Rev Immunol*, vol. 20, pp. 825-52, 2002, doi: 10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744.
- [16] A. W. Segal, M. Geisow, R. Garcia, A. Harper, and R. Miller, "The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH," (in eng), *Nature*, vol. 290, no. 5805, pp. 406-9, Apr 2 1981, doi: 10.1038/290406a0.
- [17] A. Jankowski, C. C. Scott, and S. Grinstein, "Determinants of the phagosomal pH in neutrophils," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 277, no. 8, pp. 6059-66, Feb 22 2002, doi: 10.1074/jbc.M110059200.
- [18] T. T. Luong and C. Y. Lee, "Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence," (in eng), *Infect Immun*, vol. 70, no. 7, pp. 3389-95, Jul 2002, doi: 10.1128/iai.70.7.3389-3395.2002.
- [19] L. A. Allen, B. R. Beecher, J. T. Lynch, O. V. Rohner, and L. M. Wittine, "*Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release," (in eng), *J Immunol*, vol. 174, no. 6, pp. 3658-67, Mar 15 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3658.
- [20] R. L. McCaffrey *et al.*, "Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 88, no. 4, pp. 791-805, Oct 2010, doi: 10.1189/jlb.1209811.
- [21] L. Staali, S. Bauer, M. Mörgelin, L. Björck, and H. Tapper, "*Streptococcus pyogenes* bacteria modulate membrane traffic in human neutrophils and selectively inhibit azurophilic granule fusion with phagosomes," (in eng), *Cell Microbiol*, vol. 8, no. 4, pp. 690-703, Apr 2006, doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00662.x.
- [22] K. A. Joiner, T. Ganz, J. Albert, and D. Rotrosen, "The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 109, no. 6 Pt 1, pp. 2771-82, Dec 1989, doi: 10.1083/jcb.109.6.2771.
- [23] M. B. Hampton, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn, "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing," (in eng), *Blood*, vol. 92, no. 9, pp. 3007-17, Nov 1 1998.
- [24] R. A. Seger, "Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment," (in eng), *Neth J Med*, vol. 68, no. 11, pp. 334-40, Nov 2010.
- [25] B. Shao, A. Belaaouaj, C. L. Verlinde, X. Fu, and J. W. Heinecke, "Methionine sulfoxide and proteolytic cleavage contribute to the inactivation of cathepsin G by hypochlorous acid: an oxidative mechanism for regulation of serine proteinases by myeloperoxidase," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 280, no. 32, pp. 29311-21, Aug 12 2005, doi: 10.1074/jbc.M504040200.
- [26] D. Johnson and J. Travis, "The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 254, no. 10, pp. 4022-6, May 25 1979.
- [27] V. Brinkmann *et al.*, "Neutrophil extracellular traps kill bacteria," (in eng), *Science*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532-5, Mar 5 2004, doi: 10.1126/science.1092385.

- [28] T. A. Fuchs *et al.*, "Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps," (in eng), *The Journal of cell biology*, vol. 176, no. 2, pp. 231-241, 2007, doi: 10.1083/jcb.200606027.
- [29] C. F. Urban *et al.*, "Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*," (in eng), *PLoS Pathog*, vol. 5, no. 10, p. e1000639, Oct 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000639.
- [30] V. Papayannopoulos and A. Zychlinsky, "NETs: a new strategy for using old weapons," (in eng), *Trends Immunol*, vol. 30, no. 11, pp. 513-21, Nov 2009, doi: 10.1016/j.it.2009.07.011.
- [31] S. Patel *et al.*, "Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation," (in eng), *Nitric Oxide*, vol. 22, no. 3, pp. 226-34, Apr 1 2010, doi: 10.1016/j.niox.2010.01.001.
- [32] K. D. Metzler *et al.*, "Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity," (in eng), *Blood*, vol. 117, no. 3, pp. 953-9, Jan 20 2011, doi: 10.1182/blood-2010-06-290171.
- [33] A. Hakkim *et al.*, "Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation," (in eng), *Nat Chem Biol*, vol. 7, no. 2, pp. 75-7, Feb 2011, doi: 10.1038/nchembio.496.
- [34] V. Papayannopoulos, K. D. Metzler, A. Hakkim, and A. Zychlinsky, "Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps," (in eng), *J Cell Biol*, vol. 191, no. 3, pp. 677-91, Nov 1 2010, doi: 10.1083/jcb.201006052.
- [35] A. Hakkim *et al.*, "Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 21, pp. 9813-8, May 25 2010, doi: 10.1073/pnas.0909927107.
- [36] K. Kessenbrock *et al.*, "Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis," (in eng), *Nat Med*, vol. 15, no. 6, pp. 623-5, Jun 2009, doi: 10.1038/nm.1959.
- [37] V. Marcos *et al.*, "CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation," (in eng), *Nat Med*, vol. 16, no. 9, pp. 1018-23, Sep 2010, doi: 10.1038/nm.2209.
- [38] J. M. Sallenave, M. Si Tahar, G. Cox, M. Chignard, and J. Gauldie, "Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 61, no. 6, pp. 695-702, Jun 1997, doi: 10.1002/jlb.61.6.695.
- [39] K. Farley, J. M. Stolley, P. Zhao, J. Cooley, and E. Remold-O'Donnell, "A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation," (in eng), *J Immunol*, vol. 189, no. 9, pp. 4574-81, Nov 1 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1201167.
- [40] K. Zabieglo *et al.*, "The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 98, no. 1, pp. 99-106, Jul 2015, doi: 10.1189/jlb.4AB1114-543R.
- [41] A. Belaouaj *et al.*, "Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis," *Nature Medicine*, vol. 4, no. 5, pp. 615-618, 1998/05/01 1998, doi: 10.1038/nm0598-615.

- [42] E. P. Reeves *et al.*, "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux," *Nature*, vol. 416, no. 6878, pp. 291-297, 2002/03/01 2002, doi: 10.1038/416291a.
- [43] J. Tkalcovic, M. Novelli, M. Phylactides, J. P. Iredale, A. W. Segal, and J. Roes, "Impaired Immunity and Enhanced Resistance to Endotoxin in the Absence of Neutrophil Elastase and Cathepsin G," *Immunity*, vol. 12, no. 2, pp. 201-210, 2000/02/01/ 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80173-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80173-9).
- [44] C. T. N. Pham, "Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 7, pp. 541-550, 2006/07/01 2006, doi: 10.1038/nri1841.
- [45] C. Heit *et al.*, "Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily," vol. 7, no. 1, p. 22, 2013.
- [46] J. L. Young, G. K. Sukhova, D. Foster, W. Kiesel, P. Libby, and U. Schonbeck, "The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells," (in eng), *J Exp Med*, vol. 191, no. 9, pp. 1535-44, May 1 2000.
- [47] J. Cooley, T. K. Takayama, S. D. Shapiro, N. M. Schechter, and E. Remold-O'Donnell, "The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites," (in eng), *Biochemistry*, vol. 40, no. 51, pp. 15762-70, Dec 25 2001, doi: 10.1021/bi0113925.
- [48] J. A. Huntington, R. J. Read, and R. W. Carrell, "Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation," (in eng), *Nature*, vol. 407, no. 6806, pp. 923-6, Oct 19 2000, doi: 10.1038/35038119.
- [49] J. Tombran-Tink, "The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling," (in eng), *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 10, pp. 2131-49, Sep 1 2005.
- [50] T. W. Lee, J. M. Montgomery, and N. P. Birch, "The serine protease inhibitor neuroserpin regulates the growth and maturation of hippocampal neurons through a non-inhibitory mechanism," *J Neurochem*, vol. 121, no. 4, pp. 561-74, May 2012, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07639.x.
- [51] G. A. Silverman *et al.*, "Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis," (in eng), *Cell Mol Life Sci*, vol. 61, no. 3, pp. 301-25, Feb 2004, doi: 10.1007/s00018-003-3240-3.
- [52] K. Izuhara, S. Ohta, S. Kanaji, H. Shiraishi, and K. Arima, "Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family," (in eng), *Cell Mol Life Sci*, vol. 65, no. 16, pp. 2541-53, Aug 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8049-7.
- [53] C. Benarafa, T. E. LeCuyer, M. Baumann, J. M. Stolley, T. P. Cremona, and E. Remold-O'Donnell, "SerpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow," (in eng), *Journal of leukocyte biology*, vol. 90, no. 1, pp. 21-29, 2011, doi: 10.1189/jlb.0810461.
- [54] S. S. Burgener, M. Baumann, P. Basilico, E. Remold-O'Donnell, I. P. Touw, and C. Benarafa, "Myeloid conditional deletion and transgenic models reveal a threshold for

- the neutrophil survival factor Serpinb1," (in eng), *Biol Chem*, vol. 397, no. 9, pp. 897-905, Sep 1 2016, doi: 10.1515/hsz-2016-0132.
- [55] C. M. Ahn, H. Sandler, and T. Saldeen, "Decreased lung hyaluronan in a model of ARDS in the rat: effect of an inhibitor of leukocyte elastase," (in eng), *Ups J Med Sci*, vol. 117, no. 1, pp. 1-9, 2012, doi: 10.3109/03009734.2011.622812.
- [56] C. Benarafa, G. P. Priebe, and E. Remold-O'Donnell, "The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection," (in eng), *J Exp Med*, vol. 204, no. 8, pp. 1901-9, Aug 6 2007, doi: 10.1084/jem.20070494.
- [57] F. Loison, Y. Xu, and H. R. Luo, "Proteinase 3 and Serpin B1: a novel pathway in the regulation of caspase-3 activation, neutrophil spontaneous apoptosis, and inflammation," (in eng), *Inflamm Cell Signal*, vol. 1, no. 6, p. e462, 2014, doi: 10.14800/ics.462.
- [58] C. Benarafa, T. E. LeCuyer, M. Baumann, J. M. Stolley, T. P. Cremona, and E. Remold-O'Donnell, "SerpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 90, no. 1, pp. 21-9, Jul 2011, doi: 10.1189/jlb.0810461.
- [59] C. Benarafa, G. P. Priebe, and E. Remold-O'Donnell, "The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection," (in eng), *The Journal of experimental medicine*, vol. 204, no. 8, pp. 1901-1909, 2007, doi: 10.1084/jem.20070494.
- [60] D. Gong, K. Farley, M. White, K. L. Hartshorn, C. Benarafa, and E. Remold-O'Donnell, "Critical role of serpinB1 in regulating inflammatory responses in pulmonary influenza infection," (in eng), *J Infect Dis*, vol. 204, no. 4, pp. 592-600, 2011, doi: 10.1093/infdis/jir352.
- [61] K. Uchiyama *et al.*, "Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 302, no. 10, pp. G1163-G1170, 2012/05/15 2012, doi: 10.1152/ajpgi.00292.2011.
- [62] M. F. Counis *et al.*, "Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 5, no. 4, pp. 251-61, Apr 1998, doi: 10.1038/sj.cdd.4400351.
- [63] E. Chaudun *et al.*, "DNA strand breakage during physiological apoptosis of the embryonic chick lens: free 3' OH end single strand breaks do not accumulate even in the presence of a cation-independent deoxyribonuclease," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 158, no. 2, pp. 354-64, Feb 1994, doi: 10.1002/jcp.1041580218.
- [64] A. Torriglia, E. Chaudun, F. Chany-Fournier, J. C. Jeanny, Y. Courtois, and M. F. Counis, "Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 270, no. 48, pp. 28579-85, Dec 1 1995, doi: 10.1074/jbc.270.48.28579.
- [65] A. Torriglia *et al.*, "L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 18, no. 6, pp. 3612-9, Jun 1998, doi: 10.1128/mcb.18.6.3612.
- [66] L. Padron-Barthe, C. Leprêtre, E. Martin, M. F. Counis, and A. Torriglia, "Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an

- endonuclease involved in apoptosis," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 27, no. 11, pp. 4028-36, Jun 2007, doi: 10.1128/mcb.01959-06.
- [67] C. Leprêtre, Y. Fleurier, E. Martin, and A. Torriglia, "Nuclear export of LEI/L-DNase II by Crm1 is essential for cell survival," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1783, no. 6, pp. 1068-1075, 2008/06/01/ 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.02.012>.
- [68] M. F. Counis and A. Torriglia, "DNases and apoptosis," (in eng), *Biochem Cell Biol*, vol. 78, no. 4, pp. 405-14, 2000.
- [69] S. W. Tait, G. Ichim, and D. R. Green, "Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death," (in eng), *J Cell Sci*, vol. 127, no. Pt 10, pp. 2135-44, May 15 2014, doi: 10.1242/jcs.093575.
- [70] Z. Fan, P. J. Beresford, D. Y. Oh, D. Zhang, and J. Lieberman, "Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor," (in eng), *Cell*, vol. 112, no. 5, pp. 659-72, Mar 7 2003, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00150-8.
- [71] A. Torriglia, C. Leprêtre, L. Padrón-Barthe, S. Chahory, and E. Martin, "Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis," (in eng), *Biochem Pharmacol*, vol. 76, no. 11, pp. 1490-502, Dec 1 2008, doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.039.
- [72] C. Artus *et al.*, "CD44 ligation induces caspase-independent cell death via a novel calpain/AIF pathway in human erythroleukemia cells," (in eng), *Oncogene*, vol. 25, no. 42, pp. 5741-51, Sep 21 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209581.
- [73] S. Altairac, S. Zeggai, P. Perani, Y. Courtois, and A. Torriglia, "Apoptosis induced by Na⁺/H⁺ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 10, no. 5, pp. 548-57, May 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401195.
- [74] A. Torriglia, E. Martin, and I. Jaadane, "The hidden side of SERPINB1/Leukocyte Elastase Inhibitor," (in eng), *Semin Cell Dev Biol*, vol. 62, pp. 178-186, Feb 2017, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.010.
- [75] A. Torriglia, E. Chaudun, F. Chany-Fournier, Y. Courtois, and M.-F. Counis, "Involvement of L-DNase II in Nuclear Degeneration during Chick Retina Development," *Experimental Eye Research*, vol. 72, no. 4, pp. 443-453, 2001/04/01/ 2001, doi: <https://doi.org/10.1006/exer.2000.0969>.
- [76] S. Altairac, S. Zeggai, P. Perani, Y. Courtois, and A. Torriglia, "Apoptosis induced by Na⁺/H⁺ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway," *Cell Death & Differentiation*, vol. 10, no. 5, pp. 548-557, 2003/05/01 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401195.
- [77] L. Huc *et al.*, "Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 208, no. 3, pp. 527-37, Sep 2006, doi: 10.1002/jcp.20686.
- [78] A. Torriglia, I. Jaadane, and C. Lebon, "Mechanisms of cell death in neurodegenerative and retinal diseases: common pathway?," (in eng), *Curr Opin Neurol*, vol. 29, no. 1, pp. 55-60, Feb 2016, doi: 10.1097/wco.0000000000000272.
- [79] C. A. Belmokhtar, A. Torriglia, M. F. Counis, Y. Courtois, A. Jacquemin-Sablon, and E. Ségal-Bendirdjian, "Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase

- complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 254, no. 1, pp. 99-109, Jan 10 2000, doi: 10.1006/excr.1999.4737.
- [80] S. Chahory, N. Keller, E. Martin, B. Omri, P. Crisanti, and A. Torriglia, "Light induced retinal degeneration activates a caspase-independent pathway involving cathepsin D," (in eng), *Neurochem Int*, vol. 57, no. 3, pp. 278-87, Oct 2010, doi: 10.1016/j.neuint.2010.06.006.
- [81] L. Padrón-Barthe, J. Courta, C. Leprêtre, A. Nagbou, and A. Torriglia, "Leukocyte Elastase Inhibitor, the precursor of L-DNase II, inhibits apoptosis by interfering with caspase-8 activation," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1783, no. 10, pp. 1755-66, Oct 2008, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.06.018.
- [82] S. Altairac, S. C. Wright, Y. Courtois, and A. Torriglia, "L-DNase II activation by the 24 kDa apoptotic protease (AP24) in TNFalpha-induced apoptosis," (in eng), *Cell Death Differ*, vol. 10, no. 9, pp. 1109-11, Sep 2003, doi: 10.1038/sj.cdd.4401293.
- [83] A. R. O'Connell, C. Holohan, A. Torriglia, B. W. Lee, and C. Stenson-Cox, "Characterization of a serine protease-mediated cell death program activated in human leukemia cells," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 312, no. 1, pp. 27-39, Jan 1 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.003.
- [84] J. P. Steinbach, P. Supra, H. J. Huang, W. K. Cavenee, and M. Weller, "CD95-mediated apoptosis of human glioma cells: modulation by epidermal growth factor receptor activity," (in eng), *Brain Pathol*, vol. 12, no. 1, pp. 12-20, Jan 2002, doi: 10.1111/j.1750-3639.2002.tb00418.x.
- [85] C. H. Bird *et al.*, "Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway," (in eng), *Mol Cell Biol*, vol. 18, no. 11, pp. 6387-98, Nov 1998, doi: 10.1128/mcb.18.11.6387.
- [86] C. Leprêtre, G. Tchakarska, H. Blibech, C. Lebon, and A. Torriglia, "Apoptosis-inducing factor (AIF) and leukocyte elastase inhibitor/l-DNase II (LEI/LDNaseII), can interact to conduct caspase-independent cell death," *Apoptosis*, vol. 18, no. 9, pp. 1048-1059, 2013/09/01 2013, doi: 10.1007/s10495-013-0862-2.
- [87] A. Papi, C. Brightling, S. E. Pedersen, and H. K. Reddel, "Asthma," (in eng), *Lancet*, vol. 391, no. 10122, pp. 783-800, Feb 24 2018, doi: 10.1016/s0140-6736(17)33311-1.
- [88] J. Chatkin, L. Correa, and U. Santos, "External Environmental Pollution as a Risk Factor for Asthma," (in eng), *Clin Rev Allergy Immunol*, pp. 1-18, Jan 12 2021, doi: 10.1007/s12016-020-08830-5.
- [89] I. H. Heijink *et al.*, "Epithelial cell dysfunction, a major driver of asthma development," *Allergy*, <https://doi.org/10.1111/all.14421> vol. 75, no. 8, pp. 1902-1917, 2020/08/01 2020, doi: <https://doi.org/10.1111/all.14421>.
- [90] R. Suraya, T. Nagano, M. Katsurada, R. Sekiya, K. Kobayashi, and Y. Nishimura, "Molecular mechanism of asthma and its novel molecular target therapeutic agent," (in eng), *Respir Investig*, vol. 59, no. 3, pp. 291-301, May 2021, doi: 10.1016/j.resinv.2020.12.007.

- [91] S. Ferretti, M. Gelsomino, and S. Miceli Sopo, "About the recommendation of the GINA strategy report on asthma step 1," *European Respiratory Journal*, vol. 57, no. 2, p. 2003324, 2021, doi: 10.1183/13993003.03324-2020.
- [92] I. P. Shilovskiy, A. A. Nikolskii, O. M. Kurbacheva, and M. R. Khaitov, "Modern View of Neutrophilic Asthma Molecular Mechanisms and Therapy," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 85, no. 8, pp. 854-868, 2020/08/01 2020, doi: 10.1134/S0006297920080027.
- [93] W. M. Nauseef and N. Borregaard, "Neutrophils at work," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 15, no. 7, pp. 602-11, Jul 2014, doi: 10.1038/ni.2921.
- [94] O. Soehnlein, C. Weber, and L. Lindbom, "Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function," (in eng), *Trends Immunol*, vol. 30, no. 11, pp. 538-46, Nov 2009, doi: 10.1016/j.it.2009.06.006.
- [95] J. A. Nadel, "Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies," (in eng), *Chest*, vol. 117, no. 5 Suppl 2, pp. 386s-9s, May 2000, doi: 10.1378/chest.117.5_suppl_2.386s.
- [96] S. Z. Anticevich, J. M. Hughes, J. L. Black, and C. L. Armour, "Induction of hyperresponsiveness in human airway tissue by neutrophils--mechanism of action," (in eng), *Clin Exp Allergy*, vol. 26, no. 5, pp. 549-56, May 1996.
- [97] D. Stănescu *et al.*, "Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils," (in eng), *Thorax*, vol. 51, no. 3, pp. 267-71, Mar 1996, doi: 10.1136/thx.51.3.267.
- [98] K. P. Hough *et al.*, "Airway Remodeling in Asthma," (in English), *Frontiers in Medicine*, Review vol. 7, no. 191, 2020-May-21 2020, doi: 10.3389/fmed.2020.00191.
- [99] R. Halwani, S. Al-Muhsen, H. Al-Jahdali, and Q. Hamid, "Role of Transforming Growth Factor- β in Airway Remodeling in Asthma," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 44, no. 2, pp. 127-133, 2011/02/01 2011, doi: 10.1165/rcmb.2010-0027TR.
- [100] H. W. Chu, J. B. Trudeau, S. Balzar, and S. E. Wenzel, "Peripheral blood and airway tissue expression of transforming growth factor beta by neutrophils in asthmatic subjects and normal control subjects," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 106, no. 6, pp. 1115-23, Dec 2000, doi: 10.1067/mai.2000.110556.
- [101] M. Cundall, Y. Sun, C. Miranda, J. B. Trudeau, S. Barnes, and S. E. Wenzel, "Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 112, no. 6, pp. 1064-71, Dec 2003, doi: 10.1016/j.jaci.2003.08.013.
- [102] J. A. Nadel, "Role of enzymes from inflammatory cells on airway submucosal gland secretion," (in eng), *Respiration*, vol. 58 Suppl 1, pp. 3-5, 1991, doi: 10.1159/000195961.
- [103] A. M. Vignola *et al.*, "Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients," (in eng), *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 157, no. 2, pp. 505-11, Feb 1998, doi: 10.1164/ajrccm.157.2.9703070.
- [104] J. L. Simpson, R. J. Scott, M. J. Boyle, and P. G. Gibson, "Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma," (in eng), *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 172, no. 5, pp. 559-65, Sep 1 2005, doi: 10.1164/rccm.200503-369OC.

- [105] M. Raundhal *et al.*, "High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 125, no. 8, pp. 3037-50, Aug 3 2015, doi: 10.1172/jci80911.
- [106] G. Mautino, F. Capony, J. Bousquet, and A. M. Vignola, "Balance in asthma between matrix metalloproteinases and their inhibitors," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 104, no. 3 Pt 1, pp. 530-3, Sep 1999, doi: 10.1016/s0091-6749(99)70319-2.
- [107] K. L. Pothoven *et al.*, "Neutrophils are a major source of the epithelial barrier disrupting cytokine oncostatin M in patients with mucosal airways disease," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 139, no. 6, pp. 1966-1978.e9, Jun 2017, doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.039.
- [108] A. Margalit and K. Kavanagh, "The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface," (in eng), *FEMS Microbiol Rev*, vol. 39, no. 5, pp. 670-87, Sep 2015, doi: 10.1093/femsre/fuv018.
- [109] R. Dworski, H. U. Simon, A. Hoskins, and S. Yousefi, "Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 127, no. 5, pp. 1260-6, May 2011, doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1103.
- [110] F. Grabcanovic-Musija *et al.*, "Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation," (in eng), *Respir Res*, vol. 16, no. 1, p. 59, May 22 2015, doi: 10.1186/s12931-015-0221-7.
- [111] Y. Wang, D. V. Zagorevski, and J. A. Stenzen, "In situ and multisubstrate detection of elastase enzymatic activity external to microdialysis sampling probes using LC-ESI-MS," (in eng), *Anal Chem*, vol. 80, no. 6, pp. 2050-2057, 2008, doi: 10.1021/ac702047w.
- [112] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," (in eng), *J Immunol Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, Dec 16 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [113] M. J. Stoddart, "Cell Viability Assays: Introduction," in *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, M. J. Stoddart Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 1-6.
- [114] Y. Yu *et al.*, "Inhibition of autophagy enhanced cobalt chloride-induced apoptosis in rat alveolar type II epithelial cells," (in eng), *Mol Med Rep*, vol. 18, no. 2, pp. 2124-2132, Aug 2018, doi: 10.3892/mmr.2018.9209.
- [115] F. Sivandzade, A. Bhalerao, and L. Cucullo, "Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe," (in eng), *Bio Protoc*, vol. 9, no. 1, Jan 5 2019, doi: 10.21769/BioProtoc.3128.
- [116] M. M. Nachlas, S. I. Margulies, J. D. Goldberg, and A. M. Seligman, "The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt," (in eng), *Anal Biochem*, vol. 1, pp. 317-26, Dec 10 1960, doi: 10.1016/0003-2697(60)90029-4.
- [117] T. Suzuki *et al.*, "Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells," (in eng), *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 33, no. 3, pp. 231-47, Sep 2005, doi: 10.1165/rcmb.2005-0109OC.
- [118] H. H. Ginzberg *et al.*, "Leukocyte elastase induces epithelial apoptosis: role of mitochondrial permeability changes and Akt," (in eng), *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 287, no. 1, pp. G286-98, Jul 2004, doi: 10.1152/ajpgi.00350.2003.

- [119] R. Boxio *et al.*, "Neutrophil elastase cleaves epithelial cadherin in acutely injured lung epithelium," *Respiratory Research*, vol. 17, no. 1, p. 129, 2016/10/17 2016, doi: 10.1186/s12931-016-0449-x.
- [120] L. Padron-Barthe, C. Leprêtre, E. Martin, M.-F. Counis, and A. Torriglia, "Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis," (in eng), *Molecular and cellular biology*, vol. 27, no. 11, pp. 4028-4036, 2007, doi: 10.1128/MCB.01959-06.
- [121] R. M. Ray, S. Jin, M. N. Bavaria, and L. R. Johnson, "Regulation of JNK activity in the apoptotic response of intestinal epithelial cells," (in eng), *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 300, no. 5, pp. G761-70, May 2011, doi: 10.1152/ajpgi.00405.2010.
- [122] I. Jaadane, A. Nagbou, F. Behar-Cohen, and A. Torriglia, "Interaction of Leukocyte Elastase Inhibitor/L-DNase II with BCL-2 and BAX," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1843, no. 12, pp. 2807-2815, 2014/12/01/ 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.08.007>.
- [123] C. Candé *et al.*, "Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria," *Biochimie*, vol. 84, no. 2, pp. 215-222, 2002/02/01/ 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01374-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01374-3).
- [124] G. Jégot *et al.*, "A substrate-based approach to convert SerpinB1 into a specific inhibitor of proteinase 3, the Wegener's granulomatosis autoantigen," (in eng), *Faseb j*, vol. 25, no. 9, pp. 3019-31, Sep 2011, doi: 10.1096/fj.10-176552.
- [125] F. Loison *et al.*, "Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 124, no. 10, pp. 4445-58, Oct 2014, doi: 10.1172/jci76246.
- [126] C. Y. Kuo, C. H. Lin, and T. Hsu, "VHL Inactivation in Precancerous Kidney Cells Induces an Inflammatory Response via ER Stress-Activated IRE1 α Signaling," (in eng), *Cancer Res*, vol. 77, no. 13, pp. 3406-3416, Jul 1 2017, doi: 10.1158/0008-5472.Can-16-3196.
- [127] R. Benabid *et al.*, "Neutrophil Elastase Modulates Cytokine Expression: CONTRIBUTION TO HOST DEFENSE AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA-INDUCED PNEUMONIA*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 42, pp. 34883-34894, 2012/10/12/ 2012, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361352>.
- [128] T. P. Carroll, C. M. Greene, C. C. Taggart, A. G. Bowie, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney, "Viral inhibition of IL-1- and neutrophil elastase-induced inflammatory responses in bronchial epithelial cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 175, no. 11, pp. 7594-601, Dec 1 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7594.
- [129] C. Taggart, R. J. Coakley, P. Grealley, G. Canny, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney, "Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor- α and interleukin-8," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 278, no. 1, pp. L33-L41, 2000/01/01 2000, doi: 10.1152/ajplung.2000.278.1.L33.
- [130] R. Benabid *et al.*, "Neutrophil elastase modulates cytokine expression: contribution to host defense against Pseudomonas aeruginosa-induced pneumonia," (in eng), *The*

- Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 42, pp. 34883-34894, 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.361352.
- [131] M. Bédard, C. D. McClure, N. L. Schiller, C. Francoeur, A. Cantin, and M. Denis, "Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis," (in eng), *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 9, no. 4, pp. 455-62, Oct 1993, doi: 10.1165/ajrcmb/9.4.455.
- [132] D. E. Walsh *et al.*, "Interleukin-8 Up-regulation by Neutrophil Elastase Is Mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in Human Bronchial Epithelium*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 38, pp. 35494-35499, 2001/09/21/ 2001, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M103543200>.
- [133] T. P. Carroll, C. M. Greene, C. C. Taggart, A. G. Bowie, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney, "Viral Inhibition of IL-1- and Neutrophil Elastase-Induced Inflammatory Responses in Bronchial Epithelial Cells," *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 11, p. 7594, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7594.

EK 1- Tezden Türetilmiş Bildiriler

BÜŞRA KILIÇ, HAYRİYE AKEL BİLGİÇ, ÇAĞATAY KARAASLAN. Nötrofil Elastaz'ın LEI (SERPINB1)/L-Dnase II Apoptotik Yolağına Etkisinin Bronş Epitel Hücrelerinde Araştırılması, Sözlü Sunum, AİD 2020, 24-25 Ekim 2020.

