

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLJİ ANABİLİM DALI**

**REG AİLESİNE AİT REG1A, REG3A VE REG3G' NİN
JURKAT HÜCRELERİNİN BİYOLJİSİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Zehra Büşra AZİZOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Ahmet EKEN**

Doktora Tezi

**Kasım 2023
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**REG AİLESİNE AİT REG1A, REG3A VE REG3G' NİN
JURKAT HÜCRELERİNİN BİYOLOJİSİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

**Hazırlayan
Zehra Büşra AZİZOĞLU**

**Danışman
Doç. Dr. Ahmet EKEN**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2020-10779 kodlu proje ile desteklenmiştir.
(Zehra Büşra AZİZOĞLU YÖK 100/2000 Moleküler Onkoloji
Doktora Programı bursiyeridir.)**

Kasım 2023

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Zehra Büşra AZİZOĞLU

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“REG Ailesine Ait REG1A, REG3A ve REG3G’ nın Jurkat Hücrelerinin Biyolojisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Ahmet EKEN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Doç. Dr. Ahmet EKEN danışmanlığında **Zehra Büşra AZİZOĞLU** tarafından hazırlanan “**REG Ailesine Ait REG1A, REG3A ve REG3G’ nın Jurkat Hücrelerinin Biyolojisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

16/11/2023

JÜRİ:

İmza

Danışman :Doç. Dr. Ahmet EKEN

Üye :Prof. Dr. Halit CANATAN

Üye :Prof. Dr. Ekrem ÜNAL

Üye :Dr. Öğr. Üyesi Serkan BELKAYA

Üye :Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen, tezimin planlanması, yürütülmesi ve yazım aşamalarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından dolayı değerli danışmanım Doç.Dr. Ahmet EKEN'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım yardımlarını asla esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Halit CANATAN'a

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve değerli Anabilim dalı öğretim üyelerine, bu tez projesinin tüm deney aşamalarını gerçekleştirmeme olanak sağlayan GENKÖK yönetimine,

YÖK 100/2000 doktora programı Moleküler Onkoloji alanında doktora eğitimi destekleyerek burs veren YÖK 100/2000 proje yetkilileri ve kurumuna ve TDK-2020-10779 nolu proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Doktoram sürecinde yardım ve bilgileri ile yanımda olan değerli ekip arkadaşlarım, Zehra OKUŞ ve Tuğba Nur GÜR'e

Ayrıca çalışmalarım süresince yardımını esirgemeyen Nazly Najat ASAAD ve Şahin ÇALIK'a

Bana duydukları güveni her daim hissettiren ve hep yanımda olan canım annem ve babam'a,

Doktoraya başlamamda ve bu zorlu süreçte bana hep anlayış ve fedakârlık gösterip sonuna kadar yılmadan devam etmemde beni her zaman yüreklendiren, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalışmalarım süresince ve yaşamımın her döneminde bana destek olan çok değerli eşim Uğur AZİZOĞLU'na ve güzel kızım İpek AZİZOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Kayseri, Kasım 2023

REG AİLESİNE AİT REG1A, REG3A VE REG3G' NİN JURKAT HÜCRELERİNİN BİYOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Dokora Tezi, Kasım 2023
Danışman: Doç. Dr. Ahmet EKEN

ÖZET

Reg ailesi üyesi proteinleri önemli antimikrobiyal peptitler olup doğuştan gelen bağışıklığın temel bileşenleridir. Çalışmamızda Reg ailesi üyelerinden REG1A, REG3A ve REG3G'nin ve potansiyel reseptörlerinin (Ext ailesi üyeleri EXTL3) doğrudan primer fare/insan T hücrelerinin polarizasyon, sitokin üretimi, proliferasyon vs. gibi fonksiyonlarını nasıl etkilediğini ve REG1A proteininin hidrodinamik overekspresyon yöntemi ile fareye verilmesinin deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) patogenezinin etkilerini ve terapötik potansiyelini karakterize etmeyi amaçladık.

Rekombinant insan REG1A, REG3A, REG3G proteinlerinin farklı konsantrasyonlarının *S. aureus* üzerine anti-mikrobiyal etkisi teyit edildi ve her üç reg proteininin farklı konsantrasyonlarında koloni sayılarında azalma belirlendi. REG1A, REG3A ve REG3G' nin Jurkat hücrelerinde ve PBMC'lerde *ex vivo* ortamda proliferasyon, apoptoz, IL-2 üretimi ve aktivasyon markırlarına (CD69, CD25, CD127) baktığımızda reg proteinleri doğrudan bu parametrelerin hiçbirini etkilemedi.

Rekombinant insan REG1A ile *ex vivo* ortamda yaptığımız farklılaşma deneylerinde REG1A'nın yüksek dozlarda Th17 farklılaşmasını azalttığı görülmüştür. Ayrıca dendritik hücre olgunlaşmasına etkileri incelenmiş ve REG1A'nın CD11c ifadesini arttırdığı gözlenmiştir.

T hücrelerinde yapılan tranfeksiyon ile susturma sonrası, REG1A/REG3A reseptörü olduğu düşünülen EXTL3 ifadesi başarılı biçimde azalmış ancak EXTL3 reseptörünün susturulması proliferasyon, IL-2 üretimi ve CD69 ifadesini etkilememiştir.

REG1A plazmidinin *in vivo* hidrodinamik overekspresyonu DOE klinik skorları ile eği altında kalan alan değerlerini azaltıp ve demiyelinasyonu sınırlamıştır.

REG1A overekspresyonu inflamasyon durumunda DOE farelerde lenf nodda CD4⁺ T hücre sayısını azaltmış, Treg hücrelerinin sayısını ve aktivasyon belirteci olan CD25 ifadesini arttırmıştır. Öte yandan patojenik olan konvansiyonel T hücrelerinin sayısını ve CD25 ifadesini azaltmıştır. Ayrıca periferde lenf nodunda otoimmünitenin baskılanmasında görevli regülatör T hücrelerinin sayısını artırmıştır. Beyinde ise T hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran önemli bir sitokin olan IL-2 miktarı ile proinflamatuvar sitokin olan TNF-a miktarını azalttığı ve supresif sitokin olan IL-10 miktarını ise arttırdığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlar REG1A'nın fare MS modelinde koruyucu etkilerinin olduğunu göstermiş ve REG1A'nın profilaktik etkinliği konusunda umut vaat etmektedir.

Anahtar Sözcükler: EAE; EXTL3; Jurkat hücre hattı; REG1A; REG3A; REG3G.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF REG FAMILY MEMBERS REG1A, REG3A AND REG3G ON THE BIOLOGY OF JURKAT CELLS

Zehra Büşra AZİZOĞLU

Erciyes University, Graduate School of Healty Sciences

Department of Medical Biology

Ph.D. Thesis, November 2023

Supervisor Associate Professor: Doç.Dr. Ahmet EKEN

ABSTRACT

Reg family member proteins are important antimicrobial peptides and are essential components of innate immunity. In our study, we investigated the impact of Reg family members human REG1A, REG3A and REG3G and their potential receptors (Ext family members EXTL3) on the polarization, cytokine production, proliferation, etc. of primary mouse/human T cells. We aimed to characterize the effects and therapeutic potential of administering REG1A plasmid to mice by hydrodynamic overexpression method on the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (DOE).

The antimicrobial effect of different concentrations of recombinant human REG1A, REG3A, REG3G proteins on *S. aureus* was confirmed, and a decrease in colony numbers was determined at different concentrations of all three reg proteins. Reg proteins did not directly affect proliferation, apoptosis, IL-2 production and activation markers (CD69, CD25, CD127) in Jurkat cells and PBMCs *ex vivo*.

In our *ex vivo* differentiation experiments, recombinant human REG1A, at high doses reduced Th17 differentiation. Additionally, its effects on dendritic cell maturation were examined and REG1A increased CD11c expression.

After silencing by transfection in T cells, the expression of EXTL3, which is thought to be the REG1A/REG3A receptor, was reduced, but knockdown of the EXTL3 receptor did not affect proliferation, IL-2 production and CD69 expression.

Overexpression of REG1A plasmid reduced DOE clinical scores and area under the curve values and limited the demyelination.

During DOE, REG1A overexpression decreased the number of CD4⁺ T cells and increased the number of Treg cells and the expression of the activation marker CD25 in the lymph node in mice. On the other hand, it reduced the number of pathogenic conventional T cells and CD25 expression. It also increased the number of regulatory T cells responsible for suppressing autoimmunity in the peripheral lymph node. In the brain, systemic REG1A overexpression decreased the amount of IL-2, which is an important cytokine that stimulates T cell proliferation and differentiation, and the amount of TNF- α , which is a pro-inflammatory cytokine, and increased the amount of IL-10, which is a suppressive cytokine.

These results show that REG1A has protective effects in the mouse MS model and suggest that it may be a promising target for the MS prophylaxis or treatment.

Keywords: EAE; EXTL3; Jurkat cell line; REG1A; REG3A; REG3G.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	: iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
EKLER.....	xi
ÖZGEÇMİŞ.....	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Antimikrobiyal Peptidler (AMP).....	4
2.2. C-tipi Lektinler	9
2.3. Gastrointestinal Sistem	10
2.4. Reg Ailesi.....	14
2.4.1. Reg Ailesinin Üyeleri	14
2.4.2. Reg Proteinlerinin Yapısı.....	15
2.4.2.1. REG1A Proteinin Yapısı.....	16
2.4.2.2. REG2 Proteinin Yapısı.....	16
2.4.2.3. REG3A Proteinin Yapısı.....	16
2.4.2.4. REG3G Proteinin Yapısı.....	17
2.4.2.5. REG4 Proteinin Yapısı.....	17
2.4.3. Reg Proteinlerinin Reseptörleri.....	18

2.4.3.1. EXTL3 Reseptörü	18
2.4.4. Reg Proteinlerinin Moleküler Fonksiyonları	19
2.4.4.1. REG1'nin Moleküler Fonksiyonları.....	19
2.4.4.2. REG3 Proteinlerinin Moleküler Fonksiyonları.....	20
2.4.5. Reg'in Sinyal Yolakları	22
2.4.6. Reg Proteinlerinin Hastalıklarla İlişkisi.....	22
2.4.6.1. REG1'in Hastalıklarla İlişkisi.....	23
2.4.6.2. REG3'ün Hastalıklarla İlişkisi.....	23
2.5. Multipl Skleroz Patogenezi	24
2.5.1. Multipl Skleroz'un patogenezinde yer alan hücreler.....	26
2.5.2. Multipl skleroz tedavisi	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. GEREÇLER	30
3.1.1. Kullanılan Demirbaşlar.....	30
3.1.2. Sarf Malzemeler	31
3.1.3. Kimyasal Malzemeler	31
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Jurkat Hücre Hattının Çoğaltılması ve Dondurulması.....	34
3.2.2. Dondurulmuş Jurkat Hücresinin Çözdürülmesi	35
3.2.3. Periferik Kandan Lenfosit Elde Edilmesi	35
3.2.4. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nin <i>Staphylococcus aureus</i> Üzerine Etkisi ve Reg Dozlarının Belirlenmesi.....	35
3.2.5. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nin Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	36
3.2.6. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nin Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Proliferasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi	36

3.2.7. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nın Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde IL-2 Sitokini Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi	36
3.2.8. PBMC'lerden CD4 ⁺ T Hücrelerinin İzolasyonu	37
3.2.9. Rekombinant İnsan REG1A'nın Primer Hücrelerde CD25, CD69, CD127 gibi Aktivasyon Markırları Üzerine Etkisinin İncelenmesi	38
3.2.10. Rekombinant İnsan REG1A'nın Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi	38
3.2.10.1. Hücre içi boyama ile sitokin üretim kapasitesinin belirlenmesi.....	39
3.2.11. Rekombinant İnsan REG1A'nın Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi	39
3.2.12. Rekombinant İnsan REG1A'nın Treg Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi	40
3.2.12.1. PD-1, CTLA-4 ve KLRG1 gibi kontrol noktası moleküllerinin yüzey boyaması ile kantifiye edilmesi.....	41
3.2.12.2. True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set ile transkripsiyon faktör boyama yaparak FOXP3 ifadesinin belirlenmesi.....	41
3.2.13. Rekombinant İnsan REG1A'nın Antijen Sunucu Hücreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi	42
3.2.14. Jurkat Hücrelerinde ve Primer Hücrelerde EXTL3 Reseptörünün Susturulması ve Doğrulanması	42
3.2.14.1. Real Time qPCR.....	43
3.2.15. İnsan REG1A ve Kontrol Plasmidinin Çoğaltılması	44
3.2.16. Deney Grupları ve Sayıları.....	44
3.2.17. Hidrodinamik Enjeksiyonla REG1A <i>İn Vivo</i> Overekspresyonu	45
3.2.18. MOG35-55 Peptidi İmmünizasyonu ile Akut DOE (EAE) Geliştirilmesi ve Hastalık Skorlaması	45

3.2.19. Beyin ve Omurilik'ten Lenfosit Elde Edilmesi	46
3.2.20. Dalak ve Lenf Nodundan Lenfosit Elde Edilmesi	48
3.2.20.1. Yüzey boyama protokolü	48
3.2.20.2. Hücre içi sitokin boyama (ICC) protokolü.....	48
3.2.21. İstatistik Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. Reg Proteinlerinin <i>Staphylococcus aureus</i> üzerine etkisi	50
4.2. REG1A, REG3A ve REG3G'nin Farklı Dozlarının Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi	51
4.3. REG1A, REG3A ve REG3G'nin Farklı Dozlarının Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Proliferasyona Etkisi	54
4.4. REG1A, REG3A ve REG3G'nin Farklı Dozlarının Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde IL-2 Sitokinin Üretimi Üzerine Etkisi.....	56
4.5. REG1A'nın Primer Hücrelerde CD25, CD69, CD127 gibi Aktivasyon Markırları Üzerine Etkisi	60
4.6. REG1A'nın Primer Hücrelerde Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisi	62
4.7. REG1A'nın Primer Hücrelerde Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisi	63
4.8. REG1A'nın Primer Hücrelerde Treg Farklılaşması Üzerine Etkisi	67
4.9. REG1A'nın Antijen Sunucu Hücrelerin Matürasyonu Üzerine Etkisi.....	69
4.10. Jurkat Hücrelerinde ve Primer Hücrelerde EXTL3 Reseptörünün Knockdownu	71
4.11. EXTL3 Reseptörünün Knockdownunun IL-2 üretimi Üzerine Etkisi.....	71
4.12. EXTL3 Reseptörünün Knockdownunun Aktivasyon Markırı CD69 Üzerine Etkisi.....	72
4.13. Hidrokinamik Enjeksiyon ile Yapılan REG1A Overekspresyonunun Doğrulanması	73

4.14. İnsan REG1A Sistemik Overekspresyonunun Naif Farelerde Çeşitli İmmün Sistem Hücrelerine Etkilerinin İncelenmesi	74
4.15. REG1A'nın Overekspresyonunun DOE Klinik Skorlama, İnsidans ve Vücut Ağırlığına Etkisi	91
4.16. İnsan REG1A Sistemik Overekspresyonunun DOE Farelerde MSS' de İmmün Sistem Hücrelerine Etkilerinin İncelenmesi.....	95
4.17. İnsan REG1A Sistemik Overekspresyonunun DOE Farelerde Periferde İmmün Sistem Hücrelerine Etkilerinin İncelenmesi	105
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	125
5.1. REG'in <i>İn Vitro</i> Kültür Sistemindeki Etkileri.....	127
5.2. REG1A Overekspresyonunun <i>İn Vivo</i> Homeostatik Durumda İmmün Sistem Parametrelerine Etkileri.....	131
5.3. REG1A Overekspresyonunun İnflamasyon Durumunda İmmün Sistem Parametrelerine Etkileri.....	132
6. KAYNAKLAR.....	135
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

µl	: Mikrolitre
AhR	: Aril Hidrokarbon Reseptör
AMP	: Antimikrobiyal Peptitler
APC	: Antijen Sunan Hücreler
CD	: Başkalaşım Kümesi (Cluster of Differentiation)
CTLD	: C Tipi Lektin Alanları
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOE	: Deneyisel Otoimmün Ensefalomiyelit
EXTL3	: Ekzostotin benzeri 3
FBS	: Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FOXP3	: Önçatal Kutusu P3 (Forkhead box P3)
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HIP	: Hepatokarsinom-bağırsak pankreatik protein
HS	: Heparan Sülfat
ICOS	: İndüklenebilir Kostimülatör
IFN-g	: Interferon Gama
IL-10	: İnterlökin-10
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-2	: İnterlökin 2
IL-22	: İnterlökin 22
ILC3	: İnnate Lenfoid Cell 3
KLRG1	: Katil Hücre Lektin Benzeri Reseptör Familyası G Eleman 1
LPS	: Lipopolisakkarit
MFI	: Median Fluorescence Intensity
MOG	: Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein
MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MyD88	: Miyeloid Farklılaşma Birincil Tepkisi 88
NK	: Doğal öldürücü

PAP	: Pankreatit ile ilişkili protein
PBMC	: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PBS	: Phosphate-Buffered Saline
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölümü Proteini-1
PSP	: Pankreas Taşı Protein
REG	: Rejenere Edici Adacık Türevi
TCR	: T Hücre Reseptörü (T Cell Receptor)
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
Th17	: Yardımcı T17 Hücreleri (T helper 17)
Th2	: Yardımcı T2 Hücreleri
TLR	: Geçiş Benzeri Reseptör
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
Treg	: Düzenleyici T hücreleri (Regulatory T Cell)

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Fare, Rat ve İnsanda Reg Ailesi Üyeleri	15
Tablo 3.1.	Aktivasyon Marker Boya Karışımı	38
Tablo 3.2.	Treg Hücreleri ve Kontrol Noktası İnhibitörlerinin Boya Karışımı	41
Tablo 3.3.	Dentritik Hücre Boya Karışımı	42
Tablo 3.4.	RT-q PCR Reaksiyon Koşulları	43
Tablo 3.5.	qPCR Programı	44
Tablo 3.6.	Deney Grupları ve Hayvan Sayıları	45



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Antimikrobiyal peptidlerin sınıflandırılması.	5
Şekil 2.2.	Antimikrobiyal peptitlerin ana fonksiyonlarının istatistikleri.....	5
Şekil 2.3.	Antimikrobiyal peptitlerin hücre membranı ile etkileşim modelleri..	7
Şekil 2.4.	Antimikrobiyal peptitlerin etki mekanizmaları.	8
Şekil 2.5.	AMP'lerin immünomodülatör mekanizmaları.	9
Şekil 2.6.	Bağırsak mikrobiotasının patojenlere karşı etkisi.	11
Şekil 2.7.	Bağırsak mikrobiotasının dolaylı kolonizasyon direnç mekanizması	12
Şekil 2.8.	Bağırsak mikrobiotasının IL22 üretimi	13
Şekil 2.9.	REG Proteinlerinin 3 boyutlu yapısı.	17
Şekil 2.10.	Reg1 ve Reg3 proteinleri, reseptörü olan Extl3 üzerinden hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozunu düzenler.....	18
Şekil 2.11.	EXTL3 un kanda RNA düzeyinde ifadesi	19
Şekil 2.12.	Merkezi sinir sistemindeki aktive edilmiş bağışıklık hücreleri tarafından yönlendirilen MSS hasarı.....	28
Şekil 3.1.	Deney akış şeması-1. Çoğaltılan Jurkat hücreleri ve izole edilen PBMC'ler eşit hücreler olacak şekilde ayrı ayrı pleytlere dağıtıldı. Reg proteinlerinin dozları eklendi ve kültürlendi. Ardından proliferasyon, apoptoz ve IL-2 üretimleri değerlendirildi.	33
Şekil 3.2.	Jurkat hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (X40)	34
Şekil 3.3.	Deney akış şeması-2.	37
Şekil 3.4.	Deney akış şeması-3.	47
Şekil 4.1.	<i>S. aureus</i> üzerine REG1A, REG3A ve REG3G proteinlerinin anti-mikrobiyal etkisi.....	50
Şekil 4.2.	REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerinin canlılığını etkilemedi.	52
Şekil 4.3.	REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları PBMC'lerin canlılığını etkilemedi.	53
Şekil 4.4.	REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerin proliferasyon kabiliyetini etkilemedi.....	55
Şekil 4.5.	REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları PBMC'lerin proliferasyon kabiliyetini etkilemedi.....	57

Şekil 4.6.	Anti-CD3/28 ile uyarılan Jurkat hücrelerinde IL-2 üretimi artmıştır.	58
Şekil 4.7.	REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerinde IL-2 üretimi.....	59
Şekil 4.8.	REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları PBMC'lerde IL-2 üretimi miktarlarında anlamlı bir fark gözlenmedi	61
Şekil 4.9.	Uzun süre antiCD3/28 ile aktive edilen PBMC'lerin yüzde ve MFI bar grafiği gösterimi	62
Şekil 4.10.	Farklı konsantrasyonlarda pg dozlarında REG1A varlığında primer T hücresinde CD25, CD69, CD127 gibi aktivasyon belirteçlerinin ifade miktarlarında anlamlı bir fark gözlenmedi.....	63
Şekil 4.11.	Farklı konsantrasyonlarda REG1A'nın primer T hücresine verilmesi sonrasında Th2 polarizasyonu IL-4 üretiminde anlamlı bir fark gözlenmedi.	65
Şekil 4.12.	Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında primer T hücresinde IL-17 üretimi azaltmıştır.	65
Şekil 4.13.	Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında primer T hücresinde FOXP3 ifadesi.	67
Şekil 4.14.	FOXP3 ⁺ ve FOXP3 ⁻ hücrelerde kontrol noktası inhibitörlerinin ifadesi	68
Şekil 4.15.	Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında DC'lerin ifade ettiği yüzey markırlarının karşılaştırılması.	69
Şekil 4.16	CD4 ⁺ T hücrelerinde tranfeksiyon ile susturma sonrası EXTL3 ifadesi azalmıştır	71
Şekil 4.17.	Jurkat hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu proliferasyonu etkilememiştir.....	72
Şekil 4.18.	CD4 ⁺ T hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu sonrası IL-2 üretimi bir miktar azalmıştır.	72
Şekil 4.19.	CD4 ⁺ T hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu sonrası CD69 ifadesinde fark yoktur.....	73
Şekil 4.20.	REG1A overekspresyonunun beyin, dalak ve karaciger'de RT-qPCR ile konfirme edilmesi.....	74

Şekil 4.21.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	76
Şekil 4.22.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD4 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	77
Şekil 4.23.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD8 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	79
Şekil 4.24.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	81
Şekil 4.25.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD4 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	82
Şekil 4.26.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD8 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. A) IL-22 ⁺ , IL-17 ⁺ , IL-10 ⁺ , IL-2 ⁺ , IFN-g ⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05.....	84
Şekil 4.27.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	86
Şekil 4.28.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	87
Şekil 4.29.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	88
Şekil 4.30.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi.	89
Şekil 4.31.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi.	90
Şekil 4.32.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	91
Şekil 4.33.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	92
Şekil 4.34.	Naif grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	93

Şekil 4.35.	REG1A Plasmid uygulaması DOE klinik skorlamaları Empty plasmid-kontrol grubuna göre azaltmıştır. İnsidans ve ağırlık kaybı bu grupta daha azdır	93
Şekil 4.36.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	96
Şekil 4.37.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	97
Şekil 4.38.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	99
Şekil 4.39.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	101
Şekil 4.40.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	102
Şekil 4.41.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	103
Şekil 4.42.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin beyinde incelenmesi.	105
Şekil 4.43.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	106
Şekil 4.44.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	107
Şekil 4.45.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	109
Şekil 4.46.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. A) CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri.	111
Şekil 4.47.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	112
Şekil 4.48.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8 ⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	114
Şekil 4.49.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin lenf nodda incelenmesi.	116

Şekil 4.50.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	117
Şekil 4.51.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	118
Şekil 4.52.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi.	119
Şekil 4.53.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi.	120
Şekil 4.54.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi.	121
Şekil 4.55.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	122
Şekil 4.56.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	123
Şekil 4.57.	DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi.	124

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), mikroorganizmalara karşı inhibe edici aktiviteye sahip bileşiklerdir. Tüm dünyada antibiyotiklere karşı hızla artan direnç gelişimi sonrası, antimikrobiyal peptitler yeni ilaç adayları olarak hızla dikkatleri üzerine çekmiş ve klinik kullanıma sokma çabaları hızla artmıştır (Fox 2013; Mahlapuu ve ark., 2016). Ayrıca, son salgınlar ve pandemiler gibi yeni ortaya çıkan mikrobiyal hastalıklarla mücadelede etkili antimikrobiyal ajanlara olan acil ihtiyaç nedeniyle, AMP'lerin popülaritesi artmaktadır (Büyükkiraz 2021).

Antimikrobiyal peptitler, esas olarak hücre zarlarını veya spesifik hücre içi bileşenleri hedef alarak çeşitli ve özel mekanizmalar yoluyla çok çeşitli mikroorganizmaları inhibe eder. Tek başlarına veya sinerjistik bir etki elde etmek için antivirallerle ve diğer antimikrobiyal bileşenlerle kombinasyon halinde kullanılabilirler (Gordon ve ark., 2005). Bugüne kadar 3000 den fazla antimikrobiyal peptit, çok çeşitli organizmalarda karakterize edilmiş ve bununla birlikte bu peptitler, amino asit bileşimi ve ikincil yapılar göre sınıflandırma yapılmaya çalışılmıştır (Moretta ve ark., 2021). Defensinler, katelisinler, RNase 7, psoriasin, granülsin, dermcidin ve C tipi lektinler (REG3 β ve REG3 γ) insanlarda bulunan başlıca AMP'lerdir (Cederlund ve ark., 2011; Ganz 2003; Izadpanah ve Gallo, 2005; Wiesner ve Vilcinskas 2010).

Şimdiye kadar FDA tarafından nisin, gramicidin, melittin, daptomycin, lactoferricin ve histadin gibi birkaç AMP'lerin klinik uygulamada kullanımları onaylanan ve bacitracin, pexiganan, omiganan, barilacidin, LL-37 gibi preklinik aşamalarda veya klinik denemelerde olan çok sayıda AMP vardır (Moretta ve ark., 2021). Daptomisin, çeşitli ilaca dirençli Gram-pozitif bakterilere karşı hızlı bir bakterisidal etki gösteren karmaşık cilt ve cilt yapısı enfeksiyonlarının tedavisi için 2003 yılında FDA

tarafından onaylanmıştır (Carpenter ve Chambers, 2004). Mikrobisidal aktivitelerine ek olarak, AMP'ler ayrıca sinyal molekülleri, immün modölatörler ve antitümör ajanlar olarak potansiyel uygulamalara sahiptir. AMP'ler, gıda, tarım, çevre, hayvancılık ve ilaç endüstrilerinde antimikrobiyal maddeler olarak potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu nedenle, AMP'lerin çok yönlü biyolojik özelliklerini anlamak, peptit bazlı terapötiklerin klinik gelişimi için son derece önemli olabilir (Büyükkiraz 2021; Fjell ve ark., 2012)

Rejenere edici adacık türevi (REG / Reg) proteinler, küçük salgılayıcı C tipi benzeri lektinlerdir. Reg proteinler bakteriyel şekerleri ve peptidoglikanları Cav⁺² bağımlı etkileşimler yoluyla C tipi lektin alanları (CTLD) aracılığıyla bağlar ve bakterisidal etkilerini gösterir. Reg proteinlerinin en ayırt edici özelliği de çok çeşitli ligandları ve karbonhidratları seçici şekilde bağlayan bu C tipi benzeri lektin alanlarına sahip olmalarıdır. Günümüze kadar 17 tane REG gen ailesi tanımlanmıştır (Chakraborty ve ark., 1995; Dieckgraefe ve ark., 2002; Hartupée ve ark., 2001; Katsumata ve ark., 1995; Lasserre ve ark., 1994).

Yakın zamanda yaptığımız bir çalışmada (Eken ve ark., 2021), Reg3γ' nın sistemik artışıyla MS fare modeli olan DOE' yi ağırlaştırdığı rapor etmiştik.

REG1A, REG1B, REG3A ve EXTL3'ün MS hastalarında sağlıklı grupla kıyaslandığında BOS'taki ekspresyonu mRNA düzeyinde bir farklılık göstermemiştir. İlginç bir şekilde, Reg3γ aşırı ekspresyonu DOE skorlarını, demiyelinizasyonu şiddetlendirmiş ve beyne ve omuriliğe lenfositlerin ve Th1 / Th17 hücrelerinin yüksek infiltrasyonu ile ilişkili olup, bu da bize Reg3γ'nin doğrudan veya dolaylı olarak lenfosit fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada Reg ailesi üyelerinden REG1A, REG3A ve REG3G'nın ve potansiyel reseptörlerinin (Ext ailesi üyeleri EXTL3) doğrudan primer fare/insan T hücrelerinin polarizasyon, sitokin üretimi, proliferasyon vs. gibi fonksiyonlarını nasıl etkilediği ve REG1A proteininin hidrodinamik overekspresyon yöntemi ile verilmesinin fare multiple skleroz (MS) modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (DOE) patogenezinin etkileri ve terapötik potansiyeli, DOE hastalık skorlaması, beyinde demiyelinizasyon ve sinir sistemine infiltrasyon yapan hücreler karakterize edilerek

araştırılmıştır. Bu alışma sonucunda REG1A nin immün sistem üzerindeki etkisinin anlaşılması ve böylelikle hastalıklardaki terapötik potansiyelinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

Aşağıda projemizin hedefleri sunulmuştur.

Hedef 1: Bu çalışmada rekombinant insan REG1A, REG3A, REG3G proteinlerinin *ex vivo* ortamda doğırudan PBMC ve Jurkat hücrelerinin polarizasyon, sitokin üretimi, proliferasyon vb. gibi fonksiyonlarına ve dendritik hücre olgunlaşmasına etkilerinin incelenmesi

Hedef 2: Rekombinant insan REG1A proteininin *ex vivo* ortamda primer naive CD4⁺ fare T hücrelerinin Th2, Th17, Treg hücrelerine polarizasyonlarına etkilerinin incelenmesi

Hedef 3: Primer T hücrelerinde EXTL3 reseptörünün susturulmasının insan T hücrelerinin aktivasyon, sitokin üretimi, proliferasyonuna etkilerinin incelenmesi

Hedef 4: Rekombinant insan REG1A proteinin hidrodinamik plasmid ejeksiyonlu overekpresyonunun fare DOE gelişimine etkilerinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

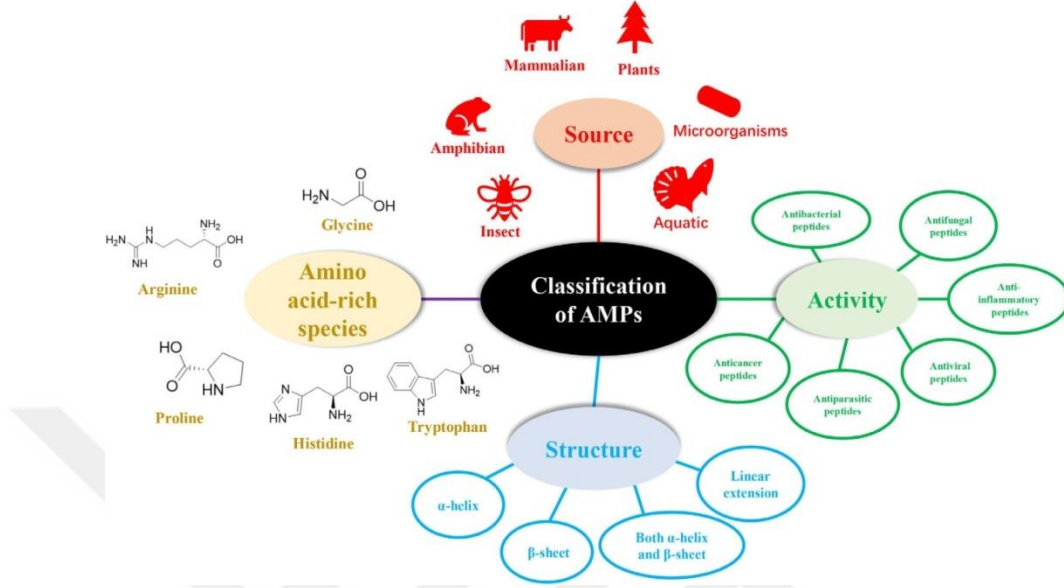
2.1. Antimikrobiyal Peptidler (AMP)

Antimikrobiyal peptidler (AMP'ler), bakteri, bitki, hayvan ve insan dahil tüm canlı organizmalar tarafından doğal olarak üretilen 12-50 aminoasitten oluşan küçük peptidlerdir.

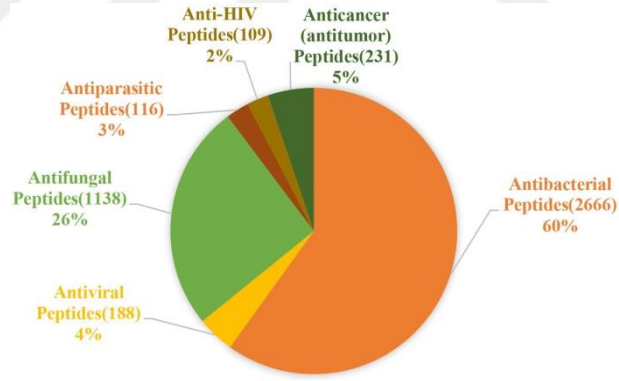
AMP'lerin sınıflandırmaları çeşitliliğinden dolayı zorluklara neden olmuştur. AMP'ler kaynak, aktivite, yapısal özellikler ve amino asit kompozisyonuna göre sınıflandırılır (Şekil 2.1) (Huan Y ve ark., 2020). Amino asit kompozisyonuna göre doğrusal peptidler, sisteince zengin peptidler ve arginine, histidin veya glisin gibi amino asitlerce zengin peptidler olarak üç gruba ayrılmıştır. İkincil yapılar esas alınarak ise α -helikal peptidler, β -sheet peptidler ve uzatılmış/ilmek peptidler olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Cruz ve ark., 2014). Alfa-helikal AMP'ler, yüksek katyonik ve amfipatik özellik gösterirler ve Gram (+) bakteri ve mantarlara karşı etki gösterirler (Cruz ve ark., 2014; Gullberg ve ark., 2011). β -sheet yapısındaki AMP'ler ise sistein kalıntıları arasındaki disülfid köprüleri ile stabilize edilirler.

Nötral pH'ta molekül yükü özelliklerine göre katyonik ve anyonik AMP'ler olmak üzere iki tür sınıflandırma yapılmıştır ve çoğu peptidler katyonik özelliktedir. (Narayana ve Chen, 2015). Bazı yazarlar biyolojik aktivitelerini ve etki mekanizmalarına göre de ayrıntılı olarak AMP'leri sınıflandırmışlardır. Biyolojik hedeflerine göre antibakteriyel, antiviral, antifungal antiparaziter, anti-insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve anti-tümör peptidler olarak özetlenebilir (Şekil 2.2) (Bahar and Ren, 2013; Huan ve ark., 2020). Antimikrobiyal peptit veritabanındaki (APD3) bilgilere göre en büyük oran olan %60'ını antibakteriyel peptidler, ardından %26'sını antifungal peptidler, ve antiviral, antiparazitik, antikanser, anti-HIV peptidlerin herbirisi ise yaklaşık %2-5'ini oluşturur. AMP'lerin kaynakları da

memeliler (insan konakçı savunma peptidleri büyük bir orandadır), amfibiler, mikroorganizmalar ve böcekler olarak ayrılabilir (Huan ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Antimikrobiyal peptidlerin sınıflandırılması. AMP'ler kaynak, aktivite, yapısal özellikler ve amino asit kompozisyonuna göre sınıflandırılır (Huan Y ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Antimikrobiyal peptitlerin ana fonksiyonlarının istatistikleri. Biyolojik hedeflerine göre antibakteriyel, antiviral, antifungal antiparaziter, antiinsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve anti-tümör peptidler olarak sınıflandırılırlar (Huan ve ark., 2020).

AMPlerin transkripsiyon ve ribozomal translasyon sonrası ilk olarak pre-propeptidler oluşur ve bu prepropeptidler N-terminal sinyal dizisi, bir pro-segmenti ve bir C terminal katyonik peptid kısımlarından oluşur. N-terminal sinyal dizisi endoplazmik retikulumu hedef alırken, C-terminal peptid kısmı antimikrobik aktivite gösterir. Pro segmenti ise anyonik yüklüdür ve C-terminalinin doğru bir şekilde katlanmasını ve

olgun peptidlerin aktivitelerinin inhibe edilmesine yardımcı olur. (Kleinkauf ve von Dohren, 1990; Nicolas ve ark., 2003, Nissen-Meyer ve Nes, 1997).

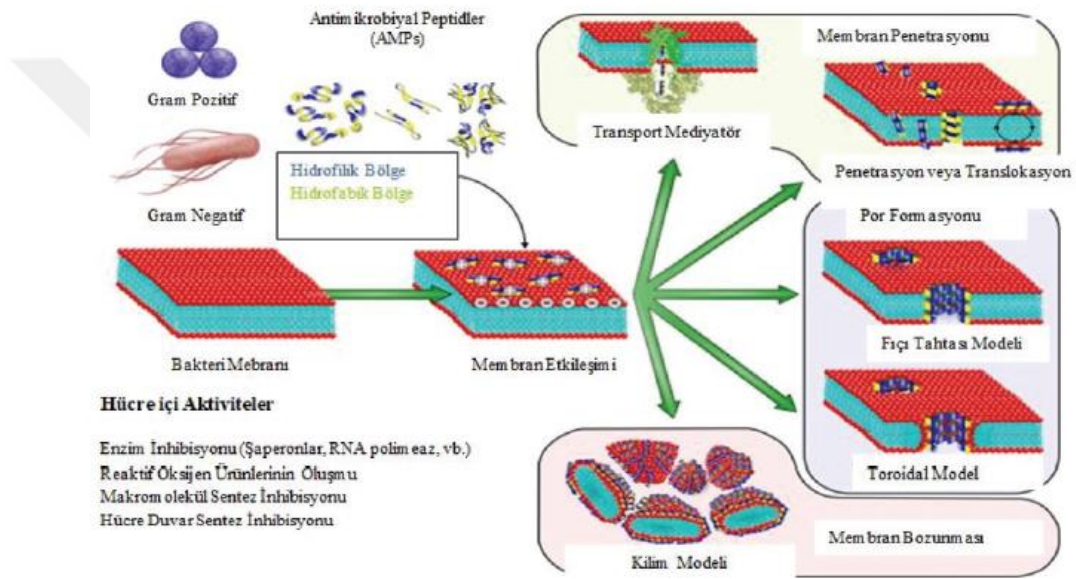
Defensinler, katelisidinler, RNase 7, psoriasin, granülsin, dermicidin ve C tipi lektinler (REG3 β ve REG3 γ) insanlarda bulunan başlıca AMP'lerdir (Cederlund ve ark., 2011; Ganz, 2003; Izadpanah ve Gallo, 2005; Wiesner ve Vilcinskas, 2010) Deri, gözler, kulaklar, ağız, bağırsaklar, bağışıklık, sinir ve üriner sistemler dahil olmak üzere çeşitli dokulardan ve epitelial yüzeylerden 100'den fazla bu tür peptit tanımlanmıştır (Wang, 2014). Birincil olarak nötrofil granülleri içinde, deri ve mukozal yüzeyleri kaplayan epitel hücrelerin salgılarında bulunurlar (Boman, 1995). AMP'ler hidrofobik, hidrofilik kısımlar içerirler ve yapılarında bulunan arginin, histidin ve lizin aminoasitleri sayesinde genellikle pozitif yüklüdürler. Bu sayede AMP'ler su içeren ortamlarda kolayca çözünebilir ve lipidden zengin membranlara girebilirler. Bu özellikleri bakteri membraniyle etkileşime girmeleri ve antimikrobiyal aktivite göstermeleri için çok önemlidir (Şekil 2.3) (Carncell ve ark., 2013; Zasloff's, 2002).

AMP ler virüs, bakteri ve fungus gibi patojenlere karşı savunma sisteminde rol alan ve immün yanıt oluşturan ilk doğal bağışıklık elemanıdır (Boman, 1995). Ayrıca adaptif immünitenin düzenlenmesine de yardımcı olurlar. Bu endojen peptidler epitel hücreleri ve fagositik hücreler tarafından sentezlenirler ve herhangi bir enfeksiyon durumuna kadar depo edilirler. Enfeksiyon durumunda ise enfeksiyona cevap olarak indüklenerek yüksek miktarlarda ifade edilirler (Hoffmann ve ark., 1999). Birçok mikroorganizma türünün üremesini inhibe ederek patojene karşı hem hızlı hem de etkin bir savunma oluşturlar (Bowdish ve ark., 2005; Carncell ve ark., 2013; Zasloff 2002).

Öte yandan peptid, hücrenin membranında por oluşturarak ya da lipid tabakayı bozarak, iki fonksiyonla da aktivite gösterebilir (Giuliani ve ark., 2008). Membranla etkileşimi açıklamak için kilim modeli, misel agregat modeli, fiçı tahtası modeli ve toroidal modeli olmak üzere birçok model tanımlanmıştır (Şekil 2.3) (Hancock ve Rozek, 2002; Mahlapuu ve ark., 2016).

Peptidlerin yapılarındaki pozitif yüklü aminoasitler negatif yüklü bakteri membrani ile herhangi bir reseptöre ihtiyaç olmadan elektrostatik olarak etkileşir. Ayrıca bakterilerin iç membranının da fosfolipit yapısından dolayı negatif yüklü oluşu

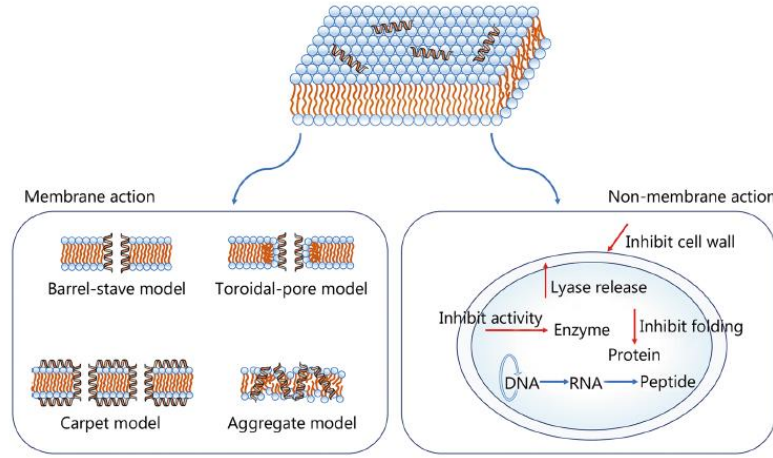
antimikrobik etkiyi kolaylaştırır. Gram (-) bakterilerde lipopolisakkarit yapıya, Gram (+) bakterilerde teikoik asite bağlanan peptidler, hücre duvarını aştıktan sonra hidrofobik etkileşimlerle ve hücrenin dengesini bozarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Hancock, 1997; Hancock ve Rozek, 2002; Madigan ve ark., 1997). Bir diğer aktivitesi ise sitoplazma membranına hasar vermeden por oluşturup hedef moleküllere tutunup mikrobiyosidal etki göstermesidir. Genetik materyalin parçalanması sağlanır ve serbest oksijen radikallerinin sentezi gibi farklı mekanizmalarla mikrobiyal çoğalmayı engeller.



Şekil 2.3. Antimikrobiyal peptitlerin hücre membranı ile etkileşim modelleri. Antimikrobiyal peptidler, hücrenin membranında por oluşturarak ya da lipid tabakayı bozarak, iki fonksiyonla da aktivite gösterir. Kilim modeli, misel agregat modeli, fıçı tahtası modeli ve toroidal modeli olmak üzere birçok model ile membranla etkileşim yaparlar (Hancock ve Rozek, 2002).

Ek olarak AMP'ler, bağışıklık sistemini düzenleyerek de mikrobiyosidal aktivitelerini gerçekleştirirler (Şekil 2.4). T hücrelerinde IFN- γ IL-6 ve IL-10 gibi; monositlerde ise TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin salınımını attırarak immün hücreleri uyarır, anti-enflamatuar etki göstererek iyileşme sürecini de hızlandırır (Mahlapuu ve ark., 2016) Nötrofillerin, monositlerin ve mast hücrelerinin kemotaksisi, anjiyogenez, fagositozun uyarılması, epitel hücreleri ve makrofajlardan

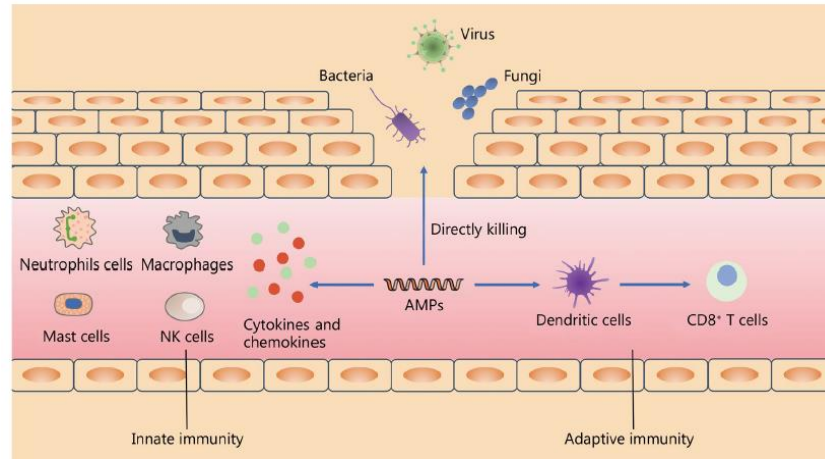
kemokin üretiminin uyarılması da (IL-8 ve MCP-1 gibi) doğal immün fonksiyonları arasındadır (Bowdish ve ark., 2005; Lai ve Gallo, 2009).



Şekil 2.4. Antimikrobiyal peptitlerin etki mekanizmaları. Sitoplazma membranına hasar vermeden por oluşturup hedef molekülere tutunup mikrobiyosidal etki göstermesidir. Ayrıca genetik materyalin parçalanması sağlanır ve serbest oksijen radikallerinin sentezi gibi farklı mekanizmalarla mikrobiyal çoğalmayı engeller (Mahlapuu ve ark., 2016).

AMP'ler sadece patojenik bakterileri öldürmekle kalmaz aynı zamanda seçici immünomodülatör etkileriyle, epitel dokusunun bariyer fonksiyonunu artırarak enfeksiyona karşı korunmaya, enflamasyonun seçici kontrolüne, yara iyileşmesinin desteklenmesine ve patojenik mikroorganizmalara karşı vücudun direncinin artmasına olanak sağlar (Şekil 2.5) (Peschel ve Sahl, 2006; Yeaman ve Yount, 2003). Çeşitli hücre büyüme faktörlerinin (vasküler endotel büyüme faktörü ve keratinosit büyüme faktörü gibi) ekspresyonunu indükleyebilir, bağırsak epitel dokusunun bütünlüğünü sağlayabilir ve bağırsak epitel hücrelerinin büyümesini uyarabilir (Otte ve ark., 2009).

AMP'lerin antibakteriyal aktiviteleri yanında, antiviral antiparaziter antifungal, antitümör, anti-endotoksik, hemolitik, kemotaktik, mitojenik gibi aktiviteleride bulunabilmektedir (Arrighi ve ark., 2002; Baker ve ark., 1993; Cruciani ve ark., 1991; Fehlbauer ve ark., 1996; Kamysz ve ark., 2003, Kieffer ve ark., 2003; Lindholm ve ark., 2002; Robinson ve ark., 1998; Tamamura ve ark., 1998; Wang ve ark., 2014).



Şekil 2.5. AMP'lerin immünomodulator mekanizmaları. AMP'ler doğal bağışıklık sistemindeki nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri ve NK hücrelerini aktive edebilir ve patojenik bakterileri öldürmek için sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini indükleyebilir. AMP'ler ayrıca adaptif bağışıklık sistemindeki dendritik hücreleri (DC'ler) aktive ederek antijenleri T hücrelerine sunumunu ve patojenik bakterileri öldürmek için sitotoksik T hücrelerin ($CD8^+$) aktivasyonunu indükleyebilir. AMP': antimikrobiyal peptidler; NK: doğal öldürücü (Zhang ve ark., 2016).

Son birkaç yıldır mikrobiyosidal aktiviteleri sayesinde AMP'leri çeşitli enfeksiyon hastalıklarında terapötik amaçlı da kullanılabileceğine yönelik çeşitli klinik faz çalışmaları yapılmaktadır (Ayhancı ve Altındış, 2019; Zhang ve Gallo 2016).

2.2. C-tipi Lektinler

C-tipi lektinler, çok çeşitli ligandları tanıyan ve memelilerde çok sayıda temel işlev için gerekli olan olağanüstü bir protein süper ailesidir. C tipi lektinler, bir veya daha fazla karakteristik C tipi lektin benzeri alana (CTLD'ler) sahip olarak tanımlanan 1.000'den fazla proteinden oluşan bir üst ailedir. Bu moleküller orijinal olarak, CTLD içindeki korunmuş kalıntılar aracılığıyla karbonhidratlara Ca_2^+ 'ya bağlı bir şekilde bağlanma yeteneklerine göre adlandırılmıştır. Bununla birlikte, birçok C-tipi lektinin CTLD'leri, Ca^{2+} 'ya bağlı karbonhidrat tanıma için gerekli bileşenlerden yoksundur ve proteinler, lipidler ve hatta inorganik moleküller dahil olmak üzere daha geniş bir ligand repertuarını tanıyabilir. En az bir C tipi lektin benzeri alana (CLTD) sahip olan C tipi lektinler, filogeni ve alan organizasyonlarına göre 17 alt gruba ayrılır (Brown ve ark., 2018; Zelensky ve Gready, 2005; Weis ve ark., 1998). Aynı zamanda enterik patojenlerin büyümesini kontrol eden doğal bağışıklığın temel bileşenleri olan C-tipi lektinler (Katakura ve ark., 2013; Sotolongo ve ark., 2012;

Thaiss ve ark., 2014) çok sayıda ince bağırsak epitel hücresi tarafından ifade edilir (Thomas ve ark., 2018; Vaishnava ve ark., 2011). Patojenlere karşı antimikrobiyal peptit ekspresyonunun indüklenmesinde bağırsak mikrobiyotası da önemli bir rol oynar.

2.3. Gastrointestinal Sistem

Gastrointestinal sistemde paneth hücreleri, goblet hücreleri ve enterositler gibi hücreler bulunur. Paneth hücreleri, özellikle bağırsak kriptlerinde lokalize olan önemli salgı hücreleridir. Salgıladıkları lizozim enzimi ve fagositoz yetenekleri ile bağırsak florasına etki ederler. Goblet hücreleri mide-bağırsak mikropları arasında fiziksel bir bariyer oluşturan ve bir glikoprotein olan musini salgılar. Müsin dehidrasyonu ile de mukus oluşur. Mukusun iki tabakadan oluştuğu kolonda, iç mukus tabakası bakteri içermezken, dış mukus tabakası bakteri ile kolonizedir (Johansson ve ark., 2008).

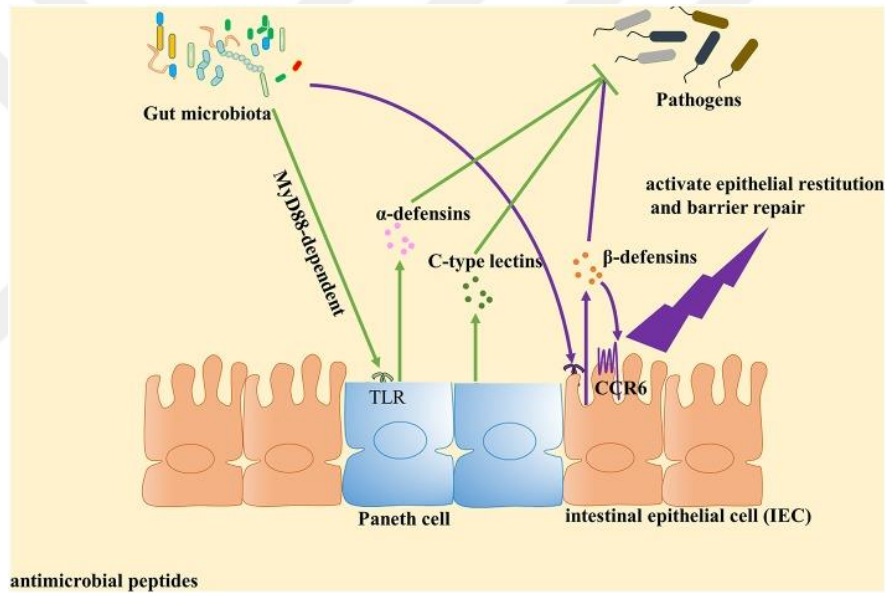
Bağırsak epitelinin bütünlüğü, gastrointestinal homeostazın sürdürülmesi için gereklidir ve bu bütünlüğün bozulması ciddi komplikasyonlara neden olabilir. AMP yanıtının bozulması ile konakçının patojenlerle (*Yersinia psödotüberküloz* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi) gastrointestinal enfeksiyona karşı duyarlılığı artabilmektedir (Muniz ve ark, 2012; Mwangi ve ark, 2019; Zong ve ark 2020).

Mukozal bariyeri sürdürmek ve konağı enterik patojenlere karşı korumak için, ince bağırsaktaki paneth hücreleri ve epitel hücreleri antimikrobiyal peptidler üretilir (Hendrikx ve Schnabl, 2019; Mukherjee ve Hooper, 2015) Bu AMP'ler, defensinler, katelisidinler, lizozimler, fosfolipazlar (Schuijt ve ark., 2013), C-tipi lektinler (Reg3 γ , Reg3 α ve Reg3 β gibi) (Muzaki ve ark., 2017), ribonükleazlar (RNazlar, örneğin anjiyogenin 4) ve S100 proteinleri (kalprotektin gibi) içeren farklı protein ailelerinden oluşur (Hendrikx ve Schnabl, 2019; Okumura ve Takeda, 2017). Böylece enterik patojenlerin epitel hücrelerini kolonize etmesi önlenir. Ribozomda sentezlenen bu antimikrobiyal peptidler, hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterileri hedefler (Cheng ve ark 2019; Iacob ve ark., 2018; Shah ve ark., 2021).

Farelerde yapılan çalışmalar, bağırsak epitel hücreleri üzerindeki TLR'ler tarafından bakteriyel tanınmanın REG3 γ ve REG3 β ekspresyonu için gerekli olduğunu ve bu

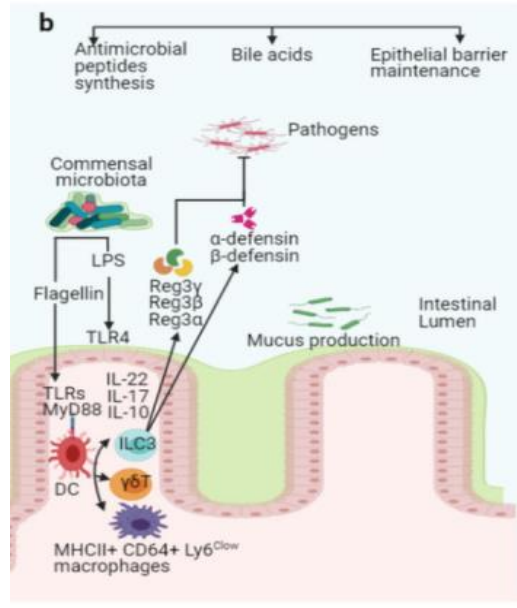
ekspresyonu yukarı regüle ettiğini göstermiştir (Brandl ve ark., 2007; Vaishnava ve ark., 2008).

Bağırsak mikrobiyotasını doğrudan algılayabilen Paneth hücreleri, MyD88 (miyeloid farklılaşma birincil tepkisi 88) bağımlı TLR (geçiş benzeri reseptör) aktive ederek α -defensinlerin ve C-tipi lektinlerin ekspresyonunu artırır (Bel ve ark., 2017; Larsson ve ark., 2012; Valentini ve ark., 2014). Dahası bağırsak mikrobiyotası, *in vitro* olarak hücre kültüründe NF- κ B ve MAPK/AP-1'e bağlı yolların aracılık ettiği b-defensin ekspresyonunu indükler. İfade edilen b-defensinler, CCR6 yoluyla bağırsak epitel hücresi (IEC) ile etkileşime girer ve böylece epitelyal restitüsyon ve bariyer onarımını sağlar (Şekil 2.6) (Cheng ve ark., 2019).



Şekil 2.6. Bağırsak mikrobiyotasının patojenlere karşı etkisi. Paneth hücreleri, MyD88 bağımlı TLR aktive ederek α -defensinlerin ve C-tipi lektinlerin ekspresyonunu artırır. Dahası bağırsak mikrobiyotası, *in vitro* olarak hücre kültüründe NF- κ B ve MAPK/AP-1'e bağlı yolların aracılık ettiği b-defensin ekspresyonunu indükler. İfade edilen b-defensinler, CCR6 yoluyla bağırsak epitel hücresi (IEC) ile etkileşime girer ve böylece epitelyal restitüsyon ve bariyer onarımını sağlar (Cheng ve ark., 2019).

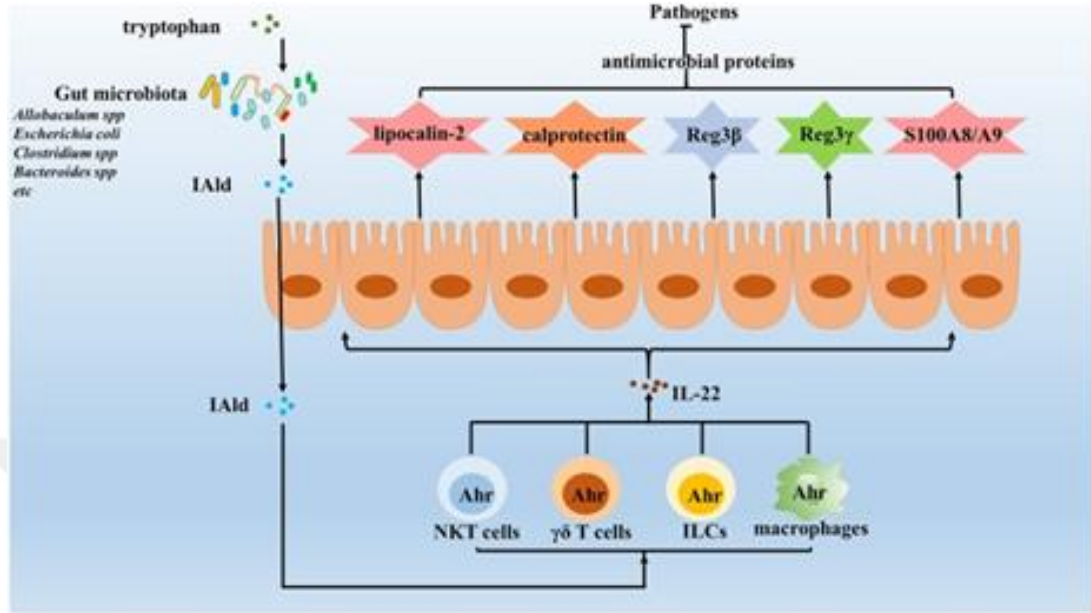
Bağırsak mikrobiyotası, doğrudan ve dolaylı kolonizasyon direnç mekanizmaları yoluyla enterik patojenlere karşı bir bariyer görevi görür. Kommensal bakterilerden elde edilen flagellin veya LPS gibi yüzey antijenleri, epitelyal veya dendritik hücreler (DC'ler) üzerindeki TLR'ler ve MyD88 aracılığıyla konakçının doğuştan gelen bağışıklığını uyarır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Bağırsak mikrobiotasının dolaylı kolonizasyon direnç mekanizması. Kommensal bakterilerden elde edilen flagellin veya LPS gibi yüzey antijenleri, epitelyal veya dendritik hücreler (DC'ler) üzerindeki TLR'ler ve MyD88 aracılığıyla konakçının doğuştan gelen bağışıklığını uyarır (Shah ve ark., 2021)

Bağırsaklarda patojen kolonizasyonunu engellemek için ILC3, $\gamma\delta$ T ve Th17 hücreleri IL-10, IL-17 ve IL-22 sitokinlerini üreterek, α -defensin, β -defensin Reg3 α Reg3 β ve Reg3 γ , gibi antimikrobiyal peptidlerin salgılanmasını aktive eder (Shah ve ark., 2021). Mukozal bariyer bütünlüğünün korunması için doğal immün hücreler tarafından IL-10, IL-17 ve IL-22 sitokinlerinin üretiminin uyarılması hayati önem taşır (Cheng ve ark., 2019; Tyler ve ark., 2017). IL-22, mukozal bariyer bütünlüğünü korumada önemlidir ve birçok farklı türde doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından üretilir (Mabuchi ve ark., 2011; Malhotra ve ark., 2016; Steinbach ve ark., 2016; Tyler ve ark., 2017). Doğal lenfoid hücrelerin (ILC), patojen kolonizasyonunu azaltarak konakçıyı fırsatçı patojenlere karşı korumak için IL-22 salgıladığı gösterilmiştir (Behnsen ve ark., 2014; Valeri ve Raffatellu, 2016). Bağırsaklarda tip-3 doğal lenfoid hücreler (ILC3'ler) tarafından eksprese edilen aril hidrokarbon reseptörünü (AhR) aktive ederek IL-22 sitokininin üretimi artırır. Patojen istilasına yanıt olarak hızla REG3 γ 'nin bağırsak epitelyal hücre ekspresyonu artar (Şekil 2.8) (Cheng ve ark., 2019; Gao ve ark., 2018; Lee ve ark., 2011; Murray ve ark., 2017; Sonnenberg ve ark., 2011; Yitbarek ve ark., 2018; Zelante ve ark., 2013). Ayrıca doğuştan gelen diğer bağışıklık hücrelerinin de (NKT hücreleri, $\gamma\delta$ T hücreleri ve

makrofajlar gibi) AhR yoluyla IL-22'yi salgılayarak bağırsak mikrobiyotasını düzenledikleri gösterilmiştir (Krishnan ve ark., 2018).



Şekil 2.8. Bağırsak mikrobiotasının IL22 üretimi. Bağırsak mikrobiyotası, istilacı patojenlere karşı IL-22 ekspresyonunu artırır. IL-22, mukozal bariyerlerin bütünlüğünü korumada önemlidir. Bağırsak mikrobiyotası enerji kaynağı olarak triptofanı kullanarak bir metabolit olan indol-3-aldehit (Iald) üretir ve bunun da doğuştan gelen bağışıklık hücreleri üzerinde AhR'I aktive eder. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri etkinleştirildikten sonra, kolonizasyonlarını azaltarak konakçıyı fırsatçı patojenlere karşı koruyan IL-22'yi salgılayacaktır (Cheng ve ark., 2019)

TCR $\gamma\delta^+$ intraepitelyal lenfositleri tarafından üretilen ve proinflamatuvar sitokin olan IL-17 ortama nötrofilleri çağırır ve antimikrobiyal peptitleri indükleyerek bağırsaklarda *S. Typhimurium* ve *C. albicans* çoğalmasını engeller (Cheng ve ark., 2019; McGeachy ve ark., 2019). Makrofajlar tarafından salgılanan antiinflamatuvar sitokin olan IL-10 ise patojenlere karşı bağışıklık tepkisini düzenler ve bağırsak homeostazını korur (Morhardt ve ark., 2019). Makrofajlar tarafından IL-10 salgılanamaması durumu ince bağırsak epitel bariyerinin iyileşmesini geciktirmiştir.

C tipi lektinler inflamatuvar bağırsak hastalığının gelişimini etkileyen gastrointestinal bakteriyel mikrobiyotayı da kontrol eder. İki C tipi lektin olan REG3 γ ve REG3 β , *Enterococcus faecalis* (Abreu, 2010; Gallo ve Hooper, 2012; Mukherjee, 2015), *Listeria monocytogenes* (Abreu, 2010) ve *Yersinia pseudotuberculosis* (Dessein ve

ark., 2009; Burger-van Paassen ve ark., 2012) dahil olmak üzere spesifik bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma sağlar (Cheng ve ark., 2019).

Viral glikoproteinlerin miyeloid hücrede eksprese edilen C-tipi lektinler tarafından tanınması, virüs partiküllerinin alınması ve parçalanması gibi antiviral tepkileri ve adaptif bağışıklık tepkilerinin indüklenmesini sağlayan önemli bir koruyucu role de sahiptir (van den Berg ve ark., 2015) C tipi lektinler, B ve T hücresi gelişimi için önemlidir; örneğin, işlevsel Treg'lerin geliştirilmesi için C-Tipi lektin proteini CD69'un ifadesi gereklidir (Cibrian ve Sanchez-Madrid, 2017).

2.4. Reg Ailesi

Rejenere edici adacık türevi (REG/Reg) proteinler, küçük salgılayıcı C tipi benzeri lektinlerdir. Reg proteinleri bakteriyel şekerleri ve peptidoglikanları Ca_2^+ bağımsız etkileşimler yoluyla C tipi lektin alanları (CTLD) aracılığıyla bağlar ve bakterisidal etki gösterirler. (Chakraborty ve ark., 1995; Dieckgraefe ve ark., 2002; Hartupée ve ark., 2001; Katsumata ve ark., 1995; Lasserre ve ark., 1994).

Yonemura ve ark. (1984), kısmen pankreatektomize edilmiş sıçanlarda nikotinamid uygulamasının pankreas adacıklarının yenilenmesini hızlandırdığını buldular. Daha sonra, Terazono ve arkadaşları tarafından Reg geni ilk olarak 1988'de pankreas adacıklarında tespit edildi. Reg1 geni, çeşitli gruplar tarafından bağımsız olarak keşfedildi ve litostatin, pankreas taşı proteini (PSP), P19 ve pankreatik iplik proteini (PTP) gibi farklı isimler altında rapor edildi (Gross ve ark., 1985; Terazono ve ark., 1988; Watanabe ve ark., 1990; Zhang ve ark., 2003).

Reg proteinleri mide mukozasında, kolonda ve ince bağırsakta ifade edilir ve hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, farklı araştırma grupları arasında standart Reg gen/protein terminolojisinin kullanılması esastır.

2.4.1. Reg Ailesinin Üyeleri

Günümüze kadar 17 tane REG gen ailesi tanımlanmıştır. Birincil yapılarına bağlı olarak Reg1, Reg2, Reg3 ve Reg4 olmak üzere dört protein grubundan oluşur (Okamoto, 1999). REG1A, REG1B, REG3A (PAP), REG3G ve REG4 dâhil olmak

üzere insanlarda beş Reg aile üyesi tespit edilmiştir ve bunlar 30 ila 80 arasında homolog dizileri paylaşır (Tablo 1).

Tablo 2.1. Fare, Rat ve İnsanda Reg Ailesi Üyeleri (Parikh ve ark., 2012).

Name	Other names	Related tissue or organ
Mouse		
Reg1	Reg, PSP, PTP (cleaved form), Lithostathine	Pancreas, gallbladder
Reg2	PTP2, PSP2, Lithostathine 2	Pancreas, Schwann cells, motor neuron cells
Reg3 α	PAP II	Pancreas, intestinal tract
Reg3 β	PAP I, PAP, HIP	Pancreas, small intestine, liver
Reg3 γ	PAP III	Pancreas, intestinal tract
Reg3 δ	INGAP-rp, INGAP	Pancreas, stomach, duodenum, skeletal muscle
Reg4	REL P	Small intestine, gastrointestinal mucosa
Rat		
Reg1	Reg, PSP, PTP (cleaved form), Lithostathine	Pancreas, stomach, duodenum
Reg3 α	Reg3, PAP II	Pancreas
Reg3 β	PAP, PAP I, HIP, Reg2, Peptide23	Pancreas, small intestine, motor neurons
Reg3 γ	PAP III	Pancreas, small intestine
Reg4	RegIV	Small intestine
Human		
REG1 α	PSP, Lithostathine, PTP	Pancreas, gastric mucosa, colorectal cells, neurons
REG1 β	REGH, REGL, Lithostathine, RS	Pancreas
REG3 β	REG3A, PAP, HIP, PAP I, Reg2, PTP	Pancreas, liver, hepatocellular carcinoma
REG3 γ	Reg3, PAP IB, PAP II, PAP III	Pancreas, liver, hepatocellular carcinoma
REG4	REGIV	Intestine, liver, pancreatic adenocarcinoma

Farelerde Reg1, Reg2, Reg3 α , Reg3 β , Reg3 γ , Reg3 δ ve Reg4'ün aile üyeleri yüzde 50'den fazla homolog diziyi paylaşırlar ve benzer biyolojik işlevlere sahiptirler (Chen ve ark., 2019; Okamoto, 1999; Parikh ve ark., 2012).

2.4.2. Reg Proteinlerinin Yapısı

Reg 1, 21 amino asit sinyal peptidi ile 165 amino asitlik bir proteini kodlayan bir gendir. Reg ailesinin çoğu üyesi, ekzon sayısı ve kromozom yeri bakımından benzer bir organizasyona sahiptir (Okamoto, 1999).

Reg proteinlerinin moleküler ağırlığı yaklaşık 17 kDa'dır. Sadece Reg4 geni yedi ekzondan oluşurken, diğer Reg genleri altı ekzondan oluşur. Tüm insan REG genleri ikinci kromozomda (2p12) bulunurken, REG4 geni kromozom 1'de (1p11-3) bulunur (Chen ve ark., 2019; Hartupée ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2013).

2.4.2.1. REG1A Proteinin Yapısı

REG1 geninin REG1A ve REG1B olmak üzere 2 formu bulunmaktadır. Bunlar fare ve insanlarda ifade edilir. İki protein birbirine % 87 homologdur ve fare Reg1 ile % 72-74 benzerlik gösterir (Şekil 3A) (Chen ve ark., 2019). Litostatin-1-alfa adacık hücreleri rejenerasyon faktörü (ICRF) veya Pankreas Taş Proteini (PSP) olarak da bilinen Langerhans rejenerasyon proteini adacığı (REG), insanlarda REG1A geni tarafından kodlanan bir proteindir.

REG1A, B hücrelerine etki eden bir büyüme faktörüdür. Bu gen pankreasının % 90'ı alınan bir farenin tekrar rejenere olan pankreas adacıklarının incelenmesi sırasında tanımlanmıştır (Terazono ve ark., 1988). Bu genin hücrel proliferasyon, farklılaşma, rejenerasyon, inflamasyon ve tümörögenez sırasında apoptoza direnç gibi biyolojik fonksiyonlarda rol oynadığı belirtilmiştir (Dhar ve ark., 2004).

Gebeliğin 16. Haftasından sonra REG1 mRNA'sı, insan asiner pankreasında 20 kat artış gösterir. REG1 m-RNA primer olarak pankreasta olmakla birlikte; mide mukozası ve böbreklerde daha düşük seviyelerde bulunmaktadır (Watanabe ve ark., 1990).

REG1B Litostatin-1-beta, insanlarda *REG1B* geni tarafından kodlanan bir proteindir.

2.4.2.2. REG2 Proteinin Yapısı

Fare Reg2, Reg1'e en yüksek sekans benzerliğine (% 76) sahipken, Reg2'nin insan ortoloğu yoktur (Chen ve ark., 2019).

2.4.2.3. REG3A Proteinin Yapısı

C tipi lektinler Reg3 γ , Reg3 α , Reg3 β , ince bağırsakta enterik patojenlerin büyümesini engelleyen doğuştan gelen bağışıklığın temel bileşenleridir. Reg3 grubu, kemirgen Reg3 α , Reg3 β , Reg3 γ ve Reg3 δ içerir. İnsanda ise sadece REG3A ve REG3G ifade edilir. REG3A ayrıca hepatokarsinom-bağırsak pankreatik protein

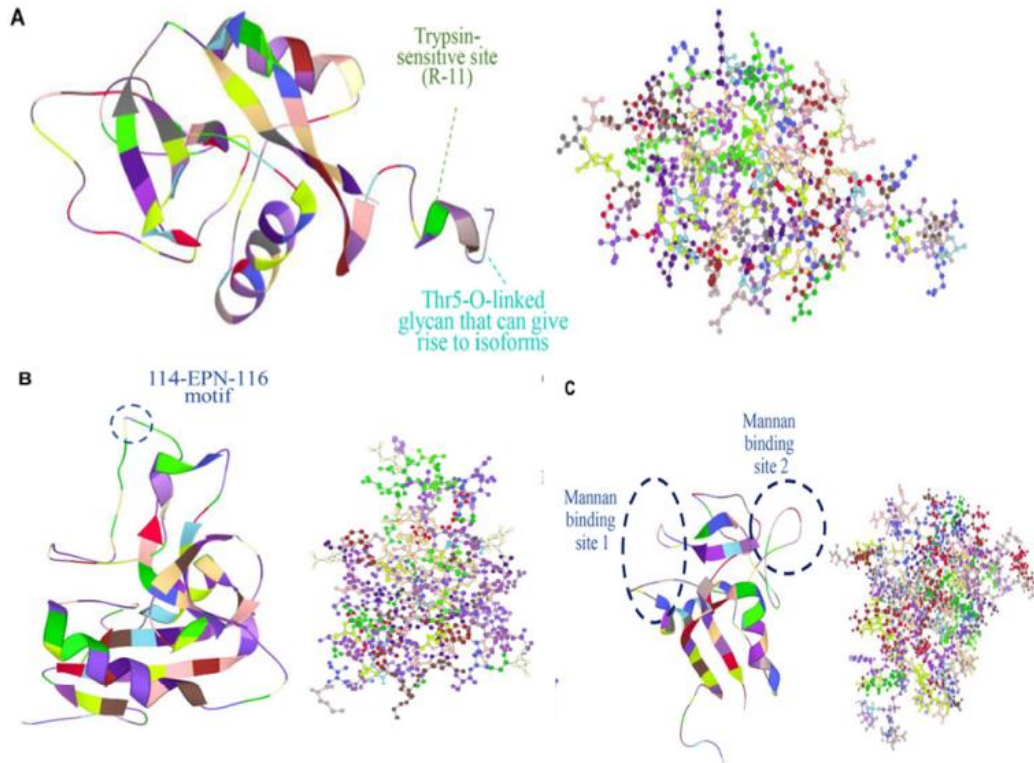
(HIP), pankreatit ile ilişkili protein (PAP) ve PAP1 olarak da rapor edilir. REG3A, fare Reg3 α ve Reg3 γ ' ye % 62-67 ve Reg3 β 'ye % 70 homologdur (Şekil 3B) (Gross ve ark., 1985).

2.4.2.4. REG3G Proteinin Yapısı

REG3 / HIP (insan hepatokarsinomu - bağırsak - pankreas) / PAP (insan pankreatiti ile ilişkili protein), normal ince bağırsak ve pankreasta seçici olarak eksprese edilir (Lasserre ve ark., 1992; Zhao ve ark., 2013). REG3G PAP1B olarak da anılır. REG3G, fare Reg3 α , Reg3 β ve Reg3 γ ' ye % 65-66 homologdur (Chen ve ark., 2019).

2.4.2.5. REG4 Proteinin Yapısı

REG4, insanlarda *REG4* geni tarafından kodlanan bir proteindir. Reg4, yalnızca bir üye içerir (Şekil 3C) (Chen ve ark., 2019; Hartupée ve ark., 2001). Reg4, kolorektum, ince bağırsak, mide, pankreas, apendiks ve adrenal bez gibi birçok insan dokusunda eksprese edilir (Hartupée ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2003).



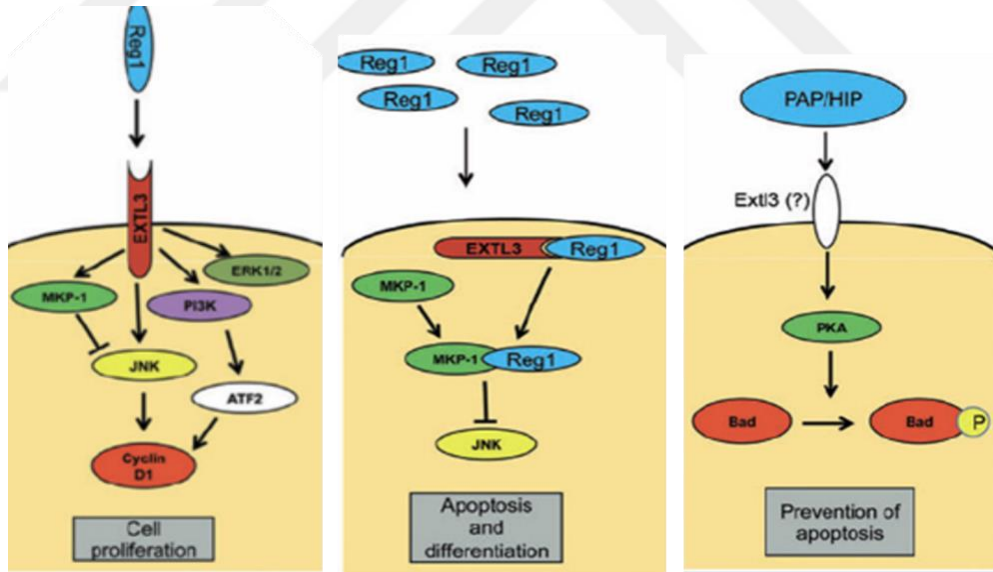
Şekil 2.9. REG Proteinlerinin 3 boyutlu yapısı. **A)** REG1A, **B)** REG3A, **C)** REG4 (Chen ve ark., 2019).

2.4.3. Reg Proteinlerinin Reseptörleri

Reg proteinleri için birkaç reseptör de tanımlanmıştır. Bunlar; Reg1 α -Extl3; REG3A-EXTL3 ve EGFR, Reg3 γ -Extl3; Reg3 β -gp130; REG4-GPR37' tür (Shin ve ark., 2019).

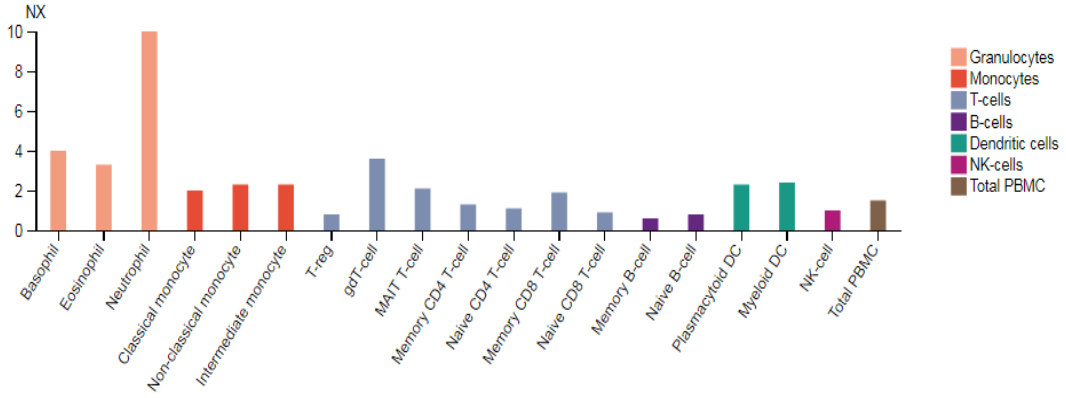
2.4.3.1. EXTL3 Reseptörü

Ekzostosin benzeri 3 (EXTL3); Heparan sülfatın (HS) biyosentezini düzenleyen glikosil transferaz olup HS proteoglikanlarının (HSPG'ler) oluşumu yoluyla hem iskelet gelişimi hem de hematopoez için önemlidir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Reg3 γ -Extl3 bağlanmasının, fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)-AKT sinyal yolunu aktive ederek keratinosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemedeki işlevi için gerekli potansiyel bir reseptör olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.10). EXTL3, deri, karaciğer, böbrek, yağ dokusu, mide, ince bağırsak, kolon, pankreas, adrenal bez, hipofiz bezi ve beyin gibi çeşitli dokularda ifade edilir (Lai ve ark., 2012; Motoyama ve ark., 2006; Shin ve ark., 2019).



Şekil 2.10. Reg1 ve Reg3 proteinleri, reseptörü olan Extl3 üzerinden hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozunu düzenler. Reg1, PI3K'yi uyararak ATF-2'yi ve siklin D1 ifadesini hedefler. Ayrıca Reg1 sinyali ERK1/2 aracılığıyla da iletilebilir. Hücre dışı Reg tarafından tetiklenen sinyaller, JNK'nin MKP1 yoluyla dolaylı olarak baskılanmasına (—|) neden olur. Eksojen Reg'in yüksek konsantrasyonlarında ligand, Extl3 reseptörü ile kompleks oluşturur ve MKP-1 ile etkileşime girerek JNK aktivitesini inhibe ederek apoptoz ve farklılaşmaya yol açar. PAP/HIP (Reg3 β), PKA'yı aktive ederek Bad'in fosforilasyonunu teşvik eder ve böylece apoptozu önler (Parikh ve ark., 2012).

EXTL3 ün hematopoietik kök hücrelerde ve erken T hücrelerinde bol miktarda bulunduğu (Oud ve ark., 2017) ve *EXTL3* mutasyonlarının da Primer İmmün yetmezliğe neden olduğu ve T hücre gelişimini regüle ettiği bilinmektedir (Volpi ve ark., 2017).



Şekil 2.11. EXTL3 un kanda RNA düzeyinde ifadesi (<https://www.proteinatlas.org/ENSG0000012232-EXTL3/blood>, Erişim Tarihi: 7.09.2020.).

2.4.4. Reg Proteinlerinin Moleküler Fonksiyonları

REG gen ailesi çeşitli akut faz reaktanlarını, lektinleri, antiapoptotik faktörleri ve pankreas ada hücreleri ile nöral hücreleri etkileyen büyüme faktörlerini içermektedir (Broekaert ve ark., 2002; Chen ve ark., 2019; Dusetti ve ark., 1994).

Reg proteinlerinin ekspresyonları, belirli büyüme faktörleri veya sitokinler tarafından uyarılır. Birkaç Reg ailesi üyesinin, farklı sinyal yollarını aktive ederek farklı hücre tiplerinde proliferasyonu, farklılaşmayı teşvik ettiği ve apoptozu önlediği gösterilmiştir. (Chen ve ark., 2019). Örneğin, pankreas duktal adenokarsinom (PDAC) ve diyabet hastaları, sağlıklı deneklere kıyasla daha yüksek REG1A serum seviyelerine sahiptir ve REG3A, duktal sıvıda da artar (Astorri ve ark., 2010; Li ve ark., 2016b; Porterfield ve ark., 2014; Yang ve ark., 2015). REG proteinleri, immün aracılı hastalıklar için potansiyel tanısal belirteçler ve / veya terapötik hedefler olarak kabul edilmiştir (Takasawa, 2016).

2.4.4.1. REG1'nin Moleküler Fonksiyonları

Reg1A geninin aşırı ekspresyonu pankreatik kanser hücrelerinde incelenmiş ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak hızlandırılmış hücre proliferasyonu ve tümör büyümesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2016b).

REG proteinlerinin insan iltihaplı bağırsak hastalığında (IBD) kesin rolleri tanımlanmamışsa da, fare çalışmaları, Reg proteinlerinin hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda bağırsak homeostazını sürdürmek için gerekli olduğunu doğrulamıştır (Edwards ve ark., 2020). Ose ve arkadaşları (Ose ve ark., 2007), Reg1 eksikliği olan farelerde kriptlerde kök hücre proliferasyonunun azaldığı ve ince bağırsakta villus boyunca epitel göçünün bozulduğunu bildirerek, Reg1'in bağırsak villöz yapısının korunması ve yenilenmesindeki rolünü ortaya çıkarmıştır.

2.4.4.2. REG3 Proteinlerinin Moleküler Fonksiyonları

Reg1 proteini gibi, Reg3 proteinleri de yaralı bağırsakta koruyucu bir role sahiptir. Reg proteinlerinden, insan REG3A ve fare Reg3 γ , bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesine katkıda bulunan antimikrobiyal peptitler olarak işlev görür (Chen ve ark., 2019; Vaishnava ve ark., 2011). Reg3 proteinleri esas olarak ince bağırsak boyunca eksprese edilir ve bakterisidal aktivite yoluyla konakçı savunma sürecini modüle eder. Çok çeşitli çalışmalar, Reg3 ailesinin mikrobiyotanın konakçıdan fiziksel olarak ayrılmasında ve enterik patojenler tarafından indüklenen bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

İnsan Protein Atlasından alınan RNA ve protein verilerine göre, REG3A, gastrointestinal sistemde en yüksek seviyelerde ifade edilir (THE HUMAN PROTEIN ATLAS 2020). Ekspresyonu, bakteriyel kolonizasyonla tetiklenir (Ogawa ve ark., 2003, Cash ve ark., 2006) ve inflamatuvar bağırsak hastalığında upregüle edilir (Syder ve ark., 2003). PAP (REG3) genlerinin fetal pankreas, mide, jejunum ve kolonda da ifade edildiği bildirilmiştir (Bartoli ve ark, 1998).

Aynı zamanda REG3A vücut sıvısında incelenmiş antimikrobiyal peptidlerin aracılık ettiği mikroplara karşı immün yanıt oluşumunda ve hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu bildirilmiştir.

Reg3 γ knockout konakçıların, kısmen intestinal kök hücrelerin apoptozdan Reg3 γ aracılı korunmasına bağlı olarak, grefte karşı konakçı hastalığına (GVHD) daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Yapılan fare çalışmaları Reg3 γ 'in da antibakteriyel ve antienflamatuar süreçlerde, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını tetiklemeye rolleri olduğunu göstermektedir (Lehotzky ve ark., 2010). Bunun yanı sıra, Reg proteinlerinin son zamanlarda hem antimikrobiyal aktivite hem de yara onarımıyla ilişkili olarak T yardımcı (Th) 17 hücre aracılığıyla deri iltihaplanmasına etkili olduğu gösterilmiştir (Lai ve ark., 2012). Ex vivo kültürlerde Reg3 γ 'nın T hücreleri üzerindeki doğrudan etkileri araştırılmamıştır.

Sedef hastalığı, aşırı epitel hücre proliferasyonu ve artmış antimikrobiyal savunma ile karakterize bir cilt hastalığıdır (de Jongh ve ark., 2005; Wolk ve ark., 2006). REG3A'nın bağırsakta doku rejenerasyonunu ve bağışıklık savunmasını etkilediğine dair önceki çalışmalara ek olarak (Lieu ve ark., 2005; Okamoto, 1999; Vaishnava ve ark., 2011), REG3A veya Reg3 γ 'in psoriasis hastalarının deri hasarından sonra hiperproliferatif keratinositlerinde de ifadesinin arttığı rapor edilmiştir (de Jongh ve ark., 2005).

Antimikrobiyal fonksiyonuna ek olarak, REG3A'nın fare homologu olan Reg3 γ 'nin ekspresyonu, mukozal hasar ve karaciğer hasarı gibi birkaç doku yaralanmasından sonra arttığı ve doku rejenerasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Lai ve ark., 2012).

REG3A'nın, kolorektal kanser, gastrik kanser olma üzere çoğu kanser türlerinde etkisinin olduğu bildirilmiştir (Lieu ve ark., 2005). REG3A'nın ekspresyonunun artmasından dolayı tümör boyutunda büyüme, olumsuz farklılaşmalar, tümör evresinin daha hızlı ilerlemesi ve daha düşük sağ kalımla ilişkili olduğu ve azalan ekspresyon ile de hücre migrasyonu ve invazyonunun inhibe edilmesidir (Ye ve ark., 2016).

REG3A, pankreasta az miktarda salgılanırken, akut pankreatitte ekspresyonu önemli miktarda artar ve asiner hücrelerin apikal bölgelerine immüno lokalize olabilir (Li ve ark., 2016b). Ayrıca diyabet ve pankreatitte de Reg3A yüksek miktarda ifade edildiği için pankreatik inflamasyonda önemli bir rol oynar (Liu ve ark., 2015).

Birçok araştırmada Reg3A'nın, yenidoğanlarda Kistik Fibrozis (KF) hastalığının erken teşhisinde belirleyici ajan olarak kullanılabilen önemli bir protein olduğu

gösterilmiştir (Barthelme ve ark., 2001; Sarles ve ark., 1999; Sarles ve ark., 2005; Sommerburg ve ark., 2014).

2.4.5. Reg'in Sinyal Yolakları

Reg proteinlerinin, birçok insan kanserinde ekspresyonu artar ve bu proteinler rollerini çeşitli sinyal yollarıyla oynarlar. Reg1'in MKP-1 ve CyclinD1 tarafından hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını indüklediği bildirilmiştir (Mueller ve ark., 2008; Parikh ve ark., 2012; Takasawa ve ark., 2006). Aynı zamanda REG1A, mide kanseri hücrelerinde Akt ve Bad'in ekspresyonunu ve fosforilasyonunu artırarak STAT3 sinyal yolu aracılığıyla bir anti-apoptotik faktör görevi görür (Sekikawa ve ark., 2008). Reg3A, PI3K/Akt-GSK3 β sinyal yolu eksenini boyunca gastrik kanser hücrelerinin invazyonunu, proliferasyonunu ve apoptozisini düzenler (Qiu ve ark., 2018). Dahası Reg3A'nın aşırı ekspresyonu Akt fosforilasyonunu artırır ve CyclinD1/Cyclin-bağımlı kinaz 4 (CDK4) sinyal yolunu aktive ederek hücre büyümesini uyarır (Xu ve ark., 2016).

Son çalışmalarda, Reg3A'nın IL-6 aracılı JAK2 / STAT3 sinyal yoluyla pankreatik kanser hücresi büyümesini hızlandırdığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2019; Ye ve ark., 2016).

Yapılan başka bir çalışmada, Reg3 γ -Extl3 bağlanmasının PI3K-AKT sinyal yolunu aktive ederek keratinosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir (Lai ve ark., 2012).

Reg3 γ 'nın, tümörlerde epidermal büyüme faktörü reseptörü EGFR/ JAK2 / STAT3 yolu üzerinden sinyal verdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2017).

2.4.6. Reg Proteinlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Reg proteinleri, diyabet, pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), kalsifiye pankreatit, Alzheimer hastalığı ve gastrointestinal (GI) sistem kanserleri gibi birçok hastalıkta rol oynar (Chen ve ark., 2019).

REG gen ekspresyonu; rejenere olan pankreas ada hücrelerinde artarken, insülin gen ekspresyonu inhibe olduğunda azaldığı bildirilmiştir (Takasawa ve Okamoto, 2002).

2.4.6.1. REG1'in Hastalıklarla İlişkisi

REG1A ve REG1B gibi Reg ailesi üyeleri, diyabet ve gastrointestinal kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. REG1A ekspresyonunun inflamatuvar ve gastroenterik dokuların karsinogenezinde olan etkisi araştırılmıştır (Sekikawa ve ark., 2005a; Sekikawa ve ark., 2005b). REG1A geni karsinogenez sırasında tropik bir etki göstermektedir. Akciğer, mide, kolon ve safra yolunda REG1A negatif olan tümörlü hastalarda yaşam sürelerinin daha iyi olduğu gösterilmiştir (Dhar ve ark., 2004; Harada ve ark., 2001; Macadam ve ark., 2000; Motoyama ve ark., 2006; Minamiya ve ark., 2008; Yonemura ve ark., 2003).

REG1A ve REG1B, inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) (van Beelen Granlund ve ark., 2013) ve ülseratif kolit (UC) (Tsuchida ve ark., 2017) olan insan kolon ve mide mukozasında yukarı regüle edilir.

Çölyak hastalığında, REG1A'nın serum seviyeleri normalden iki kat daha fazladır, ancak glütensiz bir diyet ile azalır (Planas ve ark., 2011).

Önceki çalışmalar, çeşitli türlerde nöronlarda Reg ailesi proteinlerinin üyelerinin ekspresyonunu göstermiştir. Reg1a'nın nöronal büyümede rol aldığı bildirilmiştir (van Ba ve ark., 2012). REG1 ve REG3 ekspresyonu, Alzheimer hastalarının plaklarında ifadesi ve beyin omurilik sıvısında varlığı rapor edilmiştir (Ozturk ve ark., 1989). Alzheimer hastalarında PTP (litostatin) reaktif beyin lezyonları ve yüksek REG1A ekspresyonu gözlenmiştir (de la Monte, 1990; Ozturk ve ark., 1989). Ayrıca Reg1a'nın sıçanlarda EXTL-3 reseptörünü bağlayarak nörit büyümesini uyardığı bildirilmiştir (März-Weiss ve ark., 2011).

2.4.6.2. REG3'ün Hastalıklarla İlişkisi

Reg3 γ nin, aseptik yaralar veya sedef hastalığı (Lai ve ark., 2012; Wu ve ark., 2016) gibi deri lezyonları olan epidermal keratinositlerde ve ayrıca pankreatit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı sırasında pankreas ve kolonda ifadesi artmıştır (Gironella ve ark., 2013; Ogawa ve ark., 2003).

Fare Reg3'ün, motor nöronların yenilenmesine eşlik eden bir Schwann hücre mitojeni olduğu bildirilmiş ve Reg proteininin motor nöronlar için nörotrofik bir

faktör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Livesey ve ark., 1997; Okamoto ve Takasawa, 2002).

Bununla birlikte, sıçan motor nöronlarında, yaralanmanın ardından Reg1, Reg3 β , Reg3 α , Reg3 γ ve Reg4'ün arttığı gösterilmiştir (Gironella ve ark., 2005).

REG3A'nın travmatik beyin hasarlı hastalarının merkezi nöronlarında aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (März-Weiss ve ark., 2011).

Yakın zamanda Eken ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (Eken ve ark., 2021), Reg3 γ 'nın sistemik artışıyla MS fare modeli olan DOE'yi ağırlaştırdığı rapor edilmiştir. REG1A, REG1B, REG3A ve EXTL3'ün MS hastalarında kontrolle kıyaslandığında BOS'taki ekspresyonu m-RNA düzeyinde bir farklılık göstermemiştir. İlginç bir şekilde, Reg3 γ aşırı ekspresyonu DOE skorlarını, demiyelinizasyonu şiddetlendirmiş ve beyne ve omuriliğe lenfositlerin ve Th1 / Th17 hücrelerinin yüksek infiltrasyonu ile ilişkili olup, Reg3 γ 'nin doğrudan veya dolaylı olarak lenfosit fonksiyonlarını etkileyebileceğini düşündürmüştür.

REG3A'nın, ince bağırsakta enflamasyonu azaltmak ve bağırsak mikrobiyotasını düzenlemek için IBD'de ekspresyonu artar (Darnaud ve ark., 2018; van Beelen Granlund ve ark., 2013).

REG3A, antibakteriyel aktivitesinin yanı sıra, allojenik kemik iliği transplantasyonunda greft-versus-host hastalığı (GVHD) ile kript hücrelerinin apoptozunu önlemek için hayatta kalma sinyali görevi görür (Zhao ve ark., 2018). Reg proteinleri ayrıca yara iyileşmesinde rol oynar. REG3A, cilt yaralanmasından sonra IL-17 artmasıyla keratinosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırır. İnsan REG3A veya murin Reg3g, sedef hastalığında epidermal hiperproliferatif keratinositlerde aşırı eksprese edilir (Lai ve ark., 2012).

2.5. Multipl Skleroz Patogenezi

Multipl Skleroz, genelde genç erişkinlerde görülen beyin ve omurilikte demiyelinizasyona ve aksonal hasara yol açan merkezi sinir sistemini etkileyen, kronik ve otoimmün bir hastalıktır. Hastalığı ilk kez 1824'te Charles Prosper Ollivier iltihaplanma, demiyelinizasyon ve aksonal hasar olarak tanımlamıştır (Murray,

2009). Başışıklık sistemi, beyin, omurilik ve optik sinir dokularına saldırarak merkezi sinir sistmine hasar vermektedir. Merkezi sinir sisteminde sinir hücrelerini çevreleyen ve koruyan miyelin kılıfın hasar görmesi sonucu miyelin kaybı, mikrogliyal aktivasyon ve oligodendrosit kaybı görülür. Sinir lifleri beyine giden ve beyinden gelen elektrik uyarılarını iletmez. Oluşan aksonal bozulma sonucunda bu bölgelerde plaklar oluşur (Filippi ve Rocca, 2005; Trapp ve Stys, 2009). Multipl Skleroz'den etkilenmeyen kişilere göre etkilenen kişilerde sinir dokuları geri döndürülemez bir şekilde tahrip olduğundan dolayı bu kişilerde beyin daha hızlı bir şekilde atrofiye uğrar (De Stefano ve ark., 2010; Kuhlmann ve ark., 2002; Sbardella ve ark., 2013).

MS genellikle 20–50 yaş aralığını etkileyen genç erişkinlerde görülen nörolojik hastalıkların en yaygınıdır. Kadınlarda daha ciddi düzeyde semptomlar gözlenirken çocuklarda ise daha az semptomlar görülür. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklerden 3 kat fazladır (Milo ve Kahana, 2010; Milo ve Miller, 2014). MS'in bulguları lezyonların sıklığına, yerine ve büyüklüğüne bağılı olarak değışir (Ascherio ve Munger, 2007). Kişilerde yorgunluk, hareket bozuklukları, epileptik nöbet, baş ağrısı, işitme kaybı, duysal bozukluk, ataksi, mesane problemleri, görme bulanıklığı, çift görme gibi görsel belirtiler, bellek-konsantrasyon-dikkat bozukluğu ve depresyon sık görülen belirtilerdir. Hastalığın başlama şekline ve prognoz durumuna göre Relapsing remitting (alevlenen-sönen) MS (RRMS), Primer progresif MS (PPMS), Sekonder progresif MS (SPMS), Relapsing progresif (İlerleyici) MS (RPMS) olmak üzere guruplara ayrılmıştır. (Krieger ve Sumowski, 2018)

MS gelişimi immünolojik bir arka plana sahip olmakla birlikte genetik, çevresel ve dış faktörlerden etkilenmektedir. Çevresel faktörler arasında en sık bahsedilen Epstein-Barr virüsü enfeksiyonu yer almaktadır. (Ascherio ve Munger, 2007, Börü ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda hastaların %94'ü bu virüs ile enfekte olmuştur (Weinshenker 1995). D vitamini eksikliği, sigara kullanımı ve ergenlik dönemi obezitesi dış faktörler arasında yer alır (Wingerchuk ve ark., 2001). MS hastalığı ile ilişkili bugüne kadar 50'den fazla gen belirlenmesi ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları hastalığın ortaya çıkmasında genlerin de önemli rolü olduğu gösterilmiştir. (Vollmer ve ark., 2002). Tüm bu faktörlerin MS ataklarının

başlamasında ve atakları şiddetlendirerek hastalığı alevlendirmede rol oynadığı bilinmektedir (Cook, 2006).

2.5.1. Multipl Skleroz'un patogeneğinde yer alan hücreler

Multipl skleroz, merkezi sinir sistemini etkileyen kronik otoimmün, inflamatuvar ve nörodejeneratif bir hastalıktır. MS, bağışıklık hücrelerinin merkezi sinir sistemine sızmasıyla sonuçlanan, demiyelinizasyonu, aksonal hasarı ve nörodejenerasyonu tetikleyen bağışıklık düzensizliği ile karakterizedir. İnflamatuvar bir süreç olup bu süreçte T-hücreleri, makrofaj ve mikroglia hücreleri gibi adaptif ve innate immün sistem elemanları rol oynamaktadır (Rodríguez Murúa, 2022). T hücreleri dolaşımdan kan beyin bariyerini geçerek beyin parankimine geçer. Otoreaktif T-hücreleri MSS'e girdikten sonra, antijen sunan hücreler ve DC'ler tarafından yeniden aktive edilir. Bu sayede iltihaplanma bölgelerine B hücreleri, miyeloid hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreleri, çeşitli sitokinlerin, kemokinlerin, MMP'ler ve diğer mediyatörlerin salgılanmasını, yerleşik mikroglia ve astrositlerin aktivasyonunu sağlar. TNF-a, IL1-b gibi proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler T ve B hücrelerinin aktive eder. MS patolojisinde proinflamatuvar T yardımcı tip 1 (Th1) ve Th17 rol oynar (Hu ve ark., 2017). İnterlökin 12 (IL-12) varlığında aktive olan CD4⁺ T hücreleri, Th1 hücrelerinde farklılaşarak Tbet transkripsiyon faktörünü eksprese eder ve interferon gama (IFN- γ) üretir; TGF- β 1, IL-23 ve IL-6 veya IL-21 varlığında aktive olan CD4⁺ T hücreleri ise, ROR γ t ekspresyonu ve IL-17/GM-CSF/IFN- γ üretimi ile karakterize Th17 hücrelerine farklılaşır (Grigoriadis ve ark., 2015; Quintana ve ark., 2014).

Miyelin spesifik CD4⁺ CD25⁺ Tregler, transgenik farelerinden kronik DOE'li farelere transfer sırasında hastalığı baskılamayı başarmıştır (Stephens ve ark., 2009)

Pro-inflamatuvar Th17 hücreleri, periferde bir Treg gibi, farklılaşmaları için anti-inflamatuvar TGF- β 'ya ihtiyaç duymaktadır. Sadece TGF- β 'nın varlığı, TCR stimülasyonunu takiben Foxp3⁺ iTreg'in gelişmesine yol açmaktadır. TGF- β proinflamatuvar IL-6 ile birlikte bulunduğu ise, Foxp3⁺ hücrelerin ifadesi baskılanır ve Th17 hücreleri üretilir (Bettelli ve ark., 2006a).

MS patolojisiinde CD8⁺ T hücreleri de önemli rol oynar. MS hastalarının beyaz ve gri maddesinde çok sayıda CD8⁺ T hücresi tespit edilmiştir. CD8⁺ T hücreleri, Fas/FasL aracılı sitotoksitenin yanı sıra granzim ve perforin üretimi yoluyla MSS hasarına katkıda bulunur (Giuliani ve ark., 2003; Medana ve ark., 2000).

B hücreleri, antikora bağımlı sitotoksositeye ve kompleman hasarına katılan otoantikorları salgılayan hafıza veya plazma hücrelerine farklılaşır (Bar-Or, 2005). Antikor oligoklonal bantları MS hastalarının %90'ından fazlasında tespit edilir ve tanı kriterlerini doğrulamak veya yerine getirmek için kullanılabilir (Thompson ve ark., 2018). Son yıllardaki çalışmalar ve B hücre deplete edici MS biyolojik ajanların başarısı, B hücrelerinin antikor üretmenin ötesinde antijen sunucu kabiliyetleri sayesinde MS patogeneziinde kritik bir rol oynadığına işaret etmektedir.

γδ T hücreleri, MS'te erken doku hasarına neden olur (Ribot ve ark., 2021). BOS'da Vγ2 eksprese eden γδ T hücrelerinin bir kısmının bulunduğu bilinmektedir (Triebel ve Hercend, 1989). γδ T hücreleri, Fas ligandının aracılık ettiği oligodendrositlere karşı sitotoksik aktivitelerinin bir sonucu olarak ve ayrıca perforin ve granzim B'nin aktivasyonu yoluyla demiyelinizasyonu teşvik eder (Grigoriadis ve van Pesch, 2015; Zarobkiewicz ve ark., 2019).

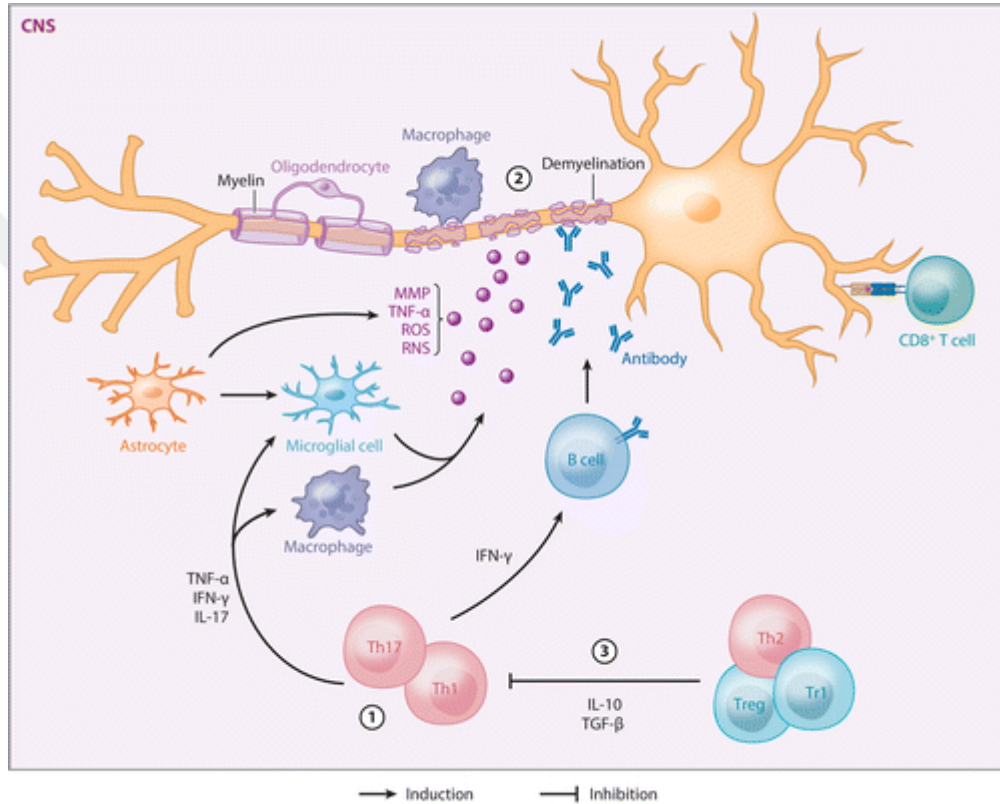
Mukoza ile ilişkili değişmez T (MAIT) hücreleri, innate-like CD8⁺ T hücrelerinin bir alt kümesidir (Toubal ve ark., 2019). MS hastalarının beyinde MAIT hücrelerinin arttığı ve bu hücrelerin IL-17 ürettiği bilinmektedir (Annibali ve ark., 2011; Held ve ark., 2015).

Aktive edilmiş mast hücreleri, kan-beyin bariyerinin açılmasına ve inflamatuvar hücrelerin MSS'ye toplanmasını sağlayan histamin ve triptazın salınmasına neden olabilir. Mast hücreleri tarafından üretilen triptaz ve kimaz, matris metaloproteinaz (MMP) öncülünü aktive eder (Baranzini ve ark., 2000). MMP aktive olan hücrelerin endotele yapışmasını sağlayarak kan beyin bariyerine göç etmesini sağlar.

Mikroglia ve makrofajlar, MSS'nin inflamasyonu ve patolojisiinde Proinflamatuvar ve immün düzenleyici olarak rol alırlar (Krausgruber ve ark., 2011; Mantovani ve ark., 2013). Bu alt gruplardan bazıları, TNF-α, reaktif oksijen türleri gibi nörotoksik ürünler üretir ve MS'te doğrudan nörotoksik etkilere sahiptir (Raivich ve Banati

2004; Yamasaki ve ark., 2014). Astrositler MSS'de en çok bulunan glial hücrelerdir. Astrositler, MSS de sitokinlerin, kemokinlerin ve yüzey moleküllerinin ekspresyonu yoluyla MSS inflamasyonunu modüle eder (Chao ve ark., 2019; Giovannoni ve Quintana 2020; Mayo ve ark., 2014; Wheeler ve ark., 2019, Wheeler ve ark., 2020).

Doğal öldürücü (NK) hücreler, çeşitli tümör türlerine ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı bağışıklık tepkisine katılan doğal bağışıklık hücreleridir (Vivier ve ark., 2008).



Rodriguez Murúa S, et al. 2022
Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 17:121-39

Şekil 2.12. Merkezi sinir sistemindeki aktive edilmiş bağışıklık hücreleri tarafından yönlendirilen MSS hasarı. (1) Patojenik Th alt grupları, TNF- α , IFN- γ ve IL-17 gibi proinflamatuvar sitokinlerini salgılayarak mikroglia ve makrofajları aktive eder. Sitokinlerin, kemokinlerin ve yüzey moleküllerinin ekspresyonu astrosit aktivitesini destekler. Bu yanıt, makrofajlar, B hücreleri ve sitotoksik T hücreleri tarafından yönlendirilen daha fazla patojenik davranışa neden olur. (2) Astrositler, makrofajlar ve mikrogliaların yanı sıra aktive edilmiş CD8⁺ tarafından salgılanan MMP'ler, TNF- α , ROS ve RNS gibi çözünür nörotoksik molekül üretimi, T hücresi sitotoksitesi, ADCC ve kompleman gibi çoklu mekanizmalar miyelin ve aksonal hasarı tetikler. (3) IL-10 ve TGF- β gibi immün düzenleyici sitokinlerin ve ek mekanizmaların salgılanması yoluyla FOXP3⁺ Tr1 Treg'ler tarafından inflamasyon çözülür. Kısaltmalar: ADCC, antikora bağımlı sitotoksite; MSS, merkezi sinir sistemi; IFN, interferon; IL, interlökin; MMP, matris metaloproteinaz; MS, multipl skleroz; RNS, reaktif nitrojen türleri; ROS, reaktif oksijen türleri; TGF, dönüştürücü büyüme faktörü; TNF, tümör nekroz faktörü; Tr1, tip 1 düzenleyici T hücresi; Treg, düzenleyici T hücresi (Rodríguez Murúa, 2022).

2.5.2. Multipl skleroz tedavisi

Multipl Skleroz hastalığının kesin bir tedavisi yoktur. Atakların sıklık ve şiddetini azaltmaya, yok etmeye ve atak sonrası oluşabilecek komplikasyonları minimize etmeye yönelik tedaviler bulunmakta fakat bu tedaviler hastalığın ilerlemesini engellememektedir. MS tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından onaylanan 20 adet ilaç bulunmaktadır. Mevcut hastalık modifiye edici İmmünmodülatör ve immünsupresif tedaviler arasında İnterferon- β (IFN- β -1b ve IFN- β -1a; Avonex, Rebif, Betaseron), Glatiramer asetat (Copaxone), Mitoxantrone (Novantrone), Natalizumab (Tysabri), Rituximab, Fingolimod (FTY720) bulunmaktadır (Hauser ve Cree ,2020; Martin ve ark., 2016).

Halihazırda MS'in atak tedavisi için intravenöz (iv) olarak yüksek doz steroid, plazmaferez ve immunglobulin kullanılmaktadır. Steroidler T hücre ve IFN- γ miktarını azaltarak kan beyin bariyerini düzenler ve inflamasyonu durdurur (Hauser ve Cree, 2020; İliçin ve ark., 2012).

MS hastalığı özellikle genç bireylerde fiziksel ve psikolojik hasarlar meydana getirerek kişinin hayatını olumsuz yönde etkilemenin ve yaşam kalitesini ciddi anlamda düşürmenin yanı sıra ayrıca sağlık sisteminde de ciddi ekonomik maliyetlere neden olmaktadır. Bu anlamda halen MS tedavisinde hastalığın gelişimini önlemek veya koruyucu niteliğe sahip olan farklı yenilikçi ilaç adaylarına ihtiyaç bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Demirbaşlar

- +4 °C soğutucu (Siemens)
- -20 °C Soğutucu (Siemens)
- -80 °C Soğutucu (Siemens)
- Buz makinesi (Scotman AF 103)
- CO2'li İnkübatör (SANYO)
- Distile su cihazı
- Elisa Okuyucu (Promega)
- Flow sitometri cihazı (BD FACS Aria III)
- İnvert Mikroskop (Leica)
- Laminer flow (Telstar Clean Air)
- Magnetik karıştırıcı (Heidolph)
- Otoklav (ALP CL-40M)
- Otomatik pipet (1000, 200, 10ul)
- Pipet Tabancası (Isolab)
- Soğutmalı Santrifüj (Nüve Es 120)
- Su banyosu (Thermal)
- Vorteksler (Heidolph)
- Real-Time PZR Cihazı (Roche LightCycler 480)
- Termal Cycler (Bio-Rad)

3.1.2. Sarf Malzemeler

- 10, 200, 1000ul pipet ucu (izolab)
- 96 kuyucuk flat bottom plate (sigma)
- 96 kuyucuk round bottom plate (sigma)
- BD falcon Cell Strainer (BD-100um)
- Ependorf tüp (Axygen)
- Falkon tüp (15 ve 50 ml) (Sarstedt)
- Serolojik pipet (5ml, 10ml)
- Cryogenic Vial (Kriyojenik Şişe)

3.1.3. Kimyasal Malzemeler

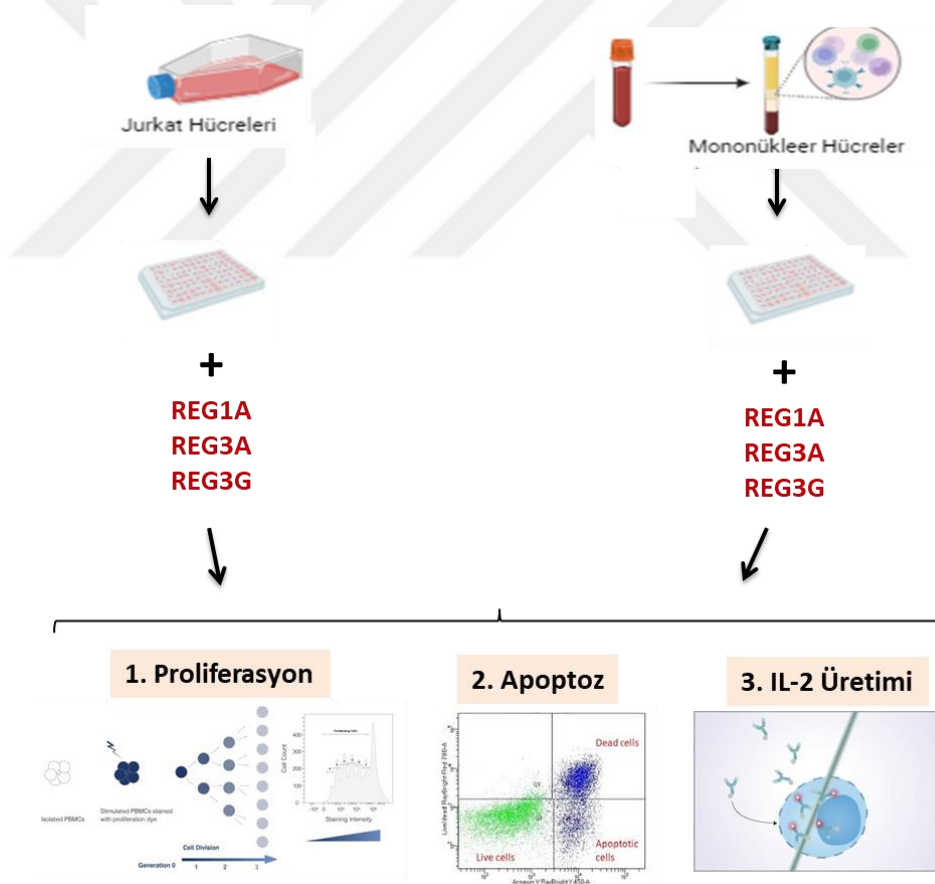
- %37'lik formaldehit solüsyonu (Merk)
- Distile su
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (SIGMA/D5796)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma)
- Fetal bovine serum (gibco/A3840001)
- Ficoll PAQUE (GE Healthcare) (GE17-1440-02)
- Golgi stop (Biolegend)
- Iscove Modified Dulbecco Media IMDM (Gibco)
- Ionomycin (Sigma)(10634))
- iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad)
- iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (ThermoFisher) (# 14190250)
- Penicillin-Streptomycin (BI/03-031-1B)
- Phorbol myristate acetate (PMA) (Biotium) (P8139-1MG)
- RNeasy Mini Kit (Qiagene)
- RPMI (Gibco) RPMI 1640 (hyclone/SH30027.02)
- Recombinant Human REG1A Proteini (novaprotein # C530)
- Recombinant Human REG3A Proteini (PROSPEC pro-421)
- Recombinant Human REG3G Proteini (novaprotein # CC77)

- Human REG1A Gene Lentiviral ORF cDNA expression plasmid (HG11234-ACGLN)
- pLV-C GFPSpark Lentivirus Control Plasmid (HG11234-ACGLN)
- Tag-it-violet (Biolegend #425101)
- BV421 anti-human CD25 Antibody (Biolegend #356113)
- PE anti-human CD69 Antibody (Biolegend #310905)
- APC anti-human IL-17A Antibody (Biolegend # 512333)
- PerCP/Cyanine5.5 anti-human IL-2 Antibody (Biolegend # 500321)
- APC/Cyanine7 anti-human CD127 Antibody (Biolegend # 351347)
- APC anti-human CD279 (PD-1) Antibody (Biolegend # 379207)
- PE anti-human/mouse/rat FOXP3 Antibody (Biolegend # 320007)
- PE/Cyanine7 anti-human CD152 (CTLA-4) Antibody (Biolegend #349914)
- PerCP Cy5.5 anti-human KLRG1 (MAFA) Antibody (Biolegend # 368611)
- FITC anti-human CD11c Antibody (Biolegend # 371515)
- Passific Blue anti-human CD86 Antibody (Biolegend # 305417)
- PE anti-human CD252 (OX40L) Antibody (Biolegend # 326307)
- APC anti-human CD278 (ICOS) Antibody (Biolegend # 313509)
- BV510 anti-mouse CD4 Antibody (Biolegend # 100449)
- APC/Cyanin7 anti-mouse CD8 Antibody (Biolegend # 100713)
- APC anti-mouse IL-17 Antibody (Biolegend # 506915)
- PE anti-mouse IL-22 Antibody (Biolegend # 516404)
- PercpCy5.5 anti-mouse IL-2 Antibody (Biolegend # 503821)
- PE/Cyanin7 anti-mouse IL-10 Antibody (Biolegend # 505025)
- PE anti-mouse CD4 Antibody (Biolegend # 100407)
- APC/Cyanin7 anti-mouse CD8 Antibody (Biolegend # 100713)
- PercpCy5.5 anti-mouse GMC-SF Antibody (Biolegend # 505409)
- PE/Cyanin7 anti-mouse IFNg Antibody (Biolegend # 505825)
- PE Dazzle 594 anti-mouse TNFa Antibody (Biolegend # 506345)
- BV421 anti-mouse CD278 (ICOS) Antibody (Biolegend # 313524)
- APC anti-mouse KLRG1 (MAFA) Antibody (Biolegend # 138411)
- PercpCy5.5 anti-mouse CD279 (PD-1) Antibody (Biolegend # 135207)

- PE anti-mouse CD11c Antibody (Biolegend # 117307)
- APC anti-mouse CD11b Antibody (Biolegend # 101211)

3.2. Yöntem

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Biz önceki çalışmamızda Reg3g'nin fare MS modelinde DOE hastalık skoru şiddetini arttırdığını ve Th17 ile ilişkili sitokinlerin artmış olduğu göstermiştik. Reg3g over ekspresyonunun DOE'yi kötüleştirdiğini, hücre proliferasyonunu arttırdığını ve bunun doğrudan/dolaylı T hücre aktivasyonunu regüle ettiği rapor etmiştik (Eken ve ark., 2021). Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ışığında Reg3' nin immün sistemi etkileyerek DOE'yi kötüleştirdiğini öngörmekteyiz.



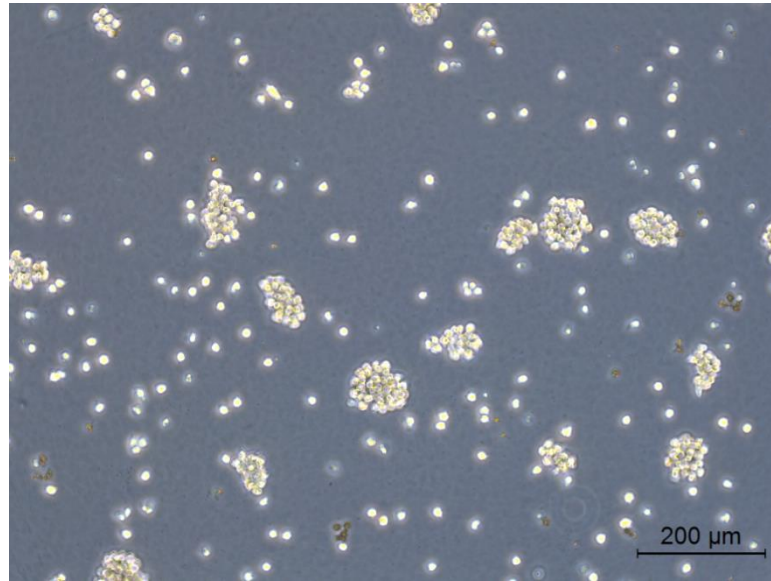
Şekil 3.1. Deney akış şeması-1. Çoğaltılan Jurkat hücreleri ve izole edilen PBMC'ler eşit hücreler olacak şekilde ayrı ayrı pleytlere dağıtıldı. Reg proteinlerinin dozları eklendi ve kültürlendi. Ardından proliferasyon, apoptoz ve IL-2 üretimleri değerlendirildi.

Bu verilerden yola çıkarak rekombinant insan REG proteinlerinin immün sistem üzerindeki etkisini insan T hücre hattı olan Jurkat hücrelerinde ve PBMC'lerde göstermeyi ve proteinlerin T hücre proliferasyonu IL-2 sitokin üretimi, T hücre reseptör sinyal iletimi ve canlılığına etkilerini incelenmeyi amaçladık (Şekil 3.1).

3.2.1. Jurkat Hücre Hattının Çoğaltılması ve Dondurulması

Bu tezin oluşturulmasında çalışmamızın *ex vivo* deneylerini gerçekleştirmekte kullandığımız Jurkat hücre hattı Acıbadem Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Tolga SÜTLÜ'den temin edildi. Jurkat E6-1 klonu T hücre immünolojisi için en çok kullanılan standart lösemik hücre hatlarından birisidir (Abraham ve Weiss, 2004).

Bu süspanse hücreler tam RPMI (%10 FBS, penicillin-streptomycin, L-glutamine) içerisinde %5 CO₂' li ortamda 37 °C'de inkübe edildi (Şekil 3.1). Hücreler iki güne bir 5 dk 400 g de santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve dipte kalan hücrelere taze tam RPMI eklenerek ortam değiştirildi. Canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesinde ve sayılmasında kullanılan Tripkan Blue boyası ile hücre sayımı yapıldı ve bir flaskta 3x10⁶ hücre oluncaya kadar tekrar edildi. Hücre stoğu bu şekilde çoğaltılarak deneyin yapılacağı güne kadar saklamak amacıyla 1500µl tam RPMI ortam ve %10 DMSO içinde süspande edildi ve cryovial tüplere konularak -80°C saklandı.



Şekil 3.2. Jurkat hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (X40)

3.2.2. Dondurulmuş Jurkat Hücresinin Çözdürülmesi

Cryovial tüpdeki hücreler kullanılacağı zaman 37°C'deki su banyosunda 1-2 dk çözünmesi sağlandı. Ardında hücrelerin üzerine 37 °C'ye ısıtılmış 3-5 ml tam RPMI ortam eklenerek 400g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler deneyde kullanıldı.

3.2.3. Periferik Kandan Lenfosit Elde Edilmesi

Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu (PBMC-peripheral blood mononuclear cell) Ficoll-Hypaque kullanarak yoğunluk gradiyenti ile elde edildi. Periferik kandan lenfosit izolasyonu için steril EDTA'lı hemogram tüplerine 10 mL kan alındı, Kan PBS ile 1:1 oranında dilue edildi ve 3 ml Ficoll üzerine yavaş yavaş gradiyent oluşturacak şekilde eklendi. Kan 400 g de frensiz olarak 30 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi ve orta kısımda oluşan beyaz bulut yani PBMC'ler toplandı. PBMC'lere PBS eklendi ve hücreler thoma lamında trypan Blue kullanılarak sayıldı. Ardından hücreler 400 g de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılarak dipte kalan hücreler deneyde kullanıldı.

3.2.4. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nin *Staphylococcus aureus* Üzerine Etkisi ve Reg Dozlarının Belirlenmesi

Ticari olarak temin edilen Reg proteinlerinin etkinliğini belirlemek amacıyla REG1A (10ug/ml), REG3A (10ug/ml) ve REG3G (50ug/ml)' nın farklı konsantrasyonlarından ve *Staphylococcus aureus* bakterisinden alınarak LB agarlı pleyte ekim yapıldı. 37 °C de bir gece inkübe edildikten sonra pleytlerde çoğalan bakteri kolonileri sayıldı.

REG1A, REG3A ve REG3G' nın (0,5 ng, 1 ng, 10 ng, 50 ng ve 0 pg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1000 pg) konsantrasyonları ve bakterinin farklı dilüsyonları denenerek optimizasyon çalışması yapıldı ve dozlar belirlendi. En iyi sayılabilir koloni oluşturan bakteri dilüsyonu seçildi (Guo et al., 2019).

3.2.5. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nın Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Apoptoz boyaması için Jurkat hücreleri ve PBMC'ler, 24 saat boyunca U tabanlı 96 kuyucuklu pleytte çözünür anti-CD3/ anti-CD28 (1µg/ml) ve Reg dozlarının farklı konsantrasyonları ile uyarıldı. Daha sonra, hücreler 7-AAD ile BioLegend'in FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kiti ile 15 dk boyandı ve hemen sonra hücrelerin apoptoz yüzdeleri flow sitometri cihazında ölçüldü.

3.2.6. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nın Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Proliferasyon Üzerine Etkisinin İncelenmesi

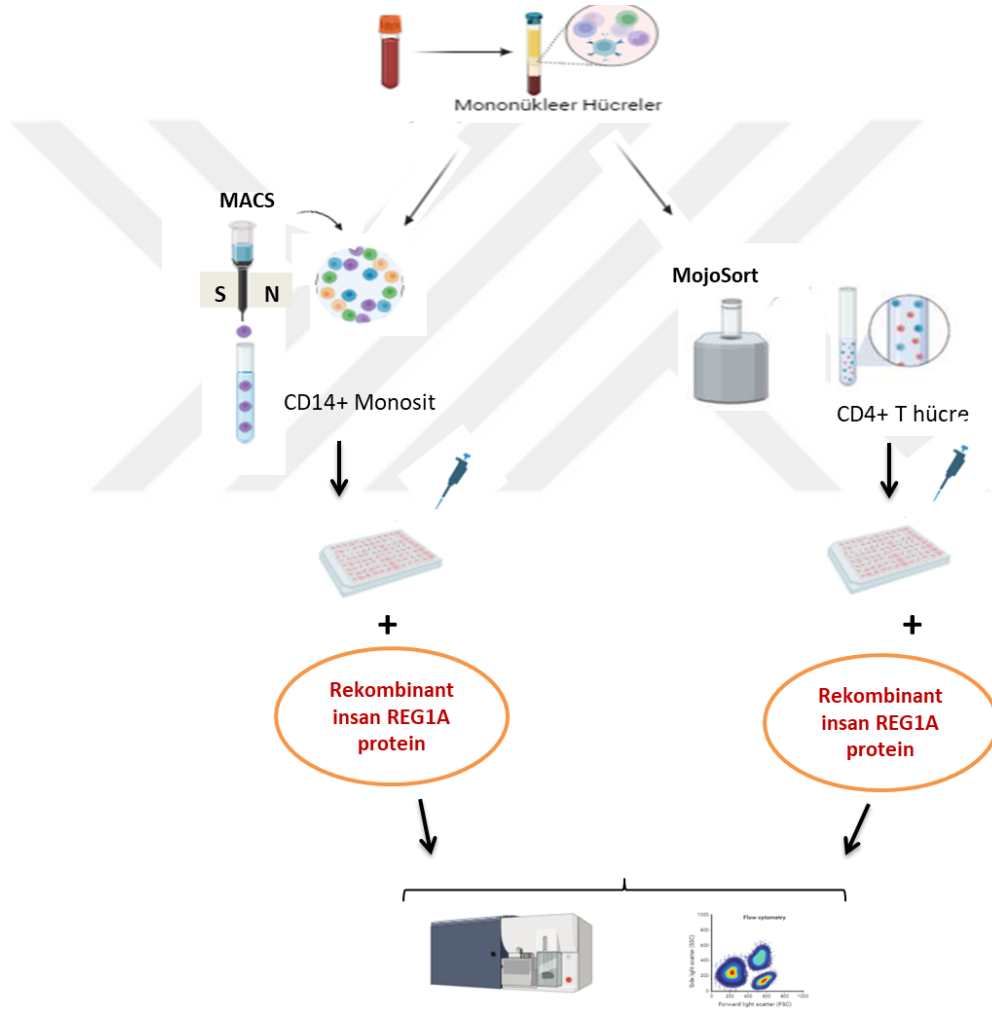
Jurkat hücreleri ve PBMC'ler, üreticinin talimatlarına göre Tag-it-violet (Biolegend #425101) boyası ile etiketlemenin ardından belirlenen REG1A'nın farklı dozları ile 4 gün süreyle anti-CD3/anti-CD28 kaplı (1 µg/ml) 96 kuyucuklu pleytte uyarıldı, 4 gün sonra flow sitometri cihazında hücrelerin proliferasyon yüzdeleri ölçüldü.

3.2.7. Rekombinant İnsan REG1A, REG3A ve REG3G'nın Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde IL-2 Sitokini Üretimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Bu deneylerdeki amaç Reg proteininin farklı konsantrasyonlarına maruz kalan T hücrelerinde uyarıma bağlı IL-2 üretimini nasıl etkilediğini test etmektir. Reg dozlarının farklı konsantrasyonlarında 6 saat 37°C de kültür edilen Jurkat hücreleri ve PBMC' ler anti-CD3/28 veya PMA (50 ng/ml), ionomycin (1 µg/ml) ile golgi stop varlığında (1µl/ml) karışımı ile) 4 saat uyarıldı. Daha sonra kültür edilen hücelere hücre içi sitokin boyama (ICC) protokolü uygulandı. Bu protokole göre BD Cytofix/Cytoperm™ (BD, ABD) kitinden 100 µl/well Fixation solüsyonu eklendi. 15 dakika +4°C'de inkübe edildi. 400 g'de +4°C'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 150 µl permabization solüsyonu eklenerek 2 kez yıkama yapıldı. 20 µl permabization solüsyonu + 1'er µl Percp/Cy5.5 IL-2 sitokininin florofor konjuge antikoru eklenerek 30 dakika +4°C'de inkübe edildi. 200 µl hücre boyama solüsyonu (cell staining solüsyon, %2 FBS içeren PBS) eklendi ve 400 g'de +4°C'de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl hücre boyama solüsyonunda çözüldü. Flow sitometri cihazında IL-2 sitokinin üretimi ölçüldü.

3.2.8. PBMC'lerden CD4⁺ T Hücrelerinin İzolasyonu

İzole edilen PBMC'lerden (1×10^7) üretici tarafından tarif edildiği gibi CD4⁺ MicroBeads (#130-050-201) kullanılarak MojoSort manyetik hücre ayırma yöntemiyle CD4⁺ T hücrelerinin seçilimi yapıldı. Hedef hücrelerinin izolasyonu için - Negative Selection kiti kullanıldı (Cat. No. 480015/480016). Manyetik olarak etiketlenen fraksiyon, bir manyetik ayırıcı kullanılarak korunur. Dokunulmamış hücreler toplanır. Bunlar ilgilenilen hücrelerdir.



Şekil 3.3. Deney akış şeması-2. Mononükleer hücrelerden mikrobead ile CD4 T hücrelerin ve CD14 Monositlerin seçilimi yapıldı. Bir pleyte T hücreleri eşit hücre olacak şekilde dağıtıldı ardından Th supsetlerine farklılaşma sitokinleri ve REG1A proteinin dozları eklendi. Diğer pleyte monositler eşit şekilde dağıtıldı ve DC'lere farklılaşma sitokinleri ile REG1A proteinin dozları eklendi ve bir süre kültür edildi. Süre sonunda flow sitometride okutuldu ve analiz edildi. Grafikler değerlendirildi.

Kısaca protokol aşağıda sunulmuştur:

Hücrelere öncelikli olarak yıkama amacıyla buz üzerinde tutulan MACS Buffer eklendi ve 400 g de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücrelere 10 µl biotin eklendi ve karanlıkta +4 °C'de 15 dk bekletildi. Sürenin sonunda hücrelerin üzerine 10 µl bead eklendi ve tekrar karanlıkta +4 °C'de 15 dk bekletildi. Ardından 3 ml MACS Buffer eklenip ve temiz tüpe alındı. Tüp manyetik ayırıcıya yerleştirilerek 5 dk bekletildi. Mıknatıstan çıkarmadan yeni bir ikinci tüpe ters çevrildi süpernatant toplandı. Mıknatıstaki tüpe tekrar 3 ml MACS Buffer eklenir ve 5 dk daha bekletilerek ikinci tüpe alındı. Yeni tüpteki 6 ml MACS Buffer da bulunan hücreler Tripan Blue boyası kullanılarak sayım yapıp kullanıldı.

3.2.9. Rekombinant İnsan REG1A'nın Primer Hücrelerde CD25, CD69, CD127 gibi Aktivasyon Markirları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

PBMC'lerden izole ettiğimiz CD4⁺ T hücreleri anti-CD3/28 ve REG1A'nın farklı dozları ile 3 gün kültür edildi. Ardından yüzey boyaması için hücreler yüzey antijenine özgü florokrom-konjuge antikoru (Tablo 3.1) ile 20 µL boyama solüsyonu eklenerek karanlıkta buz üzerinde 30 dakika boyunca boyandı. Daha sonra hücreler, 3 dakika boyunca 400g'de döndürülerek iki kez 200 µL boyama solüsyonu ile yıkandı ve flow sitometri cihazında analiz yapıldı.

Tablo 3.1. Aktivasyon Marker Boya Karışımı

BV421	CD25	1 µl
PE	CD69	1 µl
APC/Cy7	CD127	1 µl

3.2.10. Rekombinant İnsan REG1A'nın Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Farklılaşma anti-CD3ε ve anti-CD28 ile kaplanmış pleytlerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, CD4⁺ T hücrelerinin kültüre edileceği U tabanlı 96 kuyucuklu pleyt, 100 µL anti-CD3ε antikoru (PBS'de 1 µg/mL) ve anti-CD28 antikoru (PBS'de 1 µg/mL) eklendi, 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi ve anti-CD3ε ve anti-CD28 ile

kaplandı. Fazla antikor 200 µL PBS ile 2 defa yıkandı. Hemositometre altında sayılan T hücreleri 100.000 hücre/well olacak şekilde pleyt içine 100 µl volüm içinde olacak şekilde dağıtıldı. Ardından REG1A proteininin 1 pg, 10 pg, 100 pg ve 1000 pg dozları eklendi. Son olarak farklılaşma sitokinleri olan anti-IFN-γ (5 ug/ml), IL-2 (1ng /mL) ve IL-4 (50 ng/ml)'ü içeren tam RPMI medyum ile 200 ul/well olarak 37°C'de CO₂ inkübatöründe 5 gün polarize edildi. 37°C'de 5 gün kültür edildikten sonra hücrelere, imza sitokin olan IL-4'ün hücre içi sitokin boyaması yapıldı ve ürettikleri sitokin miktarları flow sitometri ile analiz edildi. Bu amaçla 4 saat öncesinde PMA/Ionomycin/Golgi Stop ile uyarım yapıldı.

3.2.10.1. Hücre içi boyama ile sitokin üretim kapasitesinin belirlenmesi

Sitokin miktarı intraselüler boyama ile tayin edildi. Bunun için farklılaşan hücreler PMA (50ng/mL), ionomycin (1µg/mL) ve golgi stop (1µL/mL) ile 37 °C'de 3-5 saat inkübatörde uyarıldı. Ardından pleytteki hücreler santrifüj (400g, 3 dk) ile çöktürülüp süpernatant atıldı ve Fixation/Permeabilizasyon Kiti (BD Cat No: 554714) ile fiksasyon işlemi yapıldı. Fiksasyon için her kuyucuğa 100µl fiksatif eklenip, 15 dakika +4 °C derecede karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sürecinden sonra, fikse edilen hücreler santrifüj (400g, 3 dk) edildi ve fiksatif uzaklaştırdı. Pellet üzerine 150µl 1xPerm Buffer ilave edildi ve santrifüj ile yeniden süpernatant uzaklaştırıldı. Bu şekilde permabilize işlemi 2 kez tekrar edilerek yıkama işlemi yapıldı. Sonrasında her kuyucuğa 25µl permeabilizasyon buffer ve APC anti-human IL-4 antikor karışımı eklendi ve 30 dk +4°C'de hücrelerin boyanması sağlandı. Hücreler 200µl boyama solüsyonunda çözündürülerek FACS Aria III ile okutuldu.

3.2.11. Rekombinant İnsan REG1A'nın Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Farklılaşma anti-CD3 ve anti-CD28 ile kaplanmış pleytlerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, CD4⁺ T hücrelerinin kültüre edileceği U tabanlı 96 kuyucuklu pleyt, 100 µL anti-CD3ε antikor (PBS'de 1 µg/mL) ve anti-CD28 antikor (PBS'de 1 µg/mL) eklendi, 2 saat boyunca 37 ° C'de ve anti-CD3ε ve anti-CD28 ile kaplandı. Fazla antikor 200 µL PBS ile 2 defa yıkandı. Hemositometre altında sayılan T hücreleri 1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde pleyt içine 100 µl volüm içinde dağıtıldı. Ardından

REG1A proteinin 1 pg, 10 pg, 100 pg ve 1000 pg dozları eklendi. Son olarak farklılaşma sitokinleri olan IL-6 (25 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), Tgf- β (5 ng/ml) ve IL-23 (50 ng/ml)'ü içeren tam RPMI medyum ile 200 μ l/well olarak 37°C'de CO₂ inkübatöründe 5 gün polarize edildi. 5. gün hücreler 400 g de 3 dk çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı ve yeni welllere aktarıldı. Bu medyumun yerine hücreler 200 μ l/well olacak şekilde IL-23 (50 ng/ml) ve IL-2 (50 ng/ml) içeren yeni RPMI medium eklenerek 7 gün daha kültür edildi. Farklılaşma sürecinde ilk gün ve medyumunun değiştirildiği 5. gün kültüre farklı dozlarda (1 pg, 10 pg, 100 pg ve 1000 pg) REG1A proteini eklendi. Sitokin boyama için, 12. günde hücrelere 3.2.10.1. nolu bölümde yazılan hücre içi boyama protokolü uyguladı. İmza sitokini olan IL-17'nin antikorunu APC anti-human IL-17A ile boyanmanın ardından flow sitometri cihazında analiz yapıldı.

3.2.12. Rekombinant İnsan REG1A'nın Treg Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Farklılaşma anti-CD3 ϵ ile kaplanmış pleytlerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 96 kuyucuklu U tabanlı pleyt, 100 μ L anti-CD3 ϵ antikorunu (PBS'de 2 μ g/mL) antikorunu eklenerek 2 saat boyunca 37 °C'de anti-CD3 ϵ kaplanmıştır. Fazla antikor 200 μ L PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Hemositometre altında sayılan T hücreleri 1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde pleyt içine 100 μ l volüm içinde olacak şekilde dağıtıldı. Ardından REG1A proteinin 1 pg, 10 pg, 100 pg ve 1000 pg dozları eklendi. Son olarak farklılaşma sitokinleri olan anti-CD28 (1 μ g/ml), IL-2 (50 ng/ml) ve Tgf- β (5 ng/ml) içeren complete RPMI medyum ile 200 μ l/well olarak 37°C'de CO₂ inkübatöründe 3 gün kültür edildi. 3. gün hücreler 400 g de 3 dk çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine yeni medium son konsantrasyonlarda (50 ng/ml IL-2) 200 μ l/well olacak şekilde eklenerek 2 gün daha kültür edildi. 5. günde hücrelerde hem yüzey boyaması yapılarak kontrol noktası molekülleri olan PD-1, CTLA-4 ve KLRG1 ifadesi hemde True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set ile muamele edilerek transkripsiyon faktörü olan FOXP3'nin ifadesi flow sitometrisi ile belirlendi.

Tablo 3.2. Treg Hücreleri ve Kontrol Noktası İnhibitörlerinin Boya Karışımı

APC	PD-1	1 µl
PE/Cy7	CTLA-4	1 µl
Per CP/Cy5.5	KLRG1	1 µl
PE	FOXP3	1 µl

3.2.12.1. PD-1, CTLA-4 ve KLRG1 gibi kontrol noktası moleküllerinin yüzey boyaması ile kantifiye edilmesi

5 gün boyuca *in vitro* farklılaştırılan hücreler 400g'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler boyama solüsyonu (% 2 FBS' li PBS) içerisinde çözüldü, 1µl Fc-block eklenerek 5 dk bloklama yapıldı ardından PD-1, CTLA-4 ve KLRG1 antikoru (Tablo 3.2) ile 30 dk +4 °C'de karanlıkta boyandı. Hücreler boyama solüsyonu ile 2 kez yıkandı ve 400g'de 3dk santrifüj edilip süpernatant atıldı ve ardından transkripsiyon faktör boyamasına geçildi.

3.2.12.2. True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set ile transkripsiyon faktör boyama yaparak FOXP3 ifadesinin belirlenmesi

Hücre yüzeyi boyamasının ardından son yıkamadan sonra süpernatant atıldı. 4X Fix Concentrate'e Fix Diluent ekleyerek 1x Fix Concentrate elde edildi ve her kuyucuğa 100 µl eklendi. Hücrelerin tamamen yeniden süspanse edildiğinden emin olmak için yavaşça pipetlendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk inkübe edildi. Her kuyucuğa 150µl 1X Perm Buffer ilave edildi. Pleyt 400 g'de oda sıcaklığında 3 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Bu işlem 2 kere tekrar edildi. Transkripsiyon faktörünün boyanması için True-Nuclear™ 1X Perm Buffer içine florokrom konjuge antikoru (Tablo 3.2) eklendi ve her kuyucuğa dağıtıldı, karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Her kuyucuğa 200µL boyama solüsyonueklendi ve çözündürülerek FACS Aria III ile okutuldu.

3.2.13. Rekombinant İnsan REG1A'nın Antijen Sunucu Hücreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi

CD14⁺ monositler, PBMC'lerden CD14⁺ MicroBeads kullanılarak saflaştırıldı. Hemositometre altında sayılan T hücreleri 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde pleyt içine 100 µl volüm içinde olacak şekilde dağıtıldı. Hücrelerin üzerine REG1A, proteinin 1 pg, 10 pg, 100 pg ve 1000 pg dozları eklendi. Ardından farklılaşma sitokinleri olan GM-CSF (100 ng /mL) ve IL-4 (100 ng/mL) içeren tam RPMI 1640 ortamında 4 gün boyunca dendritik hücrelere farklılaştırıldı. 4. günde, hücreler, ticari alınan curdlan) (50 µg/mL) ve LPS (1ug/ml) ile 1 gün aktive edildi. 5. gün immature ve mature DC'lere CD11c, MHC II, CD86, OX40L, ICOS için 3.2.12.1. nolu bölümde yazılan yüzey boyama protokolü uyguladı. Flow sitometri ile bu moleküllerin ifadesi kantifiye edildi.

Tablo 3.3. Dendritik Hücre Boya Karışımı

FITC	CD11c	1 µl
PECy7	MHC II	1 µl
Passific Blue	CD86	1 µl
PE	OX40L	1 µl
APC	ICOS	1 µl

3.2.14. Jurkat Hücrelerinde ve Primer Hücrelerde EXTL3 Reseptörünün Susturulması ve Doğrulanması

EXTL3 reseptörünün knockdownu için gerekli siRNA Thermo'dan temin edildi. siRNA'lar siRNA'lar Neon® Transfection System (Invitrogen, ABD) kiti kullanılarak Jurkat hücrelerine aktarıldı. Bunun için hücreler 400 g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler bir kere PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) ile yıkandı ve 400 g'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Hücreler R bufferda (hücre hattı için) 1×10^7 /ml olacak şekilde çözüldü ve çözülen hücrelerden 100 µl alınıp 200 ng siRNA ile transfekte edildi. Pulse Number range 3, Pulse Width range 10, Voltage range 1350 ayarında transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Trasfeksiyondan sonra hücreler 6 kuyucuk pleytde 2 ml antibiyotik içermeyen RPMI medyuma ekildi. Hücreler 2 saat kültür edildikten sonra medyuma antibiyotik

eklendi. Transfekte edilen hücrelerin EXTL3 reseptörünün ifadesini azaltıp azaltmadığı 48 saat sonra qPCR ile doğrulandı. Jurkat hücrelerinde EXTL3 reseptörünün susturulması ve doğrulanması işleminin ardından transfekte edilen T hücreleri alınarak proliferasyon ve IL-2 sitokin üretimi deneyleri tekrarlandı.

Primer T hücreleri PBMC'lerden CD4⁺ T Microbeads kullanılarak seçildi. EXTL3 reseptörünün knockdownu için siRNA'lar Neon® Transfection System (Invitrogen, ABD) kiti kullanılarak T hücrelerine aktarıldı. Bunun için hücreler 400 g'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler bir kere PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen) ile yıkandı ve 400 g'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Hücreler T bufferda (primer hücreler için) 1x10⁷ml olacak şekilde çözüldü ve çözülen hücrelerden 100 µl alınıp 200 ng siRNA ile transfekte edildi. Pulse Number range 1, Pulse Width range 20, Voltage range 2100 ayarında transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyondan sonra hücreler 6 kuyucuk pleytde 2 ml antibiyotik içermeyen IMDM medyuma ekildi. Hücreler 2 saat kültür edildikten sonra medyuma antibiyotik eklendi. Transfekte edilen hücrelerin EXTL3 reseptörünün ifadesini azaltıp azaltmadığı 48 saat sonra qPCR ile doğrulandı.

3.2.14.1. Real Time qPCR

Transfekte edilen hücrelerde EXTL3 reseptörünün ifadesini azaltıp azaltmayacağı qPCR ile doğrulandı. Transfekte edilen hücrelerden Qiagen RNeasy kiti (üreticinin talimatları izlenerek) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lardan BioRad iScript cDNA sentez kiti (#170-8891) (üreticinin talimatları izlenerek) cDNA sentezi yapıldı. EXTL3 geninin ifadesi Real-Time PCR ile ölçüldü. Ribozomal 18S geni ile normalize edilerek 2-ΔΔCT yöntemi ile relatif gen ifadesi belirlendi.

Tablo 3.4. RT-q PCR Reaksiyon Koşulları

100µM Forward Primer	0.12µl
100µM Reverse Primer	0.12µl
SYBR Green mix (Bio-Rad, ABD),	10µl
Template cDNA	2µl
RNase-free su	7.76µl

Tablo 3.5. qPCR Programı

Sıcaklık (°C)	Zaman	
50°C	2 dk,	
95°C	10 dk,	
95 °C	15 sn	40 siklus
72°C	30 sn	

3.2.15. İnsan REG1A ve Kontrol Plasmidinin Çoğaltılması

Bu tezin yapılmasında Doç. Dr. Ahmet EKEN'e verilen TÜBA GEBİP bursunun fonundan kısmen yararlanılmıştır. Buradaki in vivo dataların üretilmesinde 2021/178 ve 21/40 nolu etik kurullar kullanılmıştır.

İnsan REG1A Lentiviral plasmid ve Kontrol plasmidi ile EB10 E.coli hattına heat-shock yöntemi ile transforme edildi. Ardından bakteriler, ampicillinli katı besiyerine yayıldı. Bir gece sonra birkaç koloni seçildi ve 5 ml LB medyumunda içinde çoğaltıldı. Çoğalan kolonilerden 100ul alınarak maxi prep için tekrar 200 ml'lik LB içerisinde inoküle edildi ve maxiprep ile saflaştırıldıktan sonra yüksek miktarda REG1A ve Empty (boş) plasmid elde edildi. Konsantrasyonları nanodrop ile ölçüldü ve plasmidler enjeksiyonlarda kullanıldı.

3.2.16. Deney Grupları ve Sayıları

C57BL/6 erkek fareler Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki hayvan tesisinde, plastik propilen kafeslerde ve steril bir durumda oda sıcaklığında, patojen içermeyen koşullar altında tutuldu. Araştırmada kullanılan C57BL/6 erkek fareler 6-8 haftalık ve 20-25 g ağırlığındaydılar. Tüm bu işlemler için HADYEK(Kurumsal Hayvan Etik Kurulu, Erciyes Üniversitesi) tarafından onay alındı. Farelerimiz aşağıdaki tablodaki gibi gruplara ayrıldı ve belirtilen uygulamalar yapıldı.

Tablo 3.6. Deney Grupları ve Hayvan Sayıları

Deney Grubu	Hayvan sayısı	Uygulama
Naif REG1A Plasmid	5	-1.gün REG1A plasmidi hidrodinamik enjeksiyon ile verildi ve başka işlem yapılmadı
Naif Empty Plasmid	4	-1.gün boş plasmid hidrodinamik enjeksiyon ile verildi ve başka işlem yapılmadı
EAE REG1A Plasmid Reg1 plasmidi verilen + MOG35-55 peptidi immünizasyonu	8	-1.gün REG1A plasmidi hidrodinamik enjeksiyon ile verildi ve 0.gün MOG verildi. 0.gün ve 2.gün PT verildi. 20.gün Rekombinant İnsan REG1A (25ng/ml) verildi
EAE Empty Plasmid Kontrol plasmidi verilen+ MOG35-55 peptidi immünizasyonu	7	-1.gün boş plasmid hidrodinamik enjeksiyon ile verildi ve 0.gün MOG verildi. 0.gün ve 2.gün PT verildi. 20.gün Rekombinant İnsan REG1A (25ng/ml) verildi

3.2.17. Hidrodinamik Enjeksiyonla REG1A *In Vivo* Overekspresyonu

Boş plasmid ve REG1A plasmid DNA'ları hidrodinamik enjeksiyon ile fare gruplarına 15 µg/mL olarak 2 mL volümde kuyruk veninden 10 sn içerisinde PBSiçerisinde verildi (Eken ve ark., 2014; Eken ve ark., 2021). Bu yöntemle sistemik dağılan plasmid uygulanan kuvvetle özellikle karaciğer ve dalak hücrelerine ve endoteline girmekte ve başta karaciğer olmak üzere birçok organda eksprese edilmektedir. Farelerin karaciğer, dalak ve beyinlerinden RT-qPCR ile gen overekspresyonu bir grup ekstra farede konfirme edildi ve sonrasında EAE deneylerine geçildi.

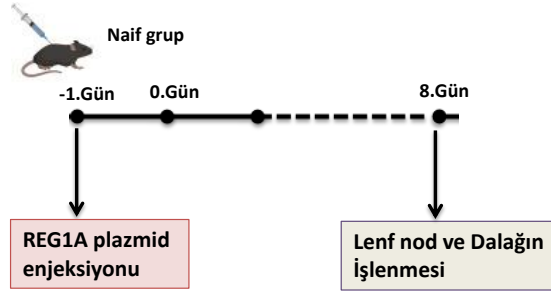
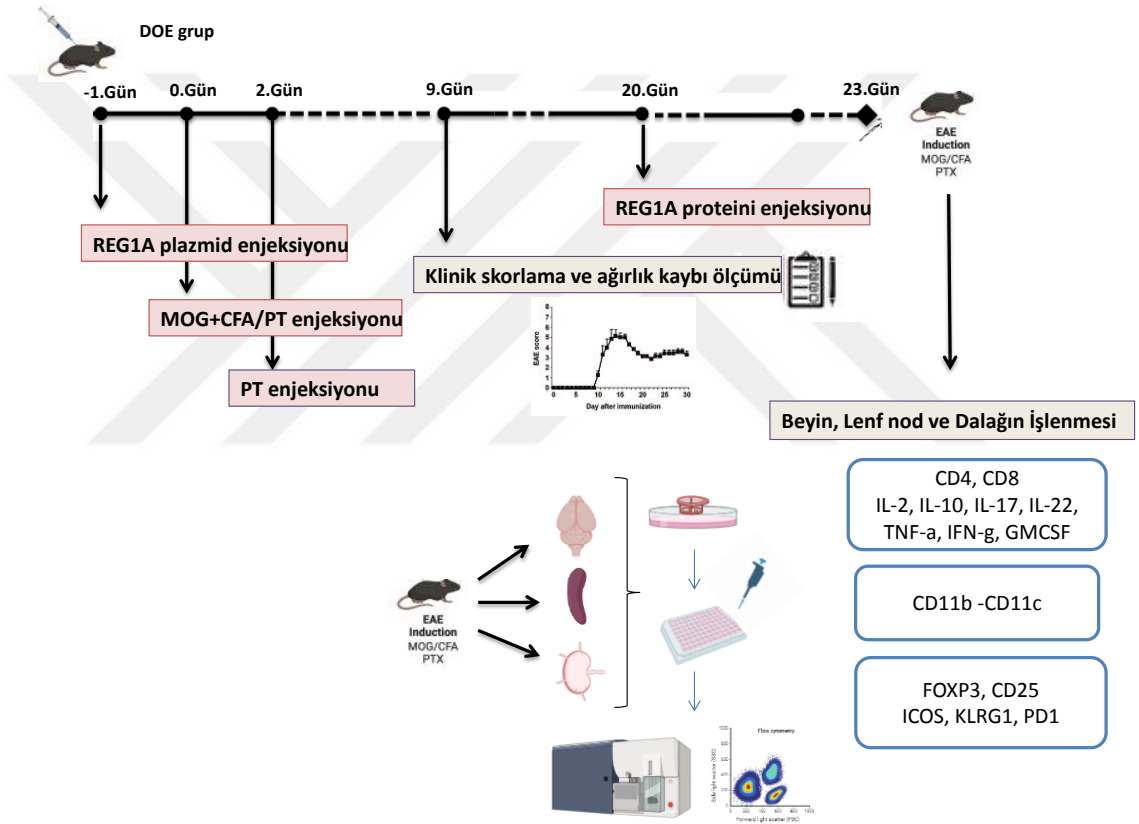
3.2.18. MOG35-55 Peptidi İmmünizasyonu ile Akut DOE (EAE) Geliştirilmesi ve Hastalık Skorlaması

1 mg/ml PBS içinde hazırlanan MOG35-55 peptidinden 2 mg/ml alınarak, 40 mg/ml inaktive edilmiş Mycobacterium Tuberculosis ekleyerek güçlendirip hazırladığımız Complete Freund's Adjuvant'dan yine 1:1 oranında alınıp cam şırınga içinde ve stopcock (bağlantı) aracılığıyla karıştırarak emülsiyon hazırlanmış ve farelerin sağ ve sol kalça/abdomen birleşim bölgesine subkutan olarak 100'er µl emülsiyon enjekte

edilmiştir. Ayrıca immünizasyonun yapıldığı gün (0'ncı) ve 2'nci gün 200'er ng Pertussiss Toxin (200µl PBS içinde) intraperitoneal olarak enjekte edildi ve farelerin hastalık derecesi skorlanarak deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) hastalığının şiddeti günlük izlendi (Şekil 3.4). EAE gelişimi daha önce belirtildiği üzere şu kriterlere göre skorlandı: **Kuyruk zayıflığı**: 1; arka ayaklarda zayıflık ve ters çevrilen farenin dönme yetisini kaybetmesi: 2; arka ayaktan birinde felç: 2.5; iki arka ayakta felç: 3; ön tek ayakta felç: 3.5; ön ik ayakta felç: 4; moribund:5 (Eken ve ark 2017).

3.2.19. Beyin ve Omurilik'ten Lenfosit Elde Edilmesi

Fareler anestezi ile uytulup kalp açılarak sol ventrikülünden 10 mL 1X PBS ile perfüzyon yapıldı ve 3 kez tekrar edildi. Ardından beyin ve omurilik alınıp 1X P PBS solüsyonu içeren ependorf tüplere alındı işleme alınana kadar ependorf tüpler buzda bekletildi. 2.5mg/ml kollojenaz içeren DMEM medyumundan 1 ml alınıp 10 cm kültür tabağına aktarıldı ve organlar skalpel ile 1 mm parçalara ayrıldı. 37°C'de 30 dk enzimatik muamele sonucu oluşan tek hücre karışımı 70 µm'lik filtreden geçirildi. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve pellet % 40'lik 5 ml Percoll içinde çözüldü. 15ml falcon tüpe %90 Percoll 5 mL ilave edilip üzerine %40'lık hücre süspansiyonu döşendi. Oda sıcaklığında 20 dk 500 g'de frensiz olarak döndürüldü. Orta kısımdaki haleden lenfositler toplanıp 10% FBS içeren RPMI 1640 içinde çözüldü ve deneylerde kullanmak üzere hücre sayımı yapıldı.

A**B**

Şekil 3.4. Deney akış şeması-3. REG1A veya boş plazmid enjeksiyonundan bir gün sonra Complete Freund's Adjuvant/MOG35-55/ immünizasyonu yapıldı, immünizasyondan 20 gün sonra ise 1 doz Rekombinant insan REG1A proteini (25ng/ml) verildi. 3 gün sonrasında ise fareler sakrifiye edildi.

3.2.20. Dalak ve Lenf Nodundan Lenfosit Elde Edilmesi

Fareler sakrifiye edildikten sonra düz bir zemine sabitlendi. Karın bölgesinden kesi açılarak dalak ve lenf nodlar çıkartıldı. Ayrı ayrı 1X PBS solüsyonu içeren ependorf tüplere alındı işleme alınana kadar ependorf tüpler buzda bekletildi. Dalak ve lenf nodu 1X PBS ile hücre parçalayıcı (Cell Strainer-70 µm çapında) yardımıyla ezilerek 400 g'de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant döküldü. Dalak dokularının üzerine kırmızı kan hücre liziz (Red Cell Lysis) solüsyonundan 1 ml eklenerek 5 dk. oda ısısında inkübe ettikten sonra 400 RCF de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatant döküldü. Dalak ve lenf nodları 2 kez steril PBS ile yıkandıktan sonra 1 ml complete medyumda çözülerek deneylerde kullanıldı. Red Cell Lysis buffer (Cat No: 420302) 10X'lik bir çözelti olarak satın alındı ve deiyonize suda 1X'e seyreltililerek kullanıldı.

3.2.20.1. Yüzey boyama protokolü

Yaklaşık 1×10^6 hücre 100 µl boyama solüsyonu (PBS, %2 FBS ile desteklenmiş) 5 dakika boyunca 10µl Fc-blok eklenerek bloke edildi. Daha sonra yüzey boyaması için hücreler yüzey antijenine özgü florokrom-konjuge antikor ile 20 µL boyama solüsyonu eklenerek karanlıkta buz üzerinde 30 dakika boyunca boyandı. Daha sonra hücreler, 3 dakika boyunca 400 g'de döndürülerek iki kez boyama solüsyonu ile yıkandı.

3.2.20.2. Hücre içi sitokin boyama (ICC) protokolü

Beyin, lenf nod ve dalaktan elde edilen hücreler 96-kuyulu yuvarlak uçlu tabaklara alınıp RPMI (10% FBS+Anti-anti içeren) kültür medyumunda PMA (50ng/ml) Ionomycin (1µg/ml) ve Golgi Plug (1µl/ml) ile 4 saat uyarıldı. Buz üzerine alınan kültür tabağındaki örnekler 5 dk 1µg/ml anti-mouse CD16/CD32 ile muamele edilip Fc reseptörleri bloke edilip, ardından anti-TCRa/b-FITC ile 15 dk buz üzerinde yüzey boyamasına tabi tutuldu. 400 g'de 3 dk santrifüjden sonra hücreler boyama solüsyonu ile yıkandı. Fixation/Permeabilization Kit With BD GolgiStop (Cat.No:554715)'daki fiksatiften 100µl kullanılarak hücreler 15 dk 4°C'de fiks edildi. permeabilize etmek için kitteki BD Perm/Wash™ tampondan 1X kullanıldı ve pellet içinde iki kez yıkandı. Daha sonra florokrom-konjuge antikorlar ile 20 µL Perm buffer içinde 30 dk 4°C'de boyandı. İki kez boyama solüsyonu ile yıkanan hücreler 200 µL boyama solüsyonunda çözündürülüp FACS AriaIII ile incelendi.

3.2.21. İstatistik Analiz

Shapiro–Wilk test ile veri normal dağılımı incelenip Student's t-test, Man Whitney U test, ANOVA ve non-parametrik testler uygulandı. Normal dağılan veriler için çoklu karşılaştırmalarda ANOVA multiple comparison test sonrasında Tukey's düzeltmesi ile uygulanmıştır. Normal olmayan dağılımlarda non-parametrik Kruskal Wallis test ise Dunn's düzeltmesi yapılarak kullanılmıştır. İkili karşılaştırmalarda Student's t test veya Mann Whitney den birisi tercih edilmiştir. Bütün durumlarda $p \leq 0.05$ anlamlı kabul edildi (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$). Flow sitometri datalarının analizi için Flowjo (10.0.6) programı, ve istatistiksel analiz için GraphPad Prism 9 yazılımı kullanıldı.

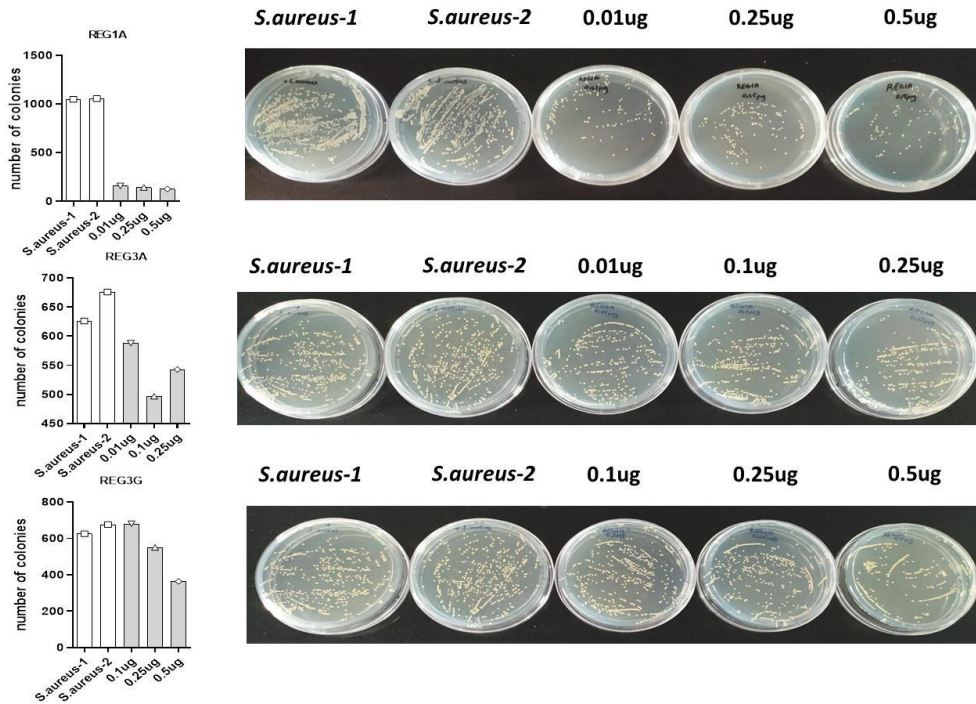
Tablo 3.7. *In vivo* Deneylerde Kullanılan Boya Karışımları

Karışım 1		
BV510	CD4	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
APC/Cyanin7	CD8	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
APC	IL17	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PE	IL22	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PercpCy5.5	IL2	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PE/Cyanin7	IL10	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
Karışım 2		
PE	CD4	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
APC/Cyanin7	CD8	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PE/Cyanin7	IFN γ	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PE Dazzle 594	TNF α	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PercpCy5.5	GM-CSF	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
Karışım 3		
PE	CD4	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PercpCy5.5	CD25	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
APC	FOXP3	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
Karışım 4		
BV510	CD4	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
BV421	ICOS	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
APC	KLRG1	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PercpCy5.5	PD-1	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
PE	FOXP3	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
Karışım 5		
PE	CD11c	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)
APC	CD11b	0,2 µl (0,2 mg/ml stoktan)

4. BULGULAR

4.1. Reg Proteinlerinin *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi

Reg proteinlerinin antimikrobiyal etkinliğini belirlemek amacıyla REG1A, REG3A ve REG3G' nin farklı konsantrasyonlarının ve *Staphylococcus aureus* bakterisinin ekimi materyal metot kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Ertesi gün petri kaplarında çoğalan bakteri kolonileri sayıldı. Kontrol grubu olarak sadece *Staphylococcus aureus* bakterisinin ekim yapıldığı 2'ser petri kullanıldı. Kontrol gruplarına göre kıyasladığımızda her üç reg proteininin farklı konsantrasyonlarında koloni sayılarında azalma belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *S. aureus* üzerine REG1A, REG3A ve REG3G proteinlerinin anti-mikrobiyal etkisi. Her üç reg proteininin farklı konsantrasyonların kontrol gruplarıyla kıyasladığımızda koloni sayılarında azalma belirlendi.

4.2. REG1A, REG3A ve REG3G'nin Farklı Dozlarının Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi

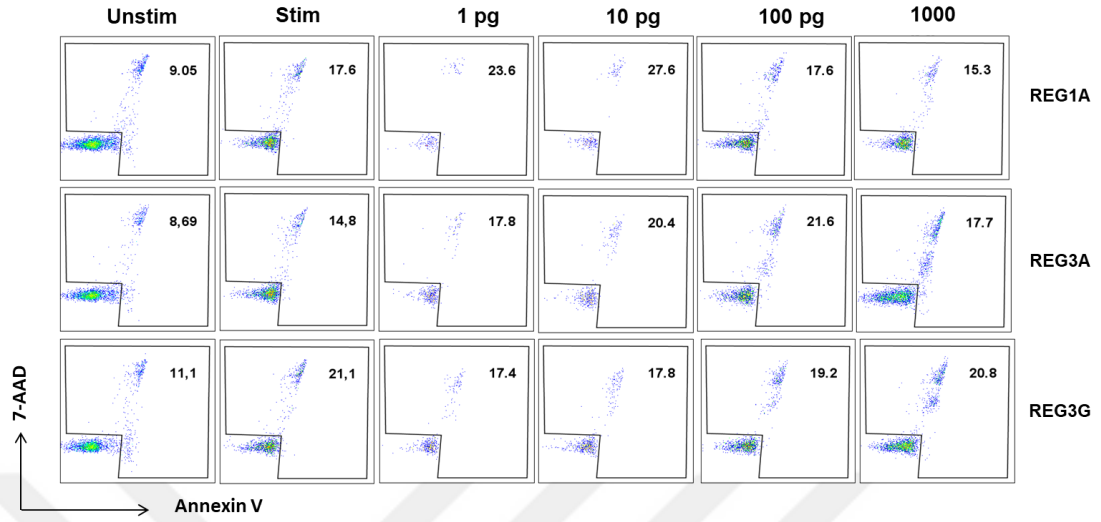
REG proteinlerinin T hücre hattı olan Jurkat hücreleri üzerine apoptoz etkisini araştırdık. Jurkat hücreleri yöntem bölümünde anlatıldığı gibi çoğaltıldı. Literatür taraması yapılarak uygulanacak REG dozlarını 1 ng, 10 ng, 50 ng olarak belirlendi. Jurkat hücreleri, 24 saat boyunca REG1A, REG3A ve REG3G'nin farklı konsantrasyonları ile birlikte anti-human CD3/28 ile uyarıldı. Apoptoz boyamasının ardından FACS AriaIII cihazında hücrelerin apoptoz yüzdeleri ölçüldü. Üç farklı REG proteinimiz ve her biri için belirlenen dört farklı doz vardı. Deneydeki tüm dozlar sadece anti-human CD3/28 ile uyardığımız kontrol grubu hücreler (0 pg ve 0 ng ile gösterilmiştir) ile karşılaştırılmıştır. Sonrasında deneylerimizi 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1000 pg dozlarıyla gerçekleştirdik.

Jurkat hücrelerinde REG1A'nın ng dozları apoptozu etkilememişken 10 pg dozunda anti-human CD3/28 olanlara kıyasla apoptotik hücreler bir miktar artmıştır ancak anlamlı değildir. REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozlarında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.2)

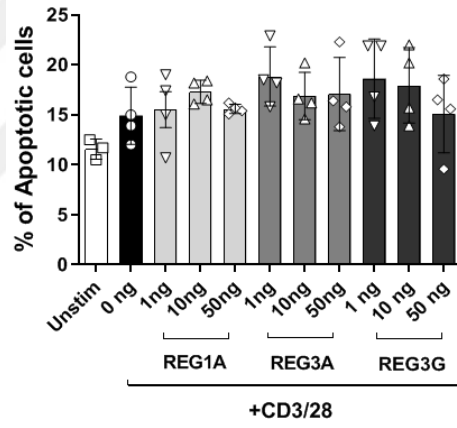
Deneylerimize PBMC'ler ile devam edebilmek amacıyla periferik kan mononükleer hücrelerin yöntem kısmında anlatıldığı gibi izolasyonu gerçekleştirildi. Anti-CD3/28 ekleyerek uyardığımız hücreler (0 pg ve 0 ng ile gösterilmiştir) stimülasyonlu kontrol grubu olarak kullanıldı. Primer hücreler üzerine anti-CD3/28 ve REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları eklendi ve 24 saat uyarma yapıldı. Apoptoz boyamasının ardından FACS AriaIII cihazında hücrelerin apoptoz yüzdeleri ölçüldü. PBMC'lerde REG1A'nın 0,5 ng ve 50 ng dozları kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptoz yüzdesi anlamlı olarak artmıştı ($p \leq 0.05$; $p \leq 0.005$). Ayrıca REG1A'nın 1 pg dozu kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak azalmıştı ($p \leq 0.001$) ancak 10 pg, 100 pg ve 1000 pg dozlarındaki azalma anlamlı değildi (Şekil 4.3).

REG3A ve REG3G'nin tüm 0,5 ng, 1 ng, 10 ng ve 50 ng dozları kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptoz yüzdesinde anlamlı olarak artış görülürken ($p \leq 0.001$; Şekil 4.3). 1 pg, 10 pg, 100 pg ve 1000 pg dozları kendi kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptoz yüzdelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

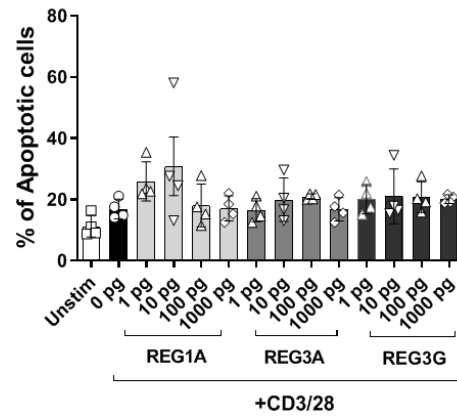
A



B

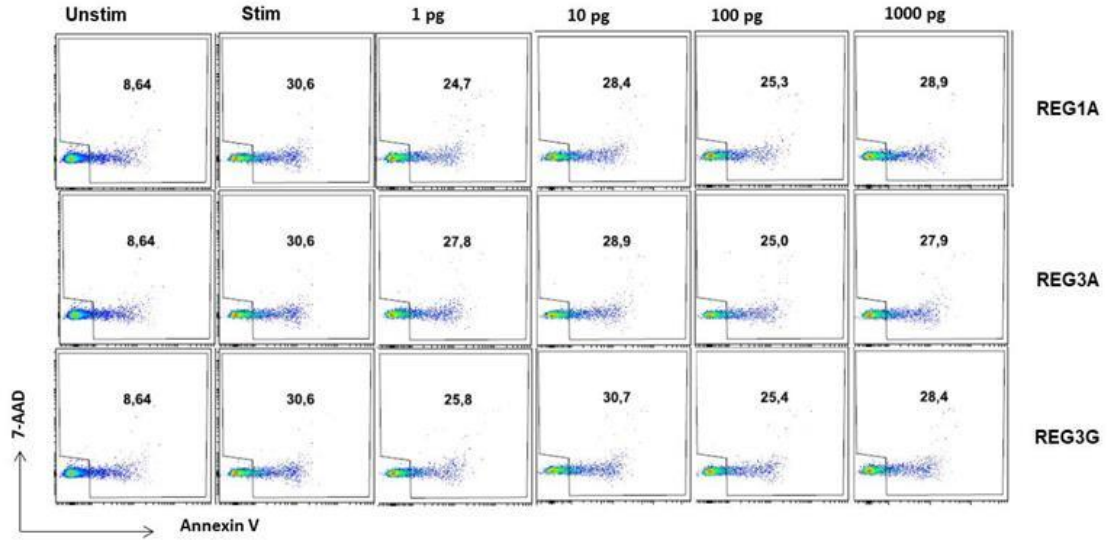


C

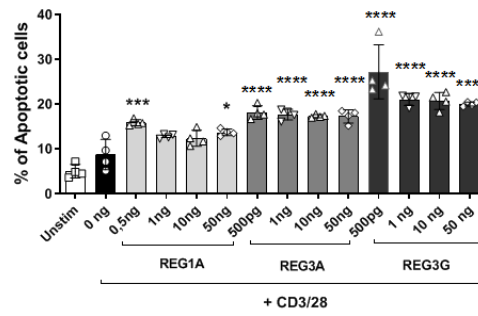


Şekil 4.2. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerinin canlılığını etkilemedi. **(A)** Pg dozlarında REG1A, REG3A ve REG3G varlığında Jurkat hücreindeki apoptoz miktarlarının flow sitometri ile gösterimi **(B)** ng dozlarda apoptoz yüzdelerinin bar grafiği ile gösterimi. **(C)** pg dozlarında apoptoz yüzdelerinin bar grafik gösterimi.

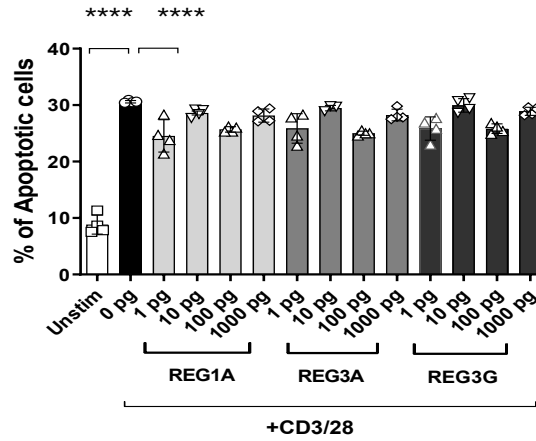
A



B



C



Şekil 4.3. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları PBMC'lerin canlılığını etkilemedi. **(A)** Pg dozlarında REG1A, REG3A ve REG3G varlığında Primer hücrelerde apoptoz miktarlarının flow sitometri gösterimi **(B)** ng dozlarda apoptoz yüzdelерinin bar grafik ile gösterimi. **(C)** pg dozlarında apoptoz yüzdelерinin bar grafik gösterimi. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$

4.3. REG1A, REG3A ve REG3G'nin Farklı Dozlarının Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde Proliferasyona Etkisi

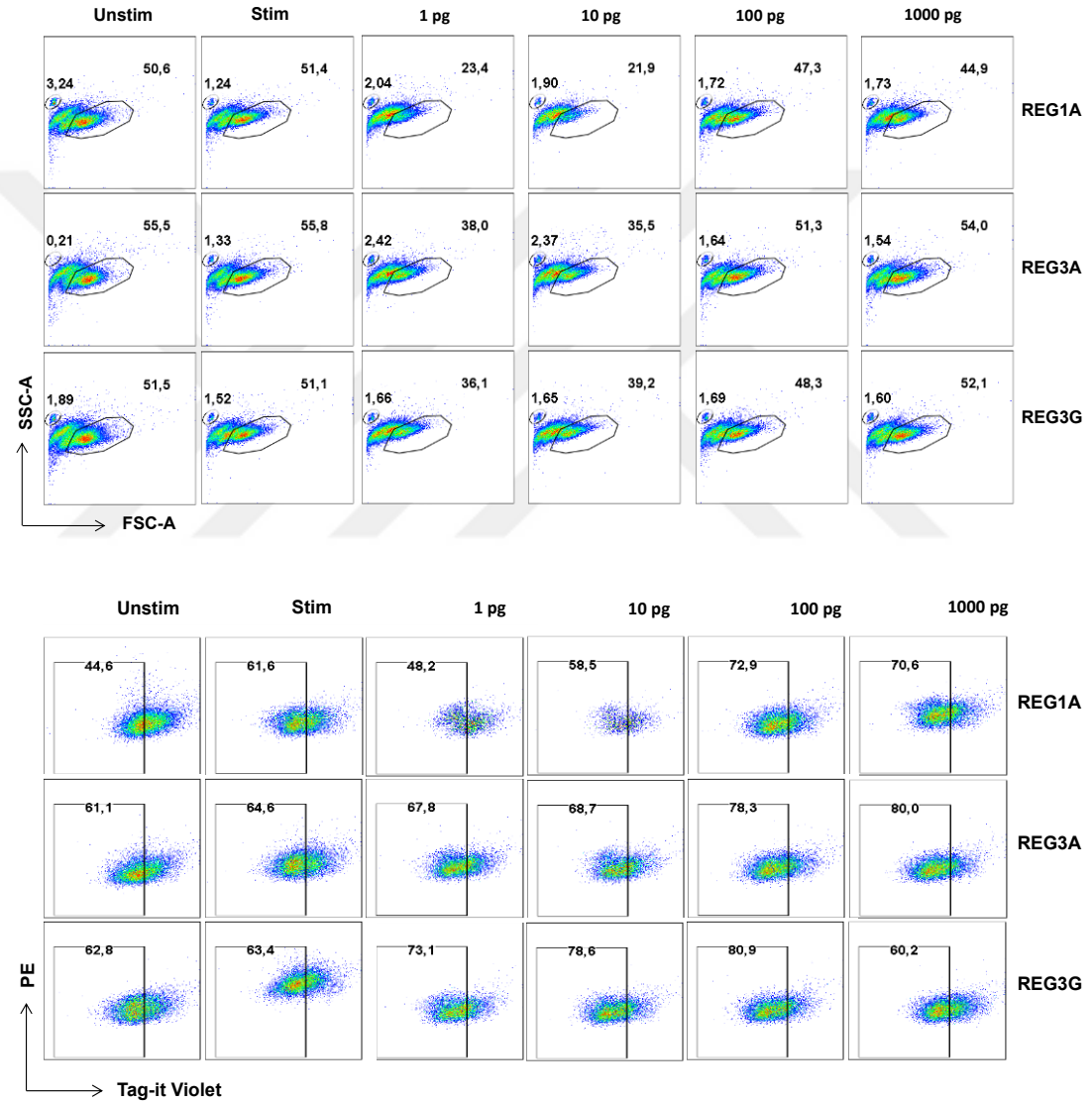
Jurkat hücreleri ve PBMC'leri, Tag-it-violet boyası ile %5 FBS'li PBS içerisinde 5dk karanlık oda ısısında boyandı. Etiketlemenin ardından belirlenen Reg dozlarının ng ve pg konsantrasyonları ile dört gün kültüre ettikten sonra flow sitometride hücrelerin proliferasyon yeteneklerini kıyasladık. Jurkatlar kendiliğinden çoğalabilen hücre hattı olduğu için hücrelerin çoğu kendiliğinden bölünme geçirdi. Bu yüzden Unstim koşuldaki hücrelerde de çoğalmanın fazla olduğu görüldü.

Jurkat hücrelerinin proliferasyon yeteneği kontrol ile karşılaştırıldığında REG1A'nın ng dozlarında anlamlı fark gözlenmedi. Mutlak sayılarında ng dozlarında kontrole göre azalma gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. REG1A'nın pg dozlarında yüzde olarak anlamlı fark gözlenmedi. Mutlak sayılarında ise ng dozlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma, 1pg ve 10 pg dozlarında ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p \leq 0.05$; Şekil 4.4).

REG3A'nın ng dozları kontrol grubu karşılaştırıldığında kontrol grubuna kıyasla yüzde ve mutlak sayılarında doza bağlı bir azalma gösterirken pg dozlarında ise doza bağlı bir artış gözlemlendi ancak anlamlı değildi (Şekil 4.4). REG3G'nin ng ve pg dozları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna kıyasla yüzde ve mutlak sayılarında azalma gösterdi ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.4). Bu sonuçlar REG1A'nın, T hücre proliferasyonu üzerine bifazik etkiler olabileceğini, REG3A ve REG3G proteinlerinin major ve doza bağlı etkisi olmadığını göstermektedir. Öte yandan Reg proteinlerinin farklı dozlarında proliferasyonda hiç fark gözlemleyememişken Reg koyduğumuz stimülasyonlu hücrelerin küçülerek boyutlarının etkilendiği görüldü. Uyarılmamış hücreler daha yaygın ve büyüklerken özellikle REG3G'nin 1ng dozunda hücreler daha büyükken, 10 ng ve 50 ng de hücrelerin boyutları daha küçüktü. Bu durumu bize hücreler daha hızlı bölündükleri için boyutlarının küçük olabileceğini düşündürmektedir. PBMC'lerde REG1A'nın 1ng dozunda kontrol grubuna kıyasla proliferasyon olan hücrelerin yüzdesinde anlamlı artış vardı, diğer dozlarda ise farklılık gözlenmedi ($p \leq 0.05$; Şekil 4.5)

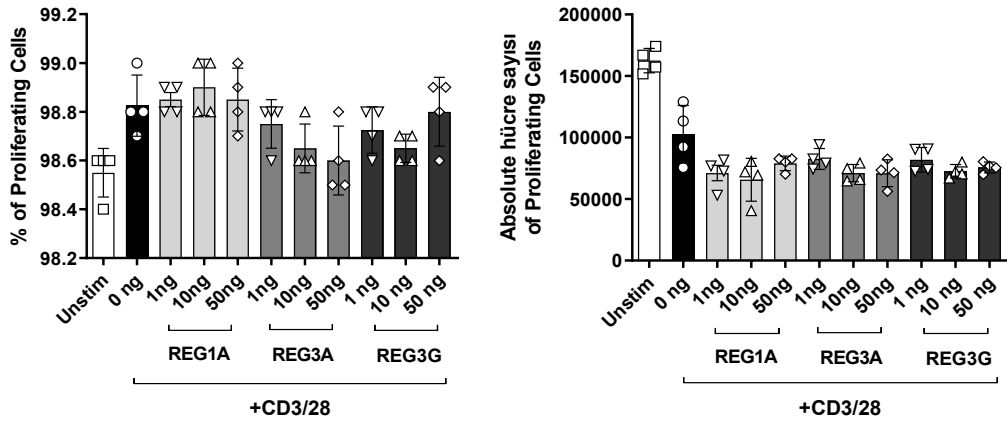
REG3A'nın 0,5 ng ve 1 ng dozlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış vardı. ($p \leq 0.005$, $p \leq 0.001$). Pg dozlarında yüzde ve mutlak hücre sayılarında farklılık gözlenmedi. 10 pg dozdaki mutlak hücre sayısındaki azalma anlamlıdır ($p \leq 0.05$; Şekil 4.5). REG3G'nin 0,5 ng ve 1 ng dozlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış vardır. Özellikle 100 pg'da proliferasyon yüzdesindeki azalma anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$; Şekil 4.5).

A

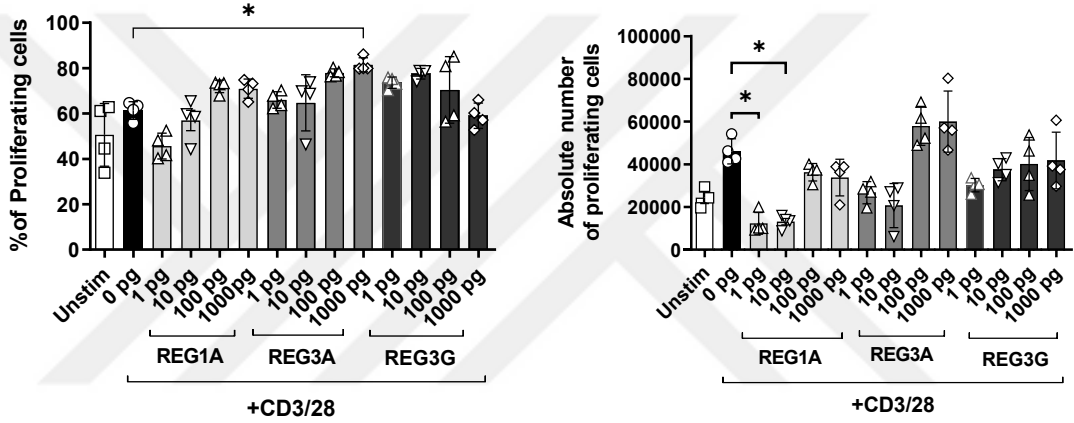


Şekil 4.4. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerin proliferasyon kabiliyetini etkilemedi. **(A)** Pg dozlarında Taq-it violet ile boyanmış Jurkat hücrelerin proliferasyon miktarlarının flow sitometri gösterimi.

B



C

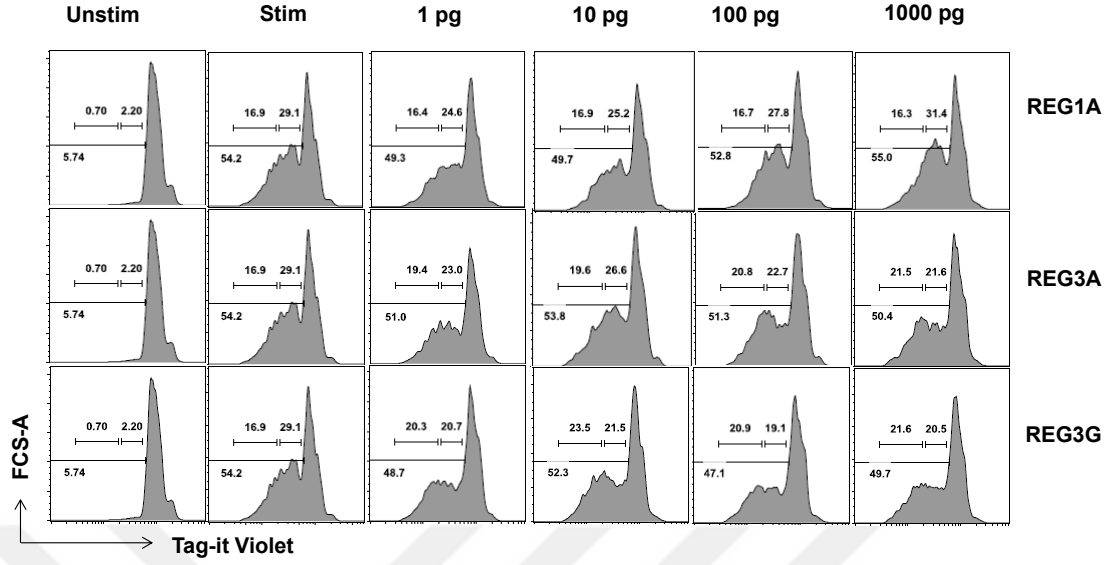


Şekil 4.4. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerin proliferasyon kabiliyetini etkilemedi. **(B)** ng dozlarda proliferasyon yüzde ve mutlak sayı bar grafik gösterimi. **(C)** Pg dozlarda proliferasyon yüzde ve mutlak sayı bar grafik gösterimi. * $p \leq 0.05$ (Devamı)

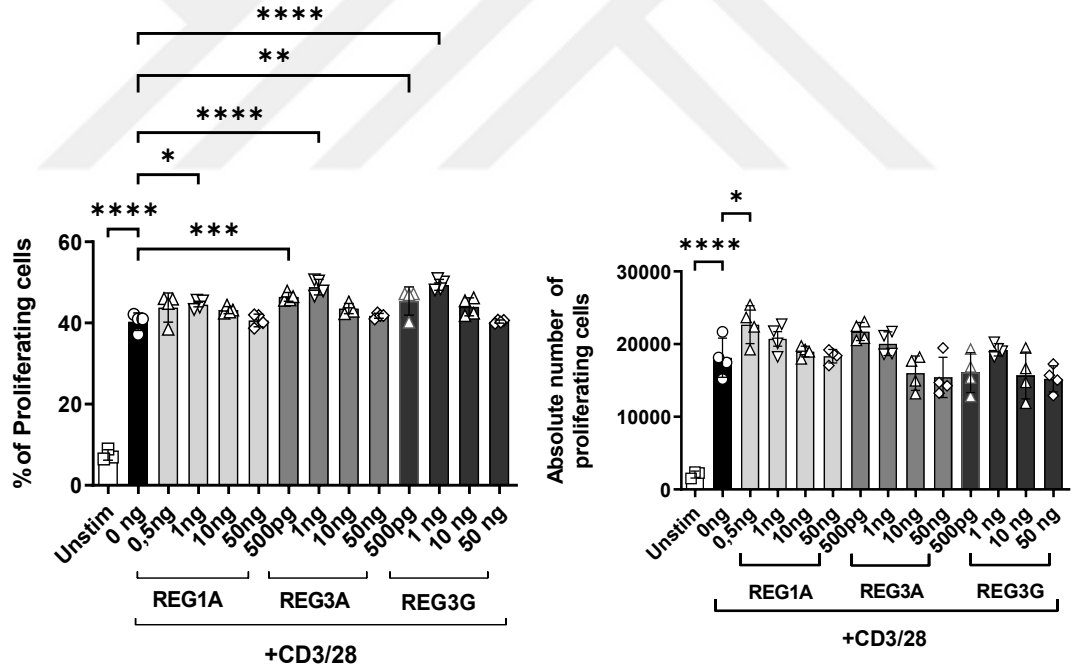
4.4. REG1A, REG3A ve REG3G'nin Farklı Dozlarının Jurkat Hücrelerinde ve PBMC'lerde IL-2 Sitokinin Üretimi Üzerine Etkisi

T hücrelerindeki IL-2 üretimini belirlemek amacıyla Jurkat hücrelerini anti-CD3/28 ile altı saat uyardıktan sonra hücre içi sitokin üretiminin tespiti için florofor konjuge antikor ile boyandı. Flow sitometride IL-2 sitokin üretimi analiz edildi. Anti-CD3/28 ile uyardığımız Jurkat hücreleri unstim'deki uyarım yapmadığımız hücelere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bir IL-2 ifadesi gösterdi ($p \leq 0.01$; Şekil 4.6).

A

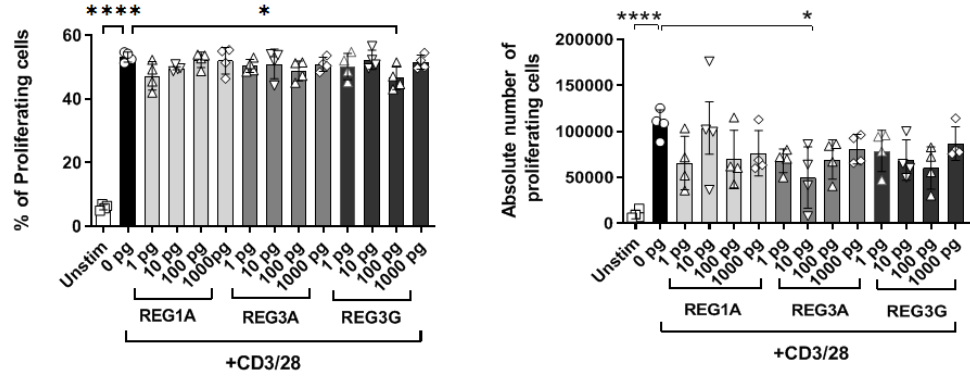


B



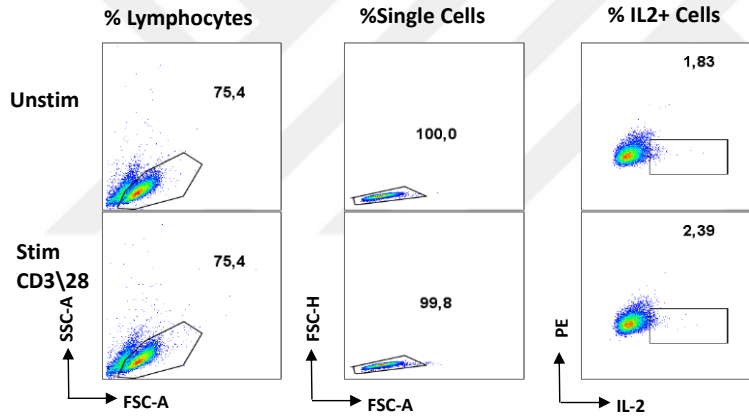
Şekil 4.5. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları PBMC'lerin proliferasyon kabiliyetini etkilemedi. **(A)** Pg dozlarında Taq-it violet ile boyanmış PBMC'lerin proliferasyon miktarlarının flow sitometri gösterimi. **(B)** ng dozlarda proliferasyon yüzde ve mutlak sayı bar grafik gösterimi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$

C

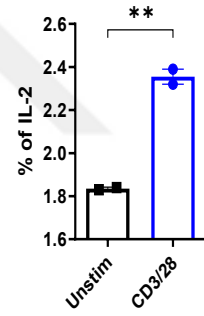


Şekil 4.5. PBMC'lerin REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng dozlarında daha iyi çoğalırken pg dozları proliferasyon kabiliyetini düşürdü. **(C)** Pg dozlarında proliferasyon yüzde ve mutlak sayı bar grafik gösterimi. * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.001$ **(Devamı)**.

A



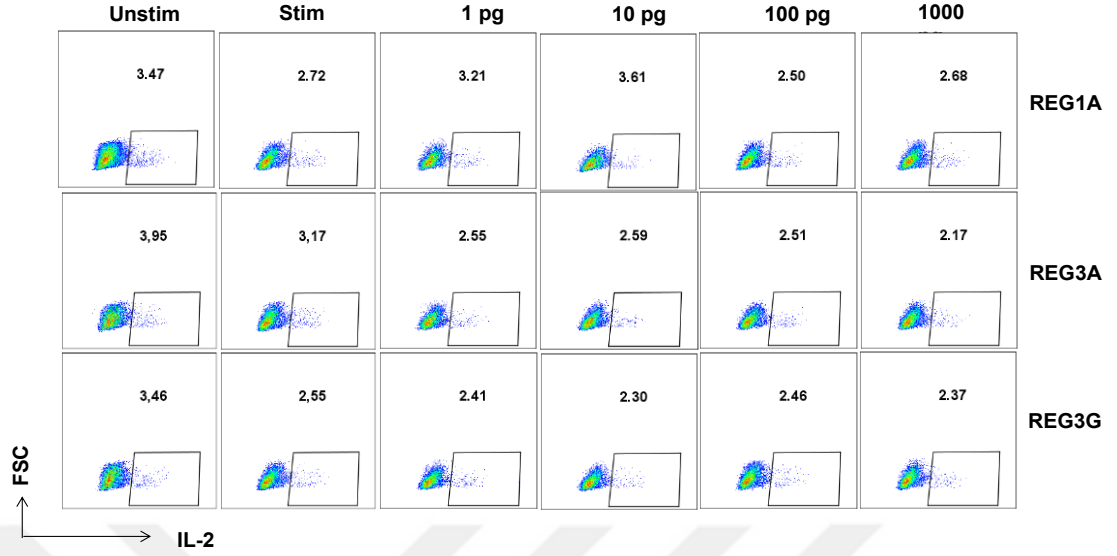
B



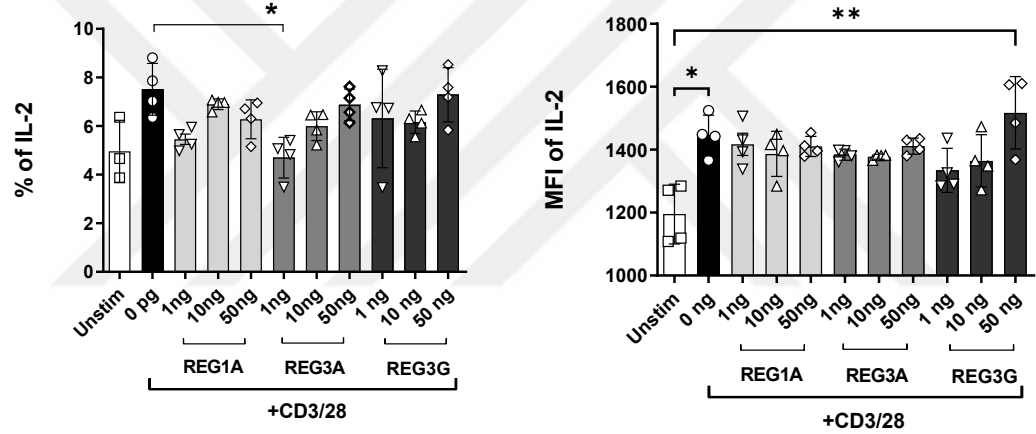
Şekil 4.6. Anti-CD3/28 ile uyarılan Jurkat hücrelerinde IL-2 üretimi artmıştır. **(A)** Jurkat hücrelerinin IL-2 üretim miktarlarının flow sitometri gösterimi **(B)** IL-2 üretim miktarlarının yüzde bar grafiği. ** $p \leq 0.01$

Jurkat hücrelerini PMA, İonomycin, Golgi stop ile dört saat aktive ettik. Sonra hücre içi sitokin boyaması yaparak flow sitometride analizi gerçekleştirdik. REG1A'nın ng dozlarında IL-2 üretimi kontrol grubuna kıyasla yüzde ve MFI sayılarında azalma gözlenmişken pg dozlarında artış gözlemlendi. REG3A da ng ve pg dozlarında kontrol grubuna kıyasla yüzde olarak üretimde azalma vardı ($p \leq 0.05$). REG3G 50 ng dozdaki MFI sayısı istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştır ($p \leq 0.01$; Şekil 4.7). Pg dozlarında yüzde ve MFI sayılarında ise fark gözlenmemiştir.

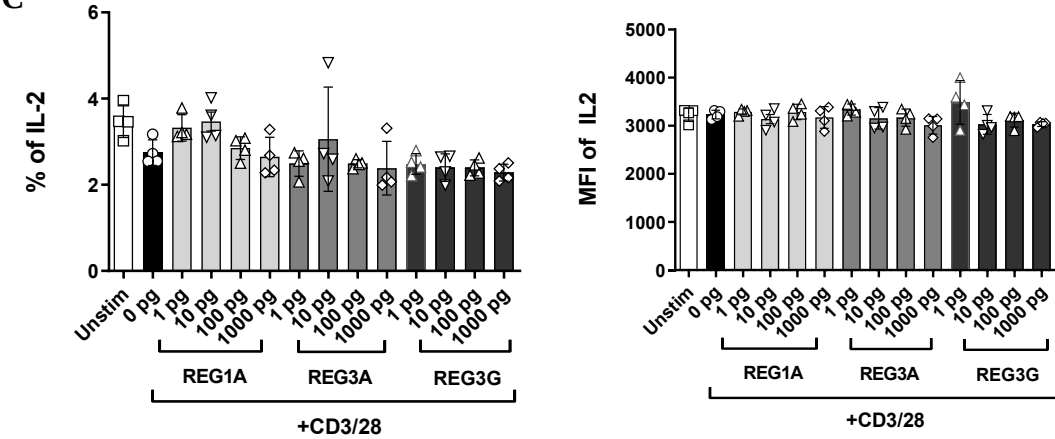
A



B



C



Şekil 4.7. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları Jurkat hücrelerinde IL-2 üretimi. (A) Pg dozlarında IL-2 üretim miktarının flow sitometri gösterimi (B) ng dozlarda IL-2 üretiminin yüzde ve MFI bar grafiğinde gösterimi. (C) Pg dozlarda IL-2 üretiminin yüzde ve MFI bar grafiğinde gösterimi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

PBMC 'leri alarak pg dozları ile birlikte anti-CD3/28 ve Golgi stop varlığında 6 saat kısa vadeli uyarım yapıldı ve sonra hücre içi boyama ile IL-2 üretimlerine bakıldı. Kısa süreli anti-CD3/28 ile TCR sinyal yolağı aktivasyonuna baktığımızda her üç Reg proteinin ng ve pg dozlarda yüzde IL-2 üretiminde bir miktar azalma görülmüştür (Şekil 4.8).

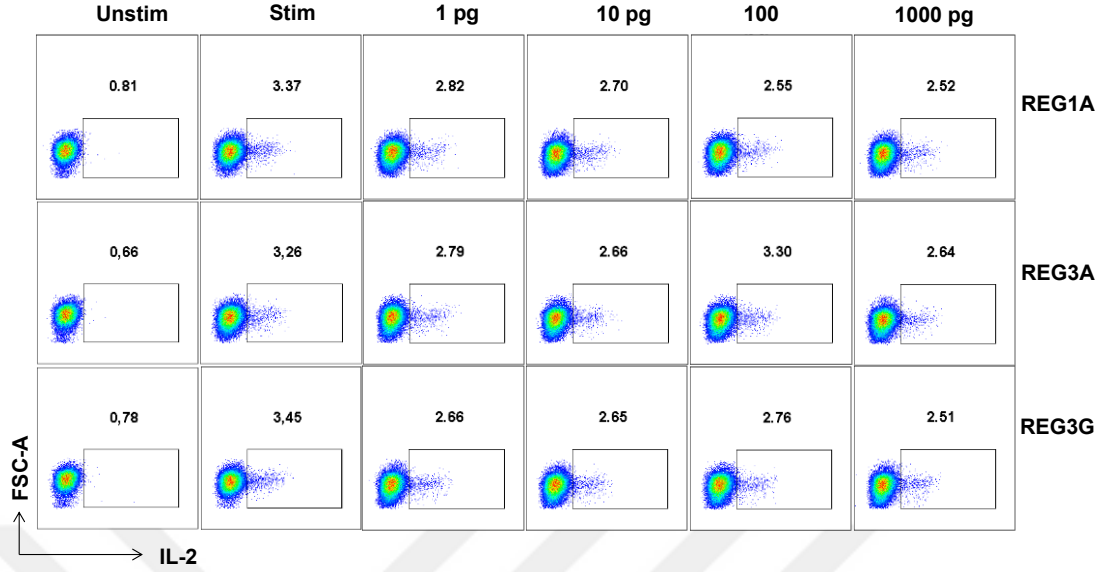
PBMC' leri benzer şekilde 3 gün uzun süre anti-CD3/28 aktivasyonuna maruz bırakıp yine T hücre reseptör sinyal yolağına baktığımızda ise her üç Reg proteinin pg dozlarında yüzde IL-2 üretiminde bir miktar artış görülmüştür. PBMC'leri 3 gün uzun süre anti-CD3/28 aktivasyonuna maruz bırakıp ardından PMA, İonomycin, Golgi Plug ile 4 saat uyardığımızda ise düşüş doz olan 1 pg' da bir miktar artış gözlenmiştir (Şekil 4.9).

Bu deneylerde uzun süreli anti-CD3/CD28 aktivasyonu sonrası REG1A maruziyeti açısından düşük ve yüksek dozlarda farklı olmak üzere bifazik bir etki olduğu söylenebilir. Ancak deneylerin hepsi göz önüne alındığında REG proteinlerinin doğrudan T hücrelerinin IL-2 üretiminde doza bağlı, tutarlı genellenebilir azaltıcı veya artırıcı etkisinin olmadığı ortaya çıkmıştır. Projenin geri kalan kısmında REG1A'nın hem nöronlarda daha önce denenmiş olması nedeniyle (Van Ba ve ark, 2012) hemde deneylerde bütçeyi yetirebilmek amacıyla sadeleştirme yapılarak sadece REG1A proteini ile devam edilmiştir.

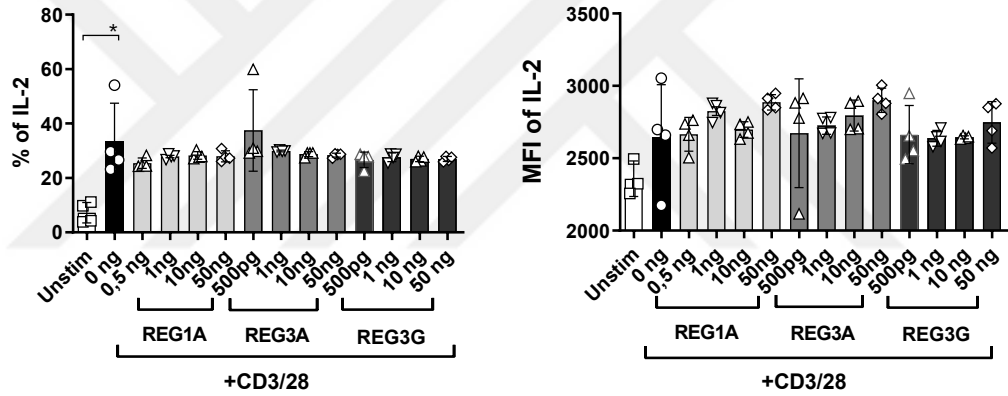
4.5. REG1A'nın Primer Hücrelerde CD25, CD69, CD127 gibi Aktivasyon Markırları Üzerine Etkisi

PBMC'lerden manyetik ayırma yöntemiyle CD4⁺ T hücrelerinin seçilimi yapıldı. CD4⁺ T hücreleri anti-CD3/28 ve REG1A proteininin dozlarıyla kültür edildikten sonra Tablo 3.1 de verilen karışım ile yüzey boyama gerçekleştirildi. REG1A'nın verildiği farklı dozlarda yüzde analiz sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla CD25, CD69 ve CD127 ifadelerinde doza bağlı anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.10). MFI sayıları değerlendirildiğinde CD69 ve CD25 ifadelerinde anlamlı bir fark gözlenmezken CD127 ifadesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, Şekil 4.10). Bu sonuçlar REG1A proteinin T hücre aktivasyon markırları üzerine çok etkisi olmadığını göstermektedir.

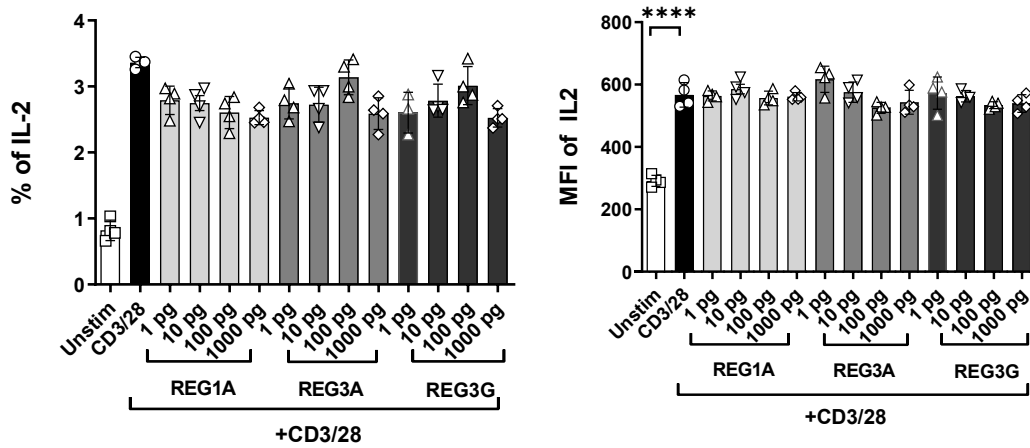
A



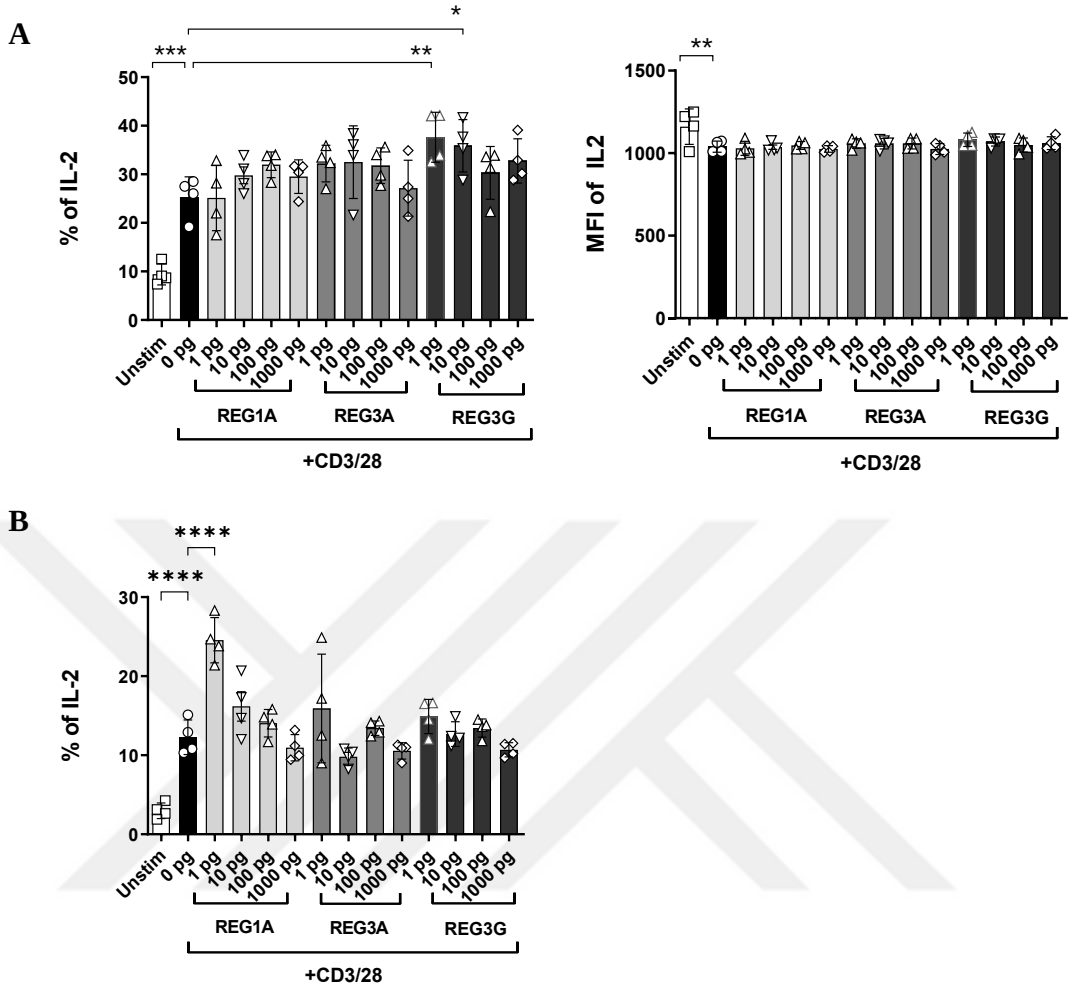
B



C



Şekil 4.8. REG1A, REG3A ve REG3G'nin ng ve pg dozları PBMC'lerde IL-2 üretimi miktarlarında anlamlı bir fark gözlenmedi (A) Pg dozlarında kültürü sonucu proliferasyon flow grafikleri (B) ng dozlarda IL-2 üretiminin yüzde ve MFI bar grafiğinde (C) pg dozlarında IL-2 üretiminin yüzde ve MFI bar grafiğinde gösterimi. $p \leq 0.001$



Şekil 4.9. Uzun süre antiCD3/28 ile aktive edilen PBMC'lerin **(A)** yüzde ve MFI bar grafiği gösterimi **(B)** PI-Gstop ile uyarım sonrası yüzde bar grafiği gösterimi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$

4.6. REG1A'nın Primer Hücrelerde Th2 Farklılaşması Üzerine Etkisi

CD4⁺ T hücreleri yöntem kısmında belirtildiği gibi manyetik ayırma yöntemiyle izole edildi. Hücreler eşit miktarda anti-CD3/28 kaplanmış pleyte dağıtıldıktan sonra farklılaşma sitokinleri (IL-4, anti-IFN-g) ve REG1A'nın dozları eklenerek polarize edilen hücreler farklılaşma sonunda PMA, İonomycin ve golgi stop ile uyarıldı. İmza sitokini olan IL-4'ün hücre içi sitokin boyaması yapıldı ve ürettikleri sitokin miktarları flow sitometri ile analiz edildi.

REG1A'nın pg dozlarında yüzde IL-4 üretiminde kontrol grubuna kıyasla fark yoktur. MFI sayıları değerlendirildiğinde IL-4 üretimi kontrol grubuna kıyasla

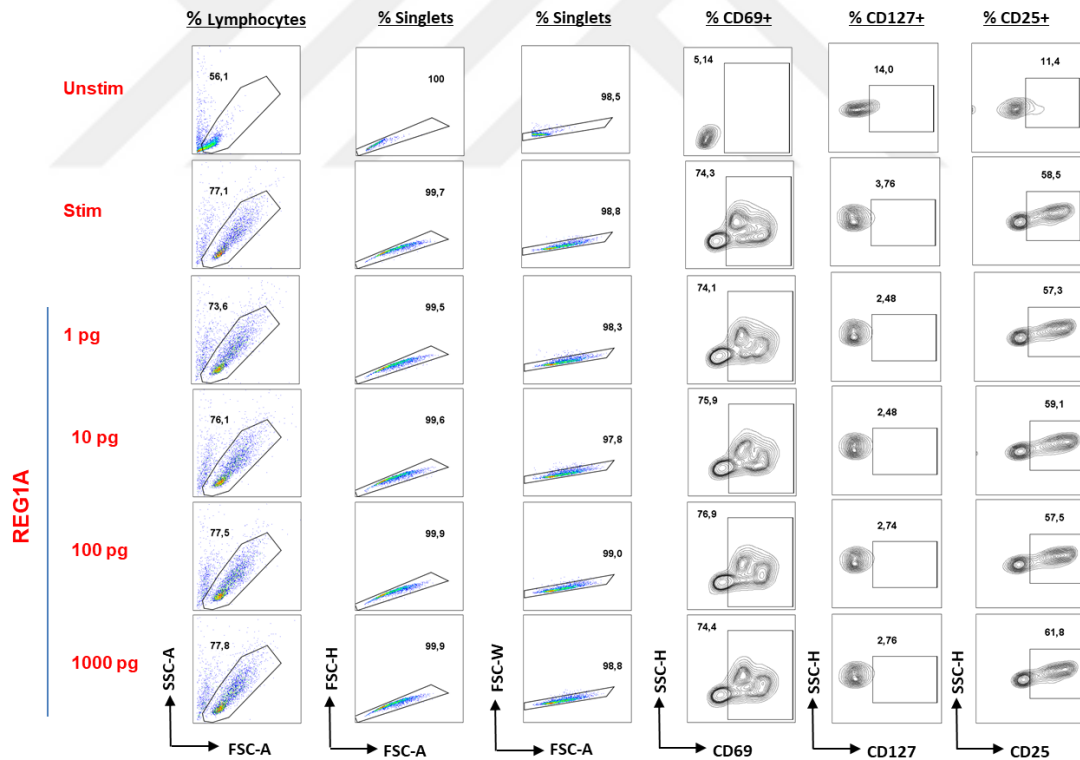
artmıştır. Mutlak hücre sayısı ise doza bağlı olarak artmıştır ancak anlamlı değildir (Şekil 4.11).

4.7. REG1A'nın Primer Hücrelerde Th17 Farklılaşması Üzerine Etkisi

İzole edilen $CD4^+$ T hücreleri eşit miktarda anti-CD3/28 kaplanmış pleyte dağıtıldıktan sonra farklılaşma sitokinleri ve REG1A'nın farklı dozları eklenerek polarize edildi. Farklılaşmanın son gününde hücreler PMA, İonomycin ve golgi stop ile uyarıldı. İmza sitokinler olan IL-17, IL-22 ve GMC-SF miktarlarını belirlemek için hücre içi sitokin boyaması yapıldı ve ürettikleri sitokin miktarları flow sitometri ile analiz edildi.

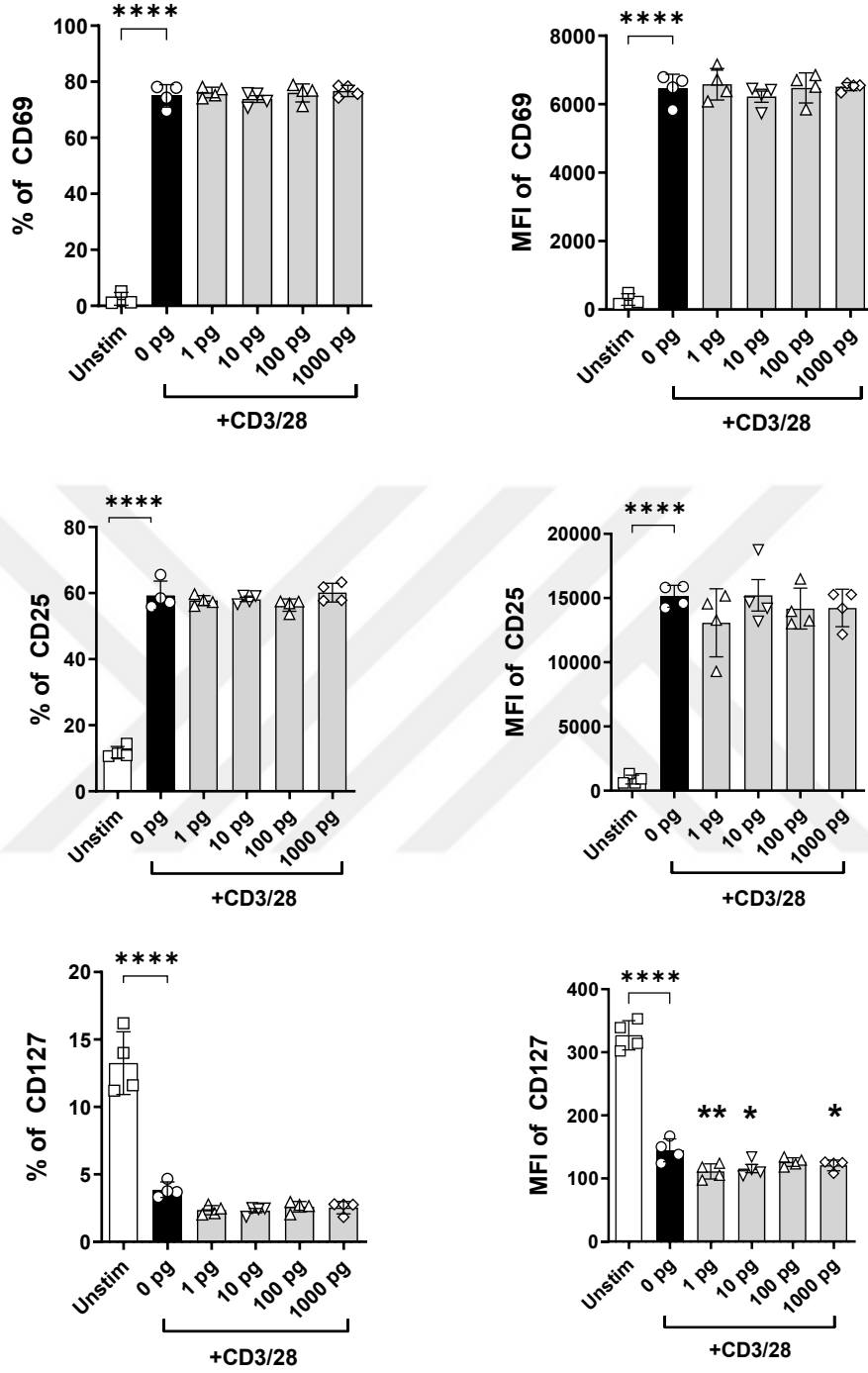
REG1A'nın yüzde analiz sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla IL-17 frekansı anlamlı ölçüde azalmış ve Th17 farklılaşmasını etkilemiştir ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.005$, $p \leq 0.001$; Şekil 4.12).

A



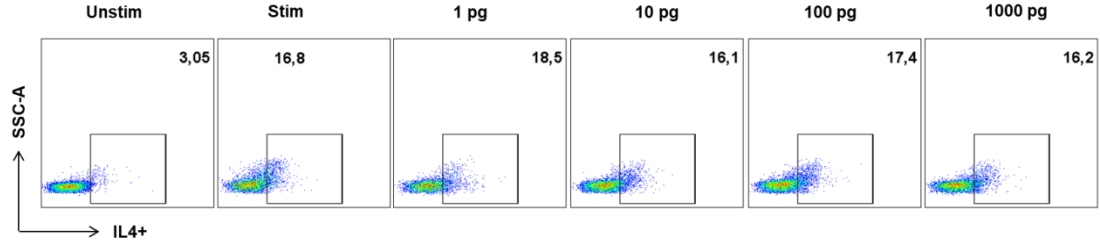
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda pg dozlarında REG1A varlığında primer T hücresinde CD25, CD69, CD127 gibi aktivasyon belirteçlerinin ifade miktarlarında anlamlı bir fark gözlenmedi. (A) CD69, CD127, CD25 hücrelerinin flow sitometri kapılaması

B

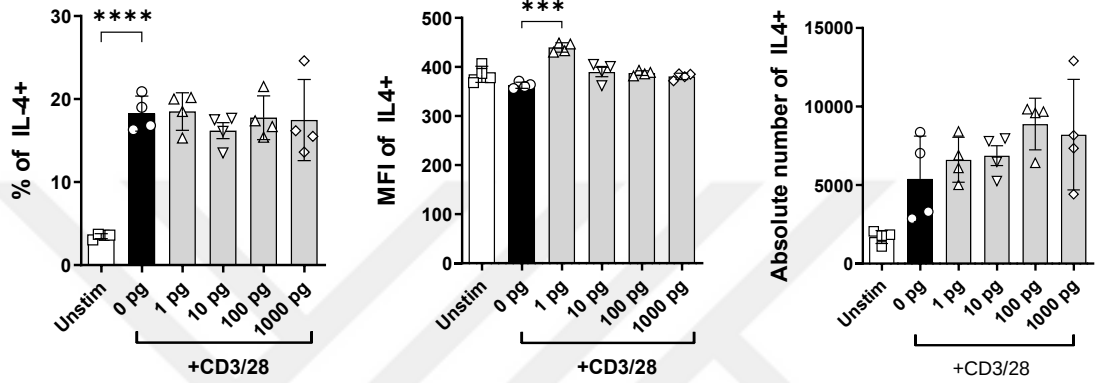


Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda pg dozlarında REG1A varlığında primer T hücrelerinde CD25, CD69, CD127 gibi aktivasyon markırlarının ifade miktarlarında anlamlı bir fark gözlenmedi. **(B)** CD69, CD127 ve CD25, hücrelerinin yüzde ve MFI bar grafiği gösterimi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$ **(Devamı)**

A

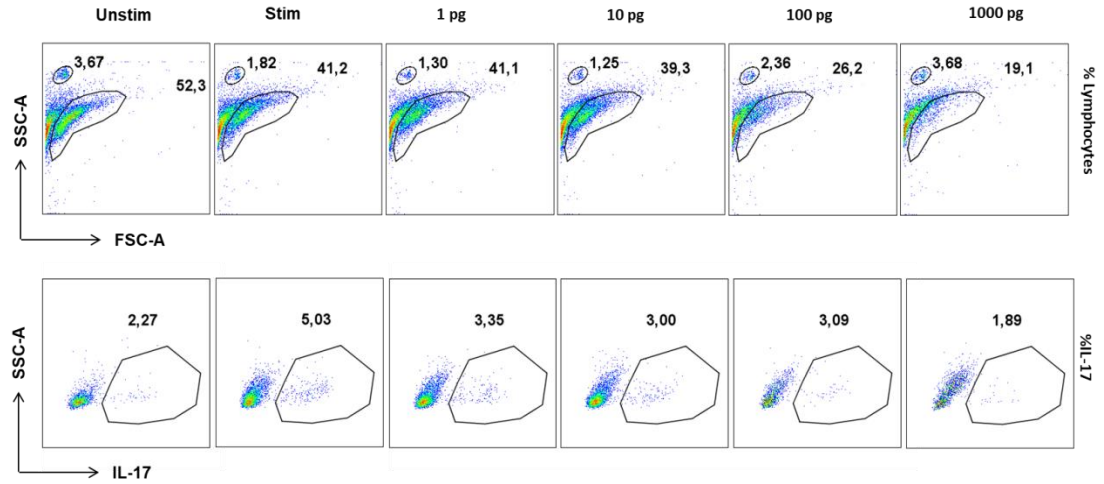


B

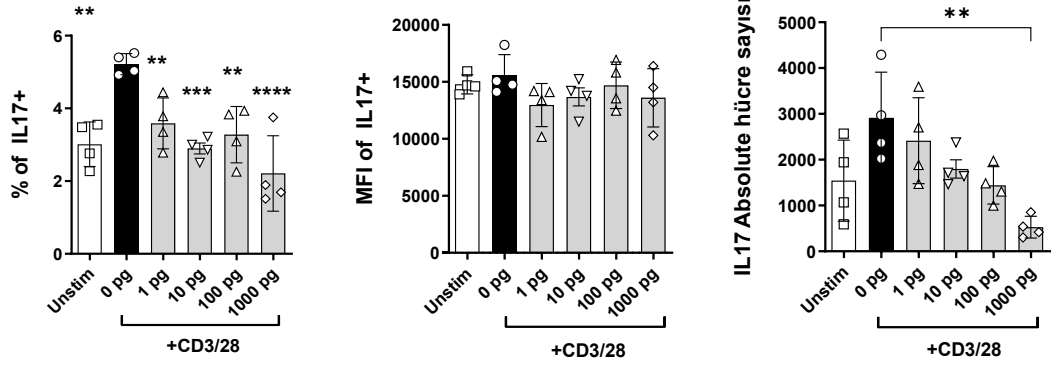
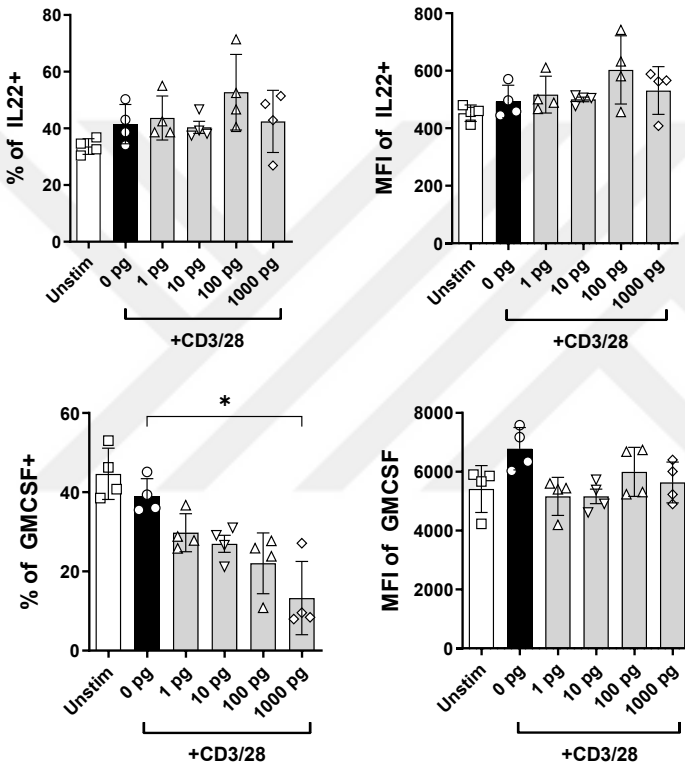


Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda REG1A'nın primer T hücrelerine verilmesi sonrasında Th2 polarizasyonu IL-4 üretiminde anlamlı bir fark gözlenmedi. **(A)** Primer hücrelerde REG1A'nın pg dozlarında kültürü sonucu IL-4 ifade eden hücrelerin flow sitometri kapılaması **(B)** IL-4 üretiminin yüzde, MFI ve mutlak sayı bar grafiği gösterimi. *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$

A



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında primer T hücrelerinde IL-17 üretimi azaltmıştır. **(A)** Primer hücrelerde REG1A'nın pg dozlarında kültürü sonucu IL-17 ifade eden hücrelerin flow sitometri kapılaması.

B**C**

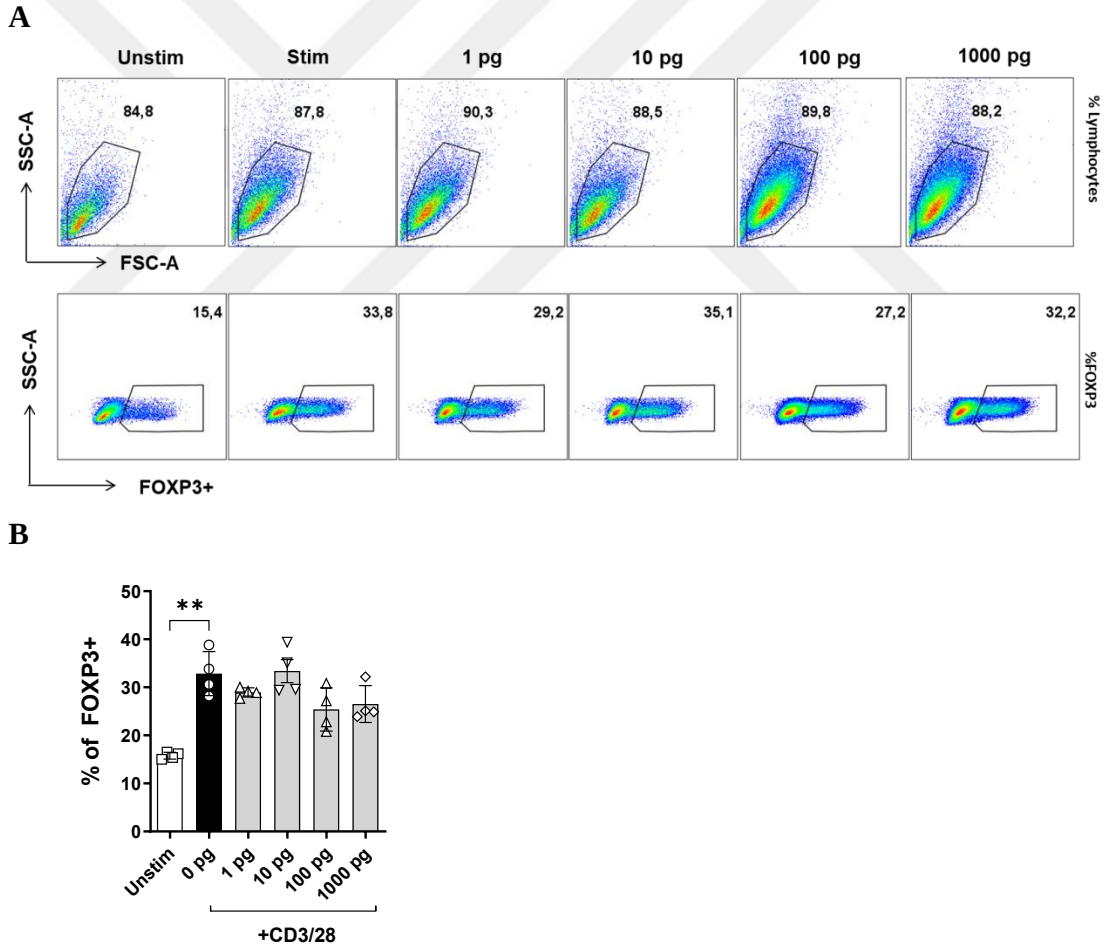
Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında primer T hücrelerinde IL-17 üretimi azaltmıştır. **(B)** IL-17 üretiminin yüzde, MFI ve mutlak hücre sayısı bar grafiği gösterimi. **(C)** IL-22 ve GM-CSF üretiminin yüzde ve MFI bar grafiği gösterimi. **(D)** GM-CSF üretiminin yüzde ve MFI bar grafiği gösterimi **(Devamı)**.

Ancak bu polarizasyon kondüsyonlarında yüksek doz REG1A ifadesi hücre ölümünü artırmıştır. REG1A'nın MFI sayıları değerlendirildiğinde IL-17 üretiminde fark gözlenmezken mutlak hücre sayısı ise doza bağlı azalmıştır ve 1000 pg dozda anlamlı azalma vardır ($p \leq 0.01$). Dolayısıyla IL-17A üzerindeki inhibisyonun kısmen hücre ölümünü artırarak olduğu öngörülebilir. IL-22 üretiminde yüzde ve MFI olarak fark gözlenmemiştir. GM-CSF üretimi yüzde ifadesinde doza bağlı bir azalma

göstermiş olup 1000 pg dozdaki azalma anlamlıdır ($p \leq 0.05$; Şekil 4.12). MFI sayıları değerlendirildiğinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir

4.8. REG1A'nın Primer Hücrelerde Treg Farklılaşması Üzerine Etkisi

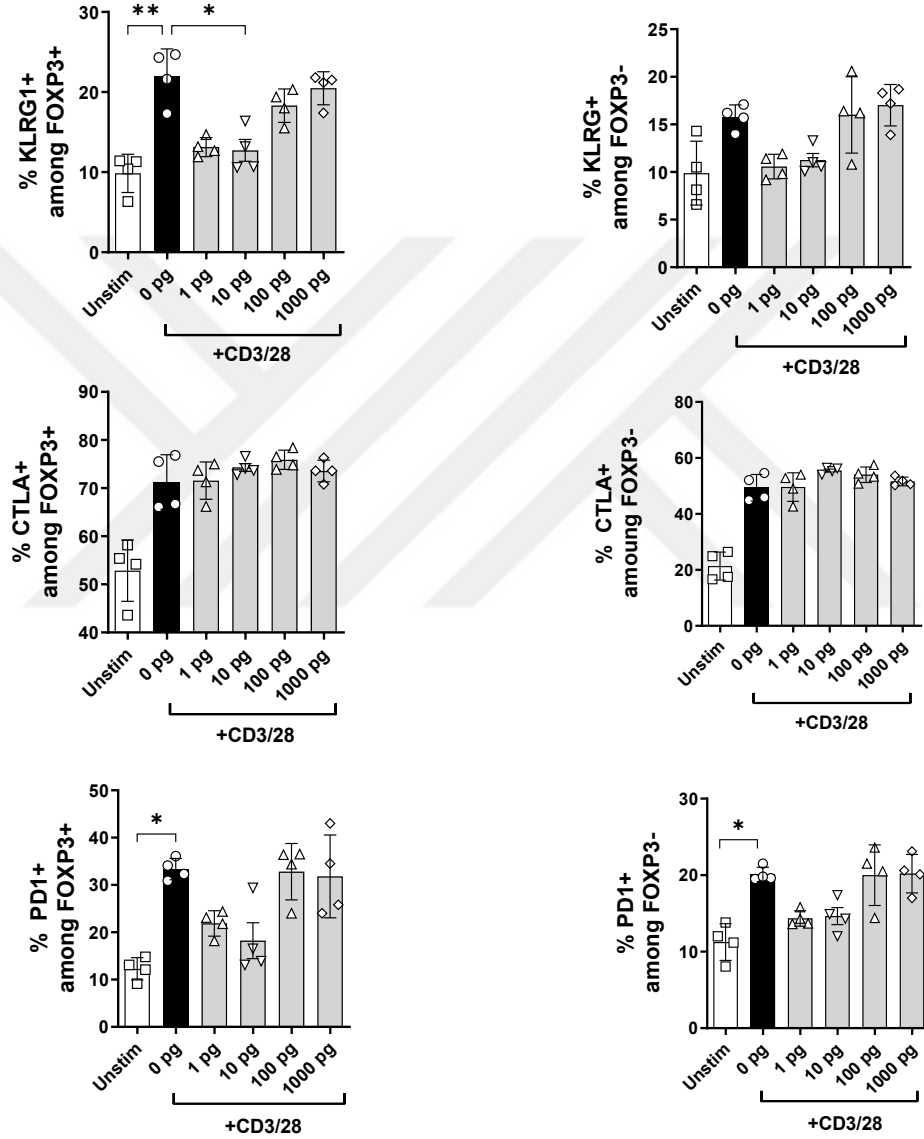
İzole edilen $CD4^+$ T hücreleri eşit miktarda CD3 kaplanmış pleyte dağıtıldıktan sonra farklılaşma sitokinleri, CD28 ve REG1A'nın dozları eklenerek polarize edildi. Ardından hücreler PMA, İonomycin ve golgi stop ile uyarıldı. Daha sonra kontrol noktası inhibitörlerinin analizi için yüzey boyaması ve ardından FOXP3 için transkripsiyon faktör boyaması yapıldı. $CD4^+$ T hücrelerinin ifade ettiği FOXP3⁺ ve FOXP3⁻ hücreler kaplandı. Daha sonra FOXP3⁺ ve FOXP3⁻ hücreler içinden CTLA-4, KLRG1 ve PD1 kapılamaları gerçekleştirilerek kontrol noktası inhibitörlerinin analizi yapıldı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında primer T hücrelerinde FOXP3 ifadesi. **(A)** Primer hücrelerde REG1A'nın pg dozlarında lenfositlerin ve FOXP3⁺ hücrelerin flow kapılaması **(B)** FOXP3 ifadesinin yüzde bar grafiği gösterimi.

Kontrol noktası inhibitörlerinin ifadesine baktığımızda ise FOXP3⁺ ve FOXP3⁻ hücrelerde kontrol grubuna kıyasla yüzde KLRG1 ve PD1 ifadesi REG1A'nın düşük dozlarında azalmışken yüksek dozda biraz daha artmıştır ($p \leq 0.05$; Şekil 4.14). Yüzde CTLA-4 ifadesinde ise bir fark gözlenmemiştir.

A



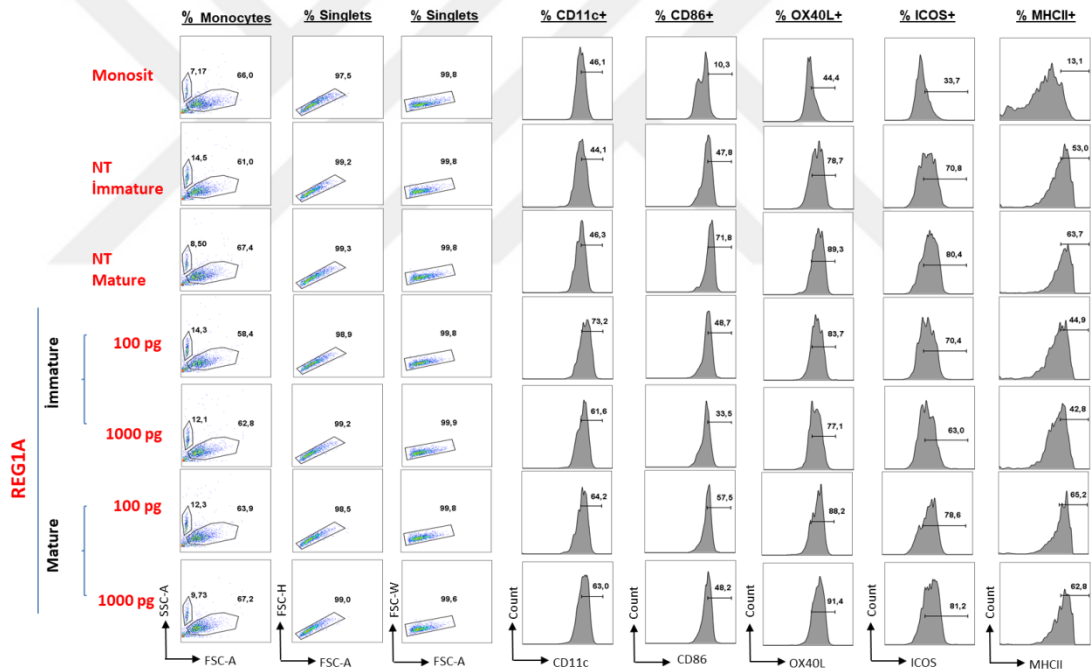
Şekil 4.14. FOXP3⁺ ve FOXP3⁻ hücrelerde kontrol noktası inhibitörlerinin ifadesi (A) FOXP3⁺ ve FOXP3⁻ hücrelerde KLRG1, CTLA-4 ve PD-1 ifadesinin yüzde bar grafiği gösterimi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.9. REG1A'nın Antijen Sunucu Hücrelerin Matürasyonu Üzerine Etkisi

PBMC'lerden izole edilen CD14⁺ monositler eşit miktarda pleyte dağıtıldıktan sonra dendritik hücre (DC) farklılaşma sitokinleri (GM-CSF ve IL-4) ve REG1A'nın 100 pg ve 1000 pg dozları eklenerek 4 gün polarize edildi. Ardından hücreler curdlan ve LPS ile uyarıldı. Daha sonra immatur ve mature DC'ler için Tablo 3.3 deki karışım ile yüzey boyaması yapıldı. Flow sitometri ile bu moleküllerin ifadesi analiz edildi.

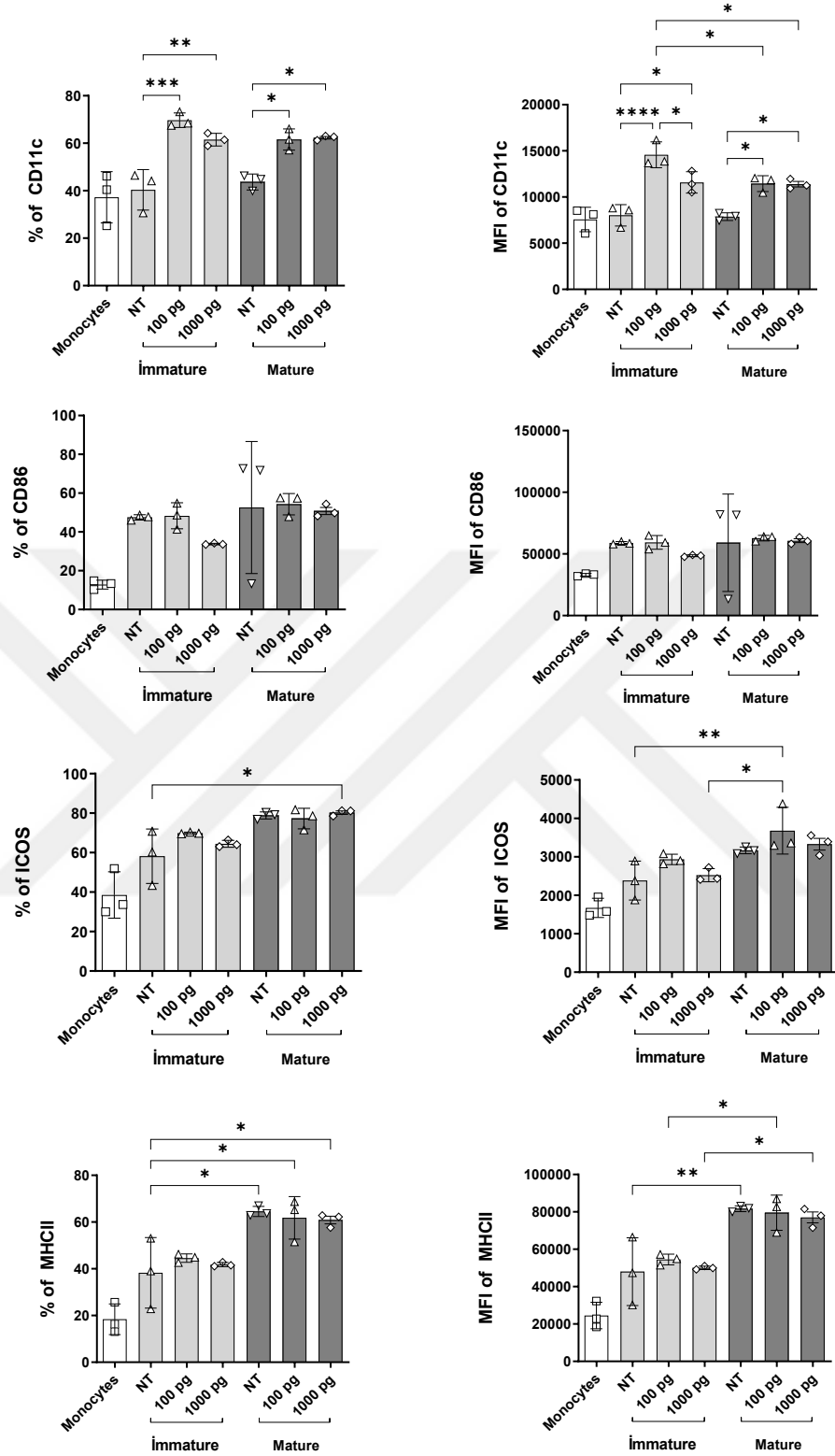
REG1A'nın 100 pg ve 1000 pg dozları CD11c yüzde ve MFI sayılarını anlamlı olarak arttırmıştır ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.005$, $p \leq 0.001$). Farklı REG1A dozları ise CD86, ICOS ve MHCII ifadesinde yüzde ve MFI olarak fark oluşturmamıştır (Şekil 4.15).

A



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında DC'lerin ifade ettiği yüzey markırlarının karşılaştırılması. (A) Dendritik hücrelerde REG1A'nın pg dozlarında CD11c, CD86, ICOS ve MHCII ifade eden hücrelerin flow kapılması.

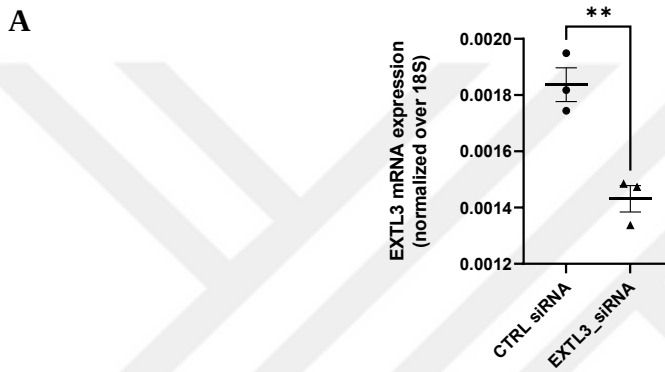
B



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda REG1A varlığında DC'lerin ifade ettiği yüzey markılarının karşılaştırılması **(B)** CD11c, CD86, ICOS ve MHCII ifadelerinin yüzde ve MFI bar grafiği gösterimi. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$ **(Devamı)**

4.10. Jurkat Hücrelerinde ve Primer Hücrelerde EXTL3 Reseptörünün Knockdownu

EXTL3 literatürde REG1A/REG3A'nın potansiyel reseptörlerinden birisi olarak ortaya atılmıştır (Shin ve ark., 2019). Jurkat hücrelerinde ve primer hücrelerde Neon® Transfection System kiti kullanılarak siRNA'lar transfekte edilerek ve susturma işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 2 gün sonra Primer hücrelerde EXTL3 reseptörünün ifadesinin azaldığı Real-Time qPCR ile doğrulandı ($p \leq 0.01$; Şekil 4.16).



Şekil 4.16. CD4⁺ T hücrelerinde tranfeksiyon ile susturma sonrası EXTL3 ifadesi azalmıştır

4.10. EXTL3 Reseptörünün Knockdownunun Proliferasyon Üzerine Etkisi

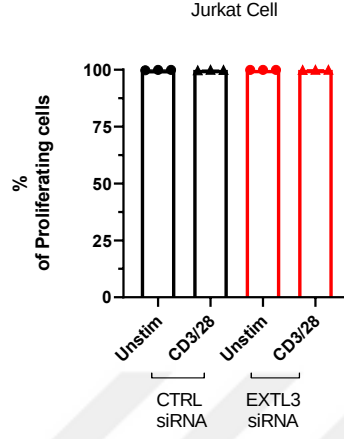
Jurkat hücrelerinde EXTL3 reseptörünün susturma işlemi gerçekleştirildikten sonra hücrelerin proliferasyon kabiliyetlerine bakıldı. 3.2.14 nolu bölümde yazılan Susturma işlemi gerçekleştirildikten 48 saat sonra hücreler sayılarak yine metod kısmında 3.2.6 nolu bölümde yazılan proliferasyon protokolü uyguladı. Jurkat hücrelerinde knockdownu hücre azlığı nedeniyle hücreler deney için kullanıldığından qPCR ile doğrulanmadı, proliferasyon deneyine geçildi. Jurkat hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu proliferasyonu etkilememiştir (Şekil 4.17).

4.11. EXTL3 Reseptörünün Knockdownunun IL-2 üretimi Üzerine Etkisi

Primer hücrelerde EXTL3 reseptörünün susturma işlemi gerçekleştirildikten sonra IL-2 üretimine bakıldı. 3.2.14 nolu bölümde yazılan susturma işlemi gerçekleştirildikten 48 saat sonra hücreler sayılarak yine metod kısmında 3.2.7 nolu

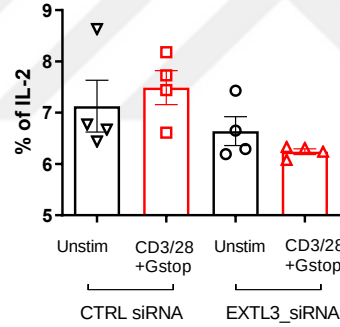
bölümde yazılan IL-2 üretimi protokolü uyguladı. CD4⁺ T hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu sonrası IL-2 üretimi bir miktar azalmıştır (Şekil 4.18).

A



Şekil 4.17. Jurkat hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu proliferasyonu etkilememiştir. **(A)**. Susturma sonrası Jurkat hücrelerinde proliferasyon yüzde bar grafiği.

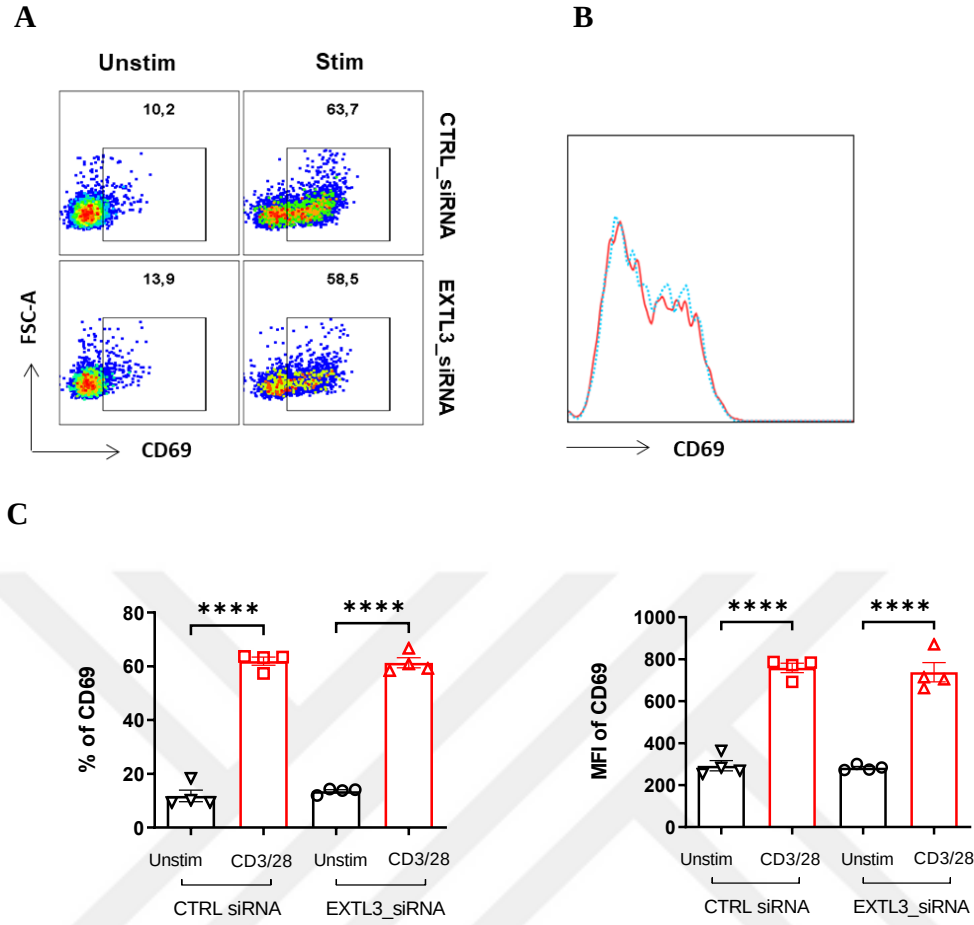
A



Şekil 4.18. CD4⁺ T hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu sonrası IL-2 üretimi bir miktar azalmıştır. **(A)** Susturma sonrası CD4⁺ T hücrelerinde IL-2 yüzde bar grafiği.

4.12. EXTL3 Reseptörünün Knockdownunun Aktivasyon Markırı CD69 Üzerine Etkisi

Primer hücrelerde EXTL3 reseptörünün susturma işlemi gerçekleştirildikten sonra CD69 aktivasyonuna bakıldı. 3.2.14 nolu bölümde yazılan susturma işlemi gerçekleştirildikten 48 saat sonra hücreler sayılarak metod kısmında 3.2.9 nolu bölümde yazılan protokol uyguladı. CD4⁺ T hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu CD69 ifadesini etkilememiştir (Şekil 4.19).

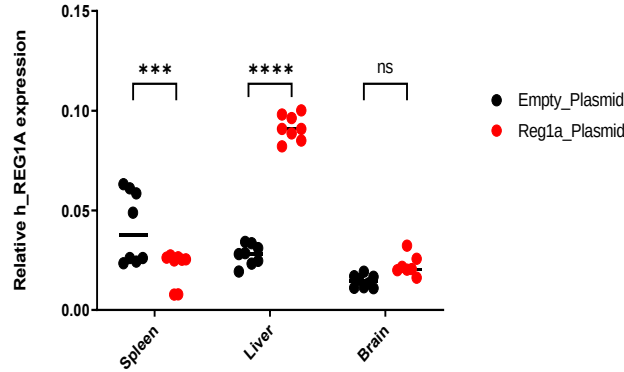


Şekil 4.19. CD4⁺ T hücrelerinde EXTL3'ün knockdownu sonrası CD69 ifadesinde fark yoktur. **(A)** Susturma sonrası CD4⁺ T hücrelerinde CD69'un flow grafiği gösterimi. **(B)** CD69'un histogram grafiği (Mavi çizgi- EXTL3_siRNA, kırmızı çizgiler-CTRL_siRNA) **(C)** Susturma sonrası CD4⁺ T hücrelerinde CD69 ifadesinin yüzde ve MFI bar grafiği. ****p≤0.001

4.13. Hidrodinamik Enjeksiyon ile Yapılan REG1A Overekspresyonunun Doğrulanması

Boş plasmid ve REG1A plasmid DNA'ları hidrodinamik enjeksiyon ile fare gruplarına 15 µg/mL olarak 2 mL volümde kuyruk veninden 10 sn içerisinde PBS içerisinde verildi (Eken ve ark., 2014; Eken ve ark., 2021). Bu yöntemle sistemik dağılan plasmid uygulanan kuvvetle hücelere girmekte ve başta karaciğer olmak üzere birçok organda eksprese edilmektedir. Reg1a overekspresyonu yapılan ve kontrol Empty plasmid enjeksiyonu yapılan farelerden 3. Gün sonunda beyin, dalak ve karaciger'den REG1A ifadesi RT-qPCR ile gen overekspresyon konfirme edildi (p≤0.005; p≤0.001) ve sonrası EAE deneylerine geçildi (Şekil 4.20).

A



Şekil 4.20. REG1A overekspresyonunun beyin, dalak ve karaciger’de RT-qPCR ile konfirme edilmesi. *** $p \leq 0.005$, **** $p \leq 0.001$

4.14. İnsan REG1A Sistemik Overekspresyonunun Naif Farelerde Çeşitli İmmün Sistem Hücrelerine Etkilerinin İncelenmesi

Bu kapsamda inflamasyon olmayan farelerde REG1A overekspresyonunun sekonder lenfoid organlarda (dalak ve lenf nod gibi) immün hücre profilini karakterize etmek amaçlanmıştır. Bu bağlamda dalak ve lenf noddan lenfositler elde edilerek;

- T hücre alt tiplerinin sayıları ve ürettiği sitokinler,
- Miyeloid hücre sayıları,
- Regülatör T hücre sayıları ve supresyon ile ilişkili yüzey markırları incelenmiş ve bu sonuçlar aşağıda paylaşılmıştır.

Naif fareler sekiz gün sonra sakrifiye edilip dalaklarından ve lenf nodlarından fiziksel yöntemle lenfositler elde edilmiştir. Bakılmak istenen hücre alt tiplerine göre yöntem bölümünde belirtilen yüzey boyama ve hücre içi boyamalar yapılarak flow sitometri ile incelenmiş ve grafikler değerlendirilmiştir.

T hücre alt tipleri ve üretilen sitokinler: Lenf nod ve dalaktaki lenfositler Tablo 3.5’de Karışım 1 ve Karışım 2’de verilen antikolar (CD4, CD8, IL-17, IL-22, IL-2, IL-10 ve IFN-g, TNF-a, GMCSF) ile boyanmış, T hücre alt tipleri ve ürettiği sitokinler incelenmiştir. Kontrol plasmidi ve REG1A Plasmidi verdiğimiz gruplarda T hücre alt tiplerini belirlemek amacıyla öncelikle CD4⁺ ve CD8⁺ olmak üzere iki ana kapılama stratejisi uygulanmıştır. Boyanan lenfositlerin kapılama stratejileri Şekil 4.21’de gösterilmiştir.

Lenf nodunda Naif REG1A Plasmid grubundaki CD4⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı oranı kontrol plasmid grubuna kıyasla azalış göstermiştir. Ayrıca mutlak sayı CD4⁺ hücre sayısındaki bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.05$; Şekil 4.21).

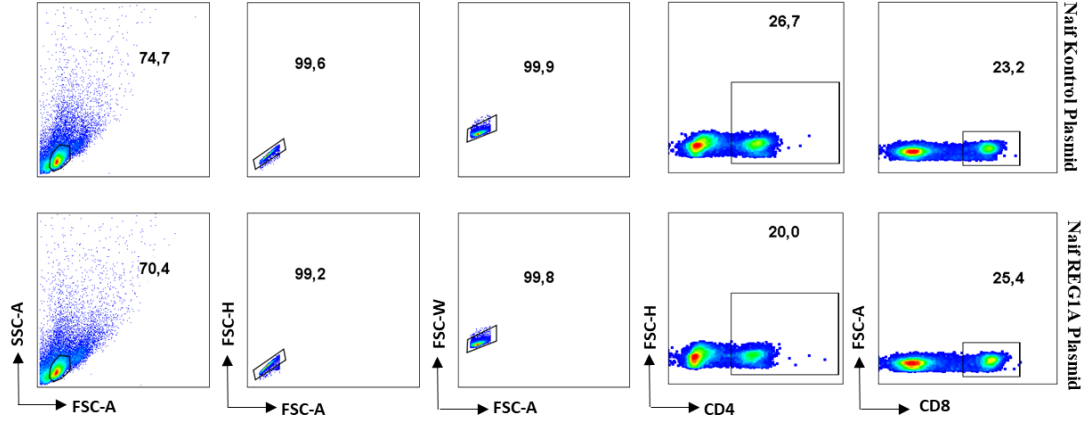
CD8⁺ hücrelerinin yüzde dağılımına baktığımızda Naif REG1A Plasmid grubunda artış olsada, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Mutlak sayılarına baktığımızda ise Naif REG1A Plasmid verdiğimiz grubu kontrol plasmid grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p \leq 0.05$; Şekil 4.21).

Lenf nodundaki sitokin üretim miktarlarını belirlemek amacıyla kontrol plasmidi ve REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda CD4⁺ ve CD8⁺ kapılaması yapılarak belirlenen T hücrelerinin IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücreler kapılandı (Şekil 4.22).

CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde IL-10⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ yüzde seviyesi kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda anlamlı bir artış göstermiştir ($p \leq 0.05$; $p \leq 0.01$; Şekil 4.22). IL-10, IFN-g, TNF-a ve GMCSF sitokinleri mutlak sayıları açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. IL-22⁺, IL-17⁺, IL-2⁺ sitokin üretim miktarlarına baktığımızda ise yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir farklılık bulunmamaktadır. Lenf nodundaki CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde IL22⁺ üretimi REG1A Plasmid grubunda yüzde olarak azalmış olsada anlamlı değildir. Mutlak sayıları değerlendirildiğinde REG1A Plasmid grubunda IL22⁺ üretimi anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0.05$; Şekil 4.23). IL17⁺ üretimi kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda yüzde olarak anlamlı bir artış gösterirken mutlak sayılarında bir fark göstermemiştir ($p < 0.05$). IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ sitokin üretim miktarlarında iki grup arasında yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir fark bulunmamaktadır.

Dalaktaki T hücre alt tiplerine baktığımızda CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin REG1A Plasmid verdiğimiz grupta kontrol plasmid grubuna kıyasla yüzde ifadelerinde anlamlı artış göstermişken ($p < 0.05$; $p < 0.01$) mutlak sayılarında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Şekil 4.24).

A



B

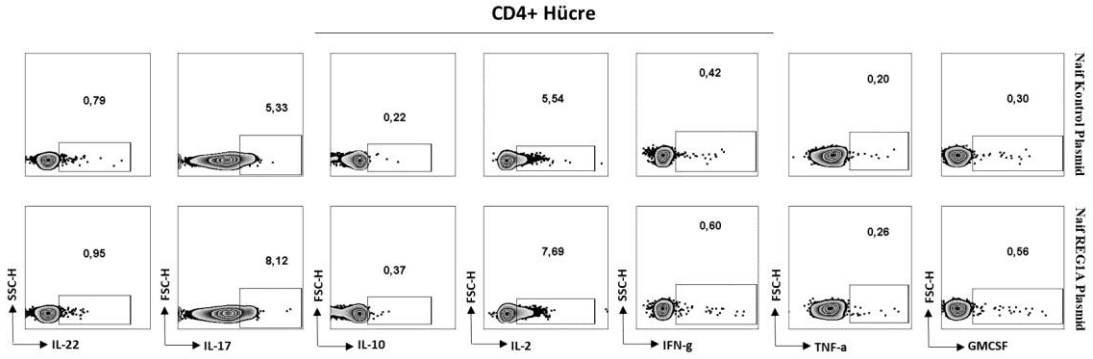


C

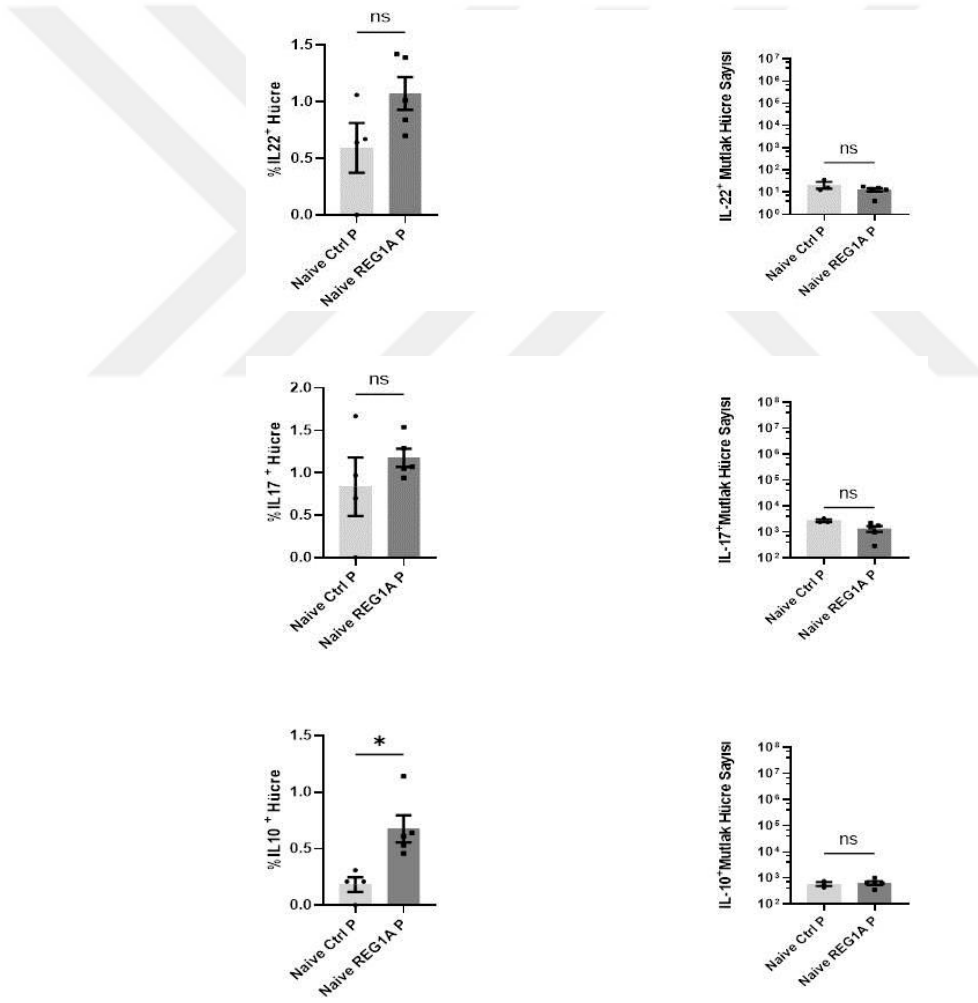


Şekil 4.21. Naif grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** T hücre alt tiplerinin kapılama stratejileri **B)** CD4⁺ T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. **C)** CD8⁺ T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05

A

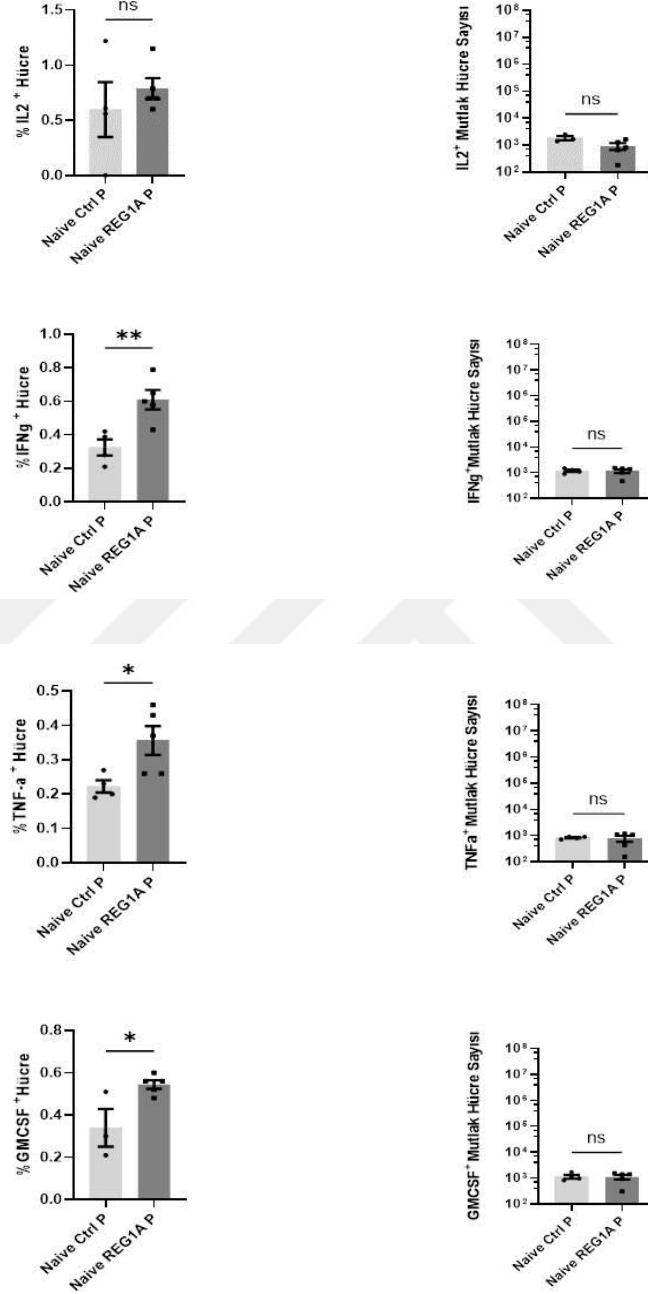


B



Şekil 4.22. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi kapılama stratejisi. **B)** IL-22⁺ , IL-17⁺ ve IL-10 hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05; ** p<0.01

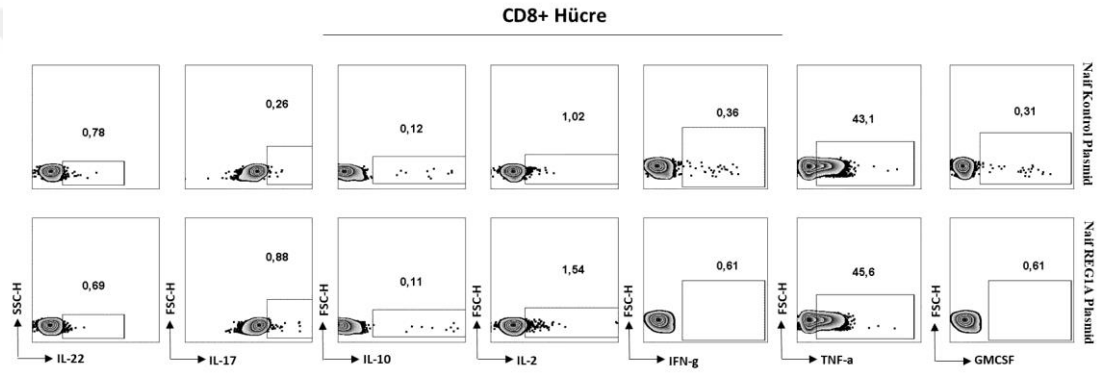
C



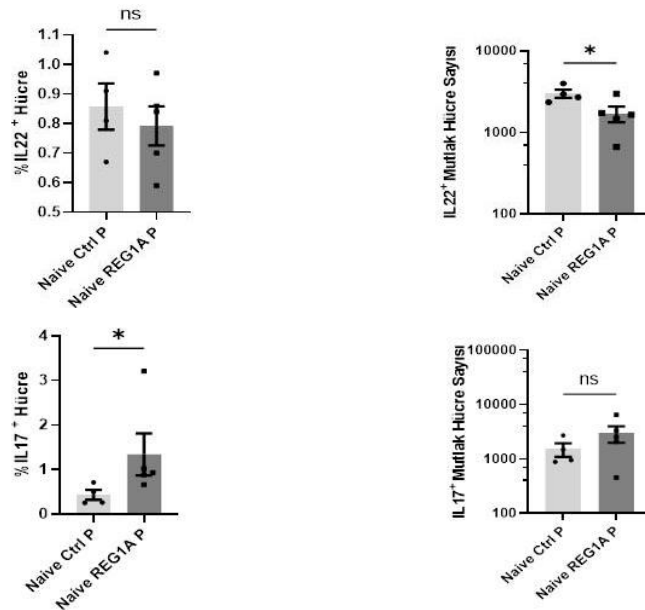
Şekil 4.22. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi **C)** IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05; ** p<0.01 (**Devamı**)

Dalaktaki sitokin üretim miktarlarını belirlemek amacıyla kontrol plasmidi ve REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda CD4⁺ ve CD8⁺ kapılaması yapılarak belirlenen T hücrelerinde IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücreler kapılandı. CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde IL-2⁺ yüzdesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda anlamlı bir azalma göstermekte iken mutlak sayısında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p<0.05; Şekil 4.25). IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ sitokin üretim miktarlarında iki grup arasında yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir fark bulunmamaktadır.

A

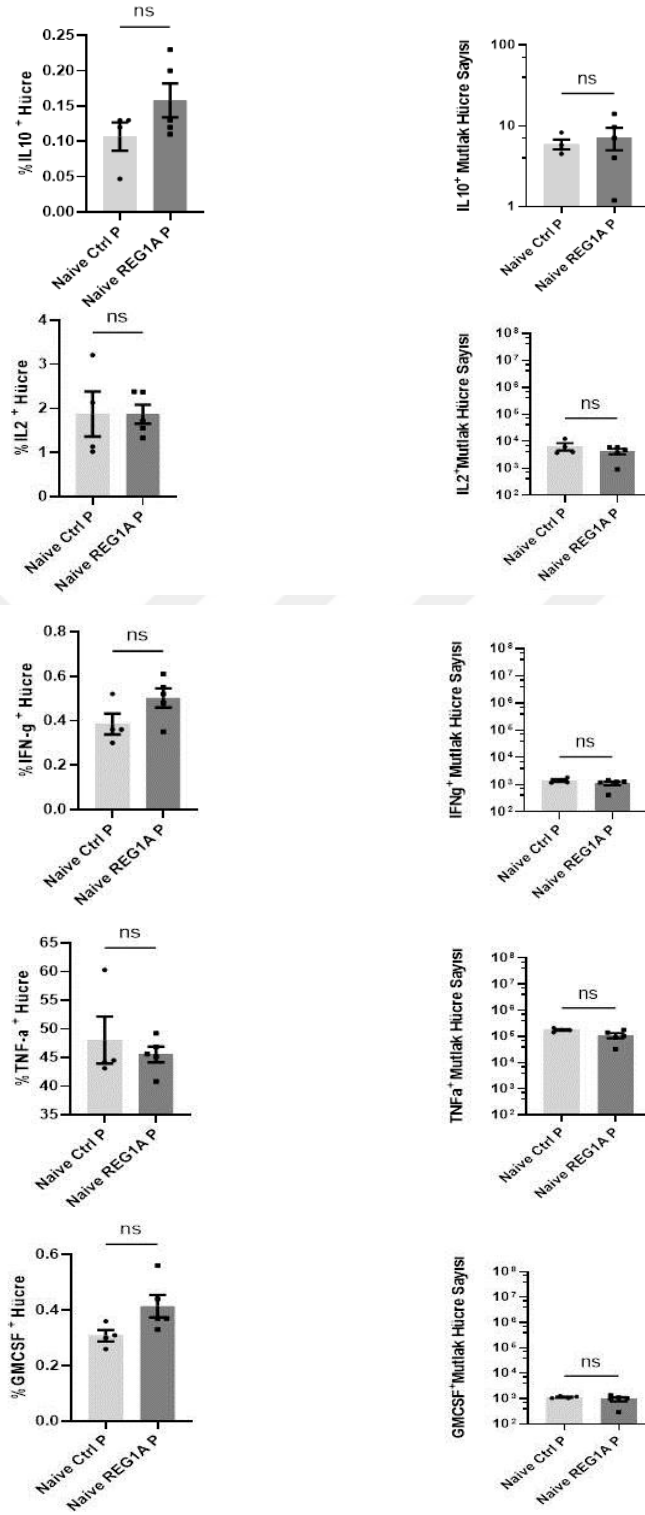


B



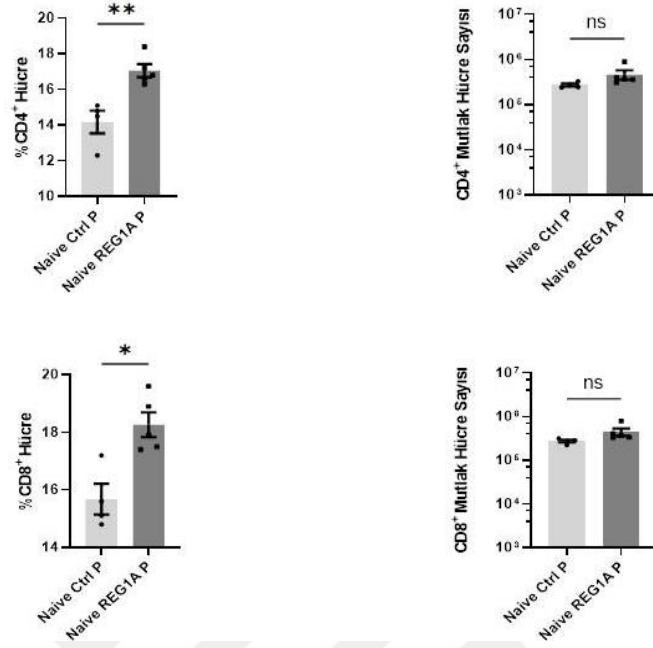
Şekil 4.23. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi kapılama stratejisi. **B)** IL-22⁺, IL-17⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05

C



Şekil 4.23. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **C)** IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-γ⁺, TNF-α⁺ ve GM-CSF⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri (**Devamı**)

A



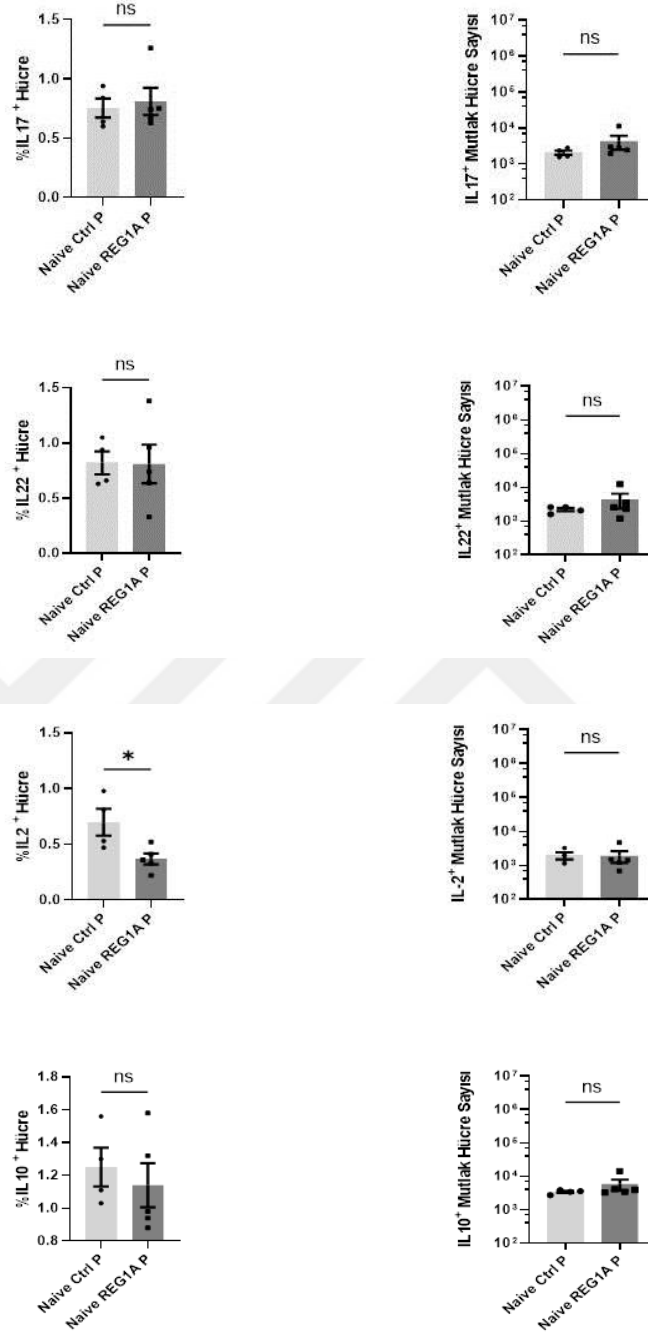
Şekil 4.24. Naif grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** CD4⁺ ve CD8⁺T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05; ** p<0.01

Dalakta CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde IL-2⁺ ve TNF-a yüzdesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda anlamlı bir azalma göstermiştir (p<0.05; Şekil 4.26). Mutlak sayılarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IFN-g⁺ ve GM-CSF⁺ sitokin üretim miktarlarında iki grup arasında yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir fark bulunmamaktadır.

Miyeloid Hücreler: Lenf nod ve dalaktaki miyeloid hücreleri belirlemek amacıyla Tablo 3.5'de Karışım 5'de verilen yüzey markırları olan CD11b ve CD11c antikorları ile yüzey boyama yapılmıştır. Miyeloid linyeç hücrelerin kapılamaları Şekil 4.27 da verilmiştir.

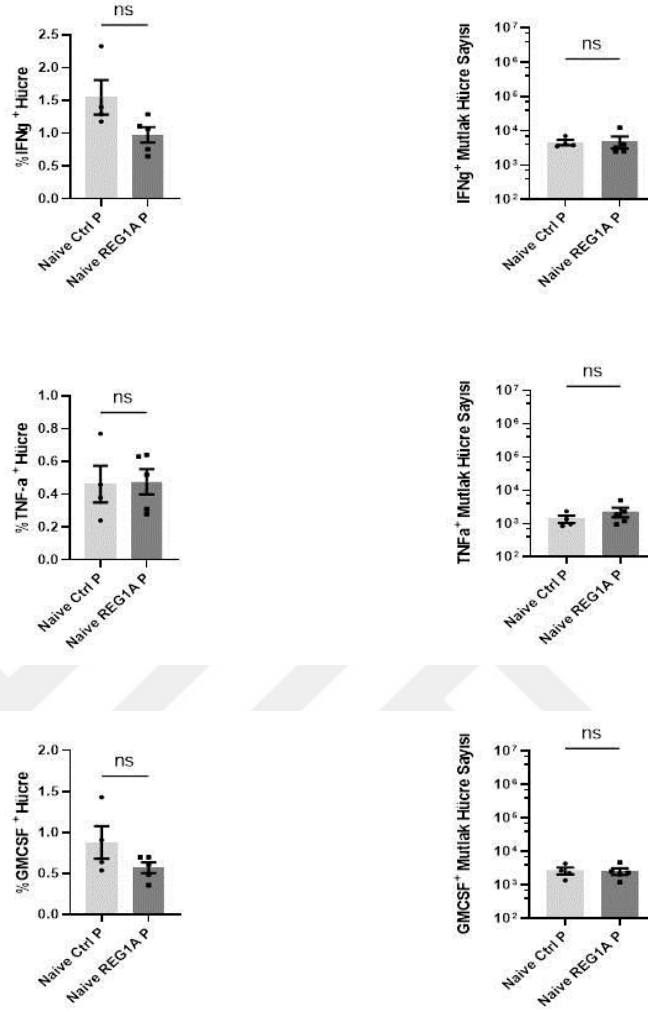
Naif farelerde lenf nodlarda CD11b⁺ ve CD11c⁺'nin yüzde ifadesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda artış göstermiştir ancak anlamlı değildir. Mutlak sayılarında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.27).

A



Şekil 4.25. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05

B

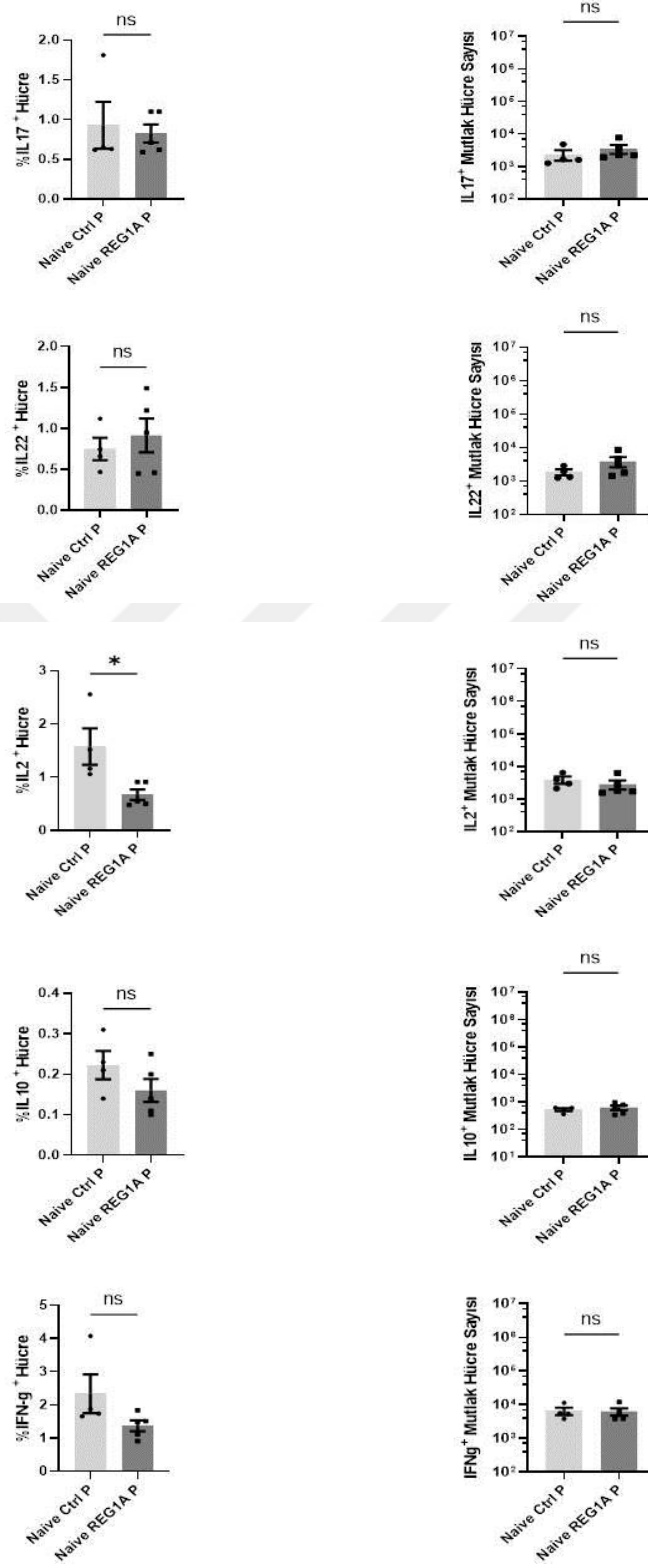


Şekil 4.25. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **B)** IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ ve GM-CSF⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri (**Devamı**)

Naif farelerde dalakta yüzde CD11b⁺ ifadelerine baktığımızda kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda azalma gözlenmiştir ancak anlamlı değildir (Şekil 4.28). Mutlak sayılarında ise farklılık gözlenmemiştir. CD11c ifadesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda yüzde olarak artmış ve anlamlı değilken mutlak sayılarındaki artış anlamlıdır ($p < 0.05$; Şekil 4.27).

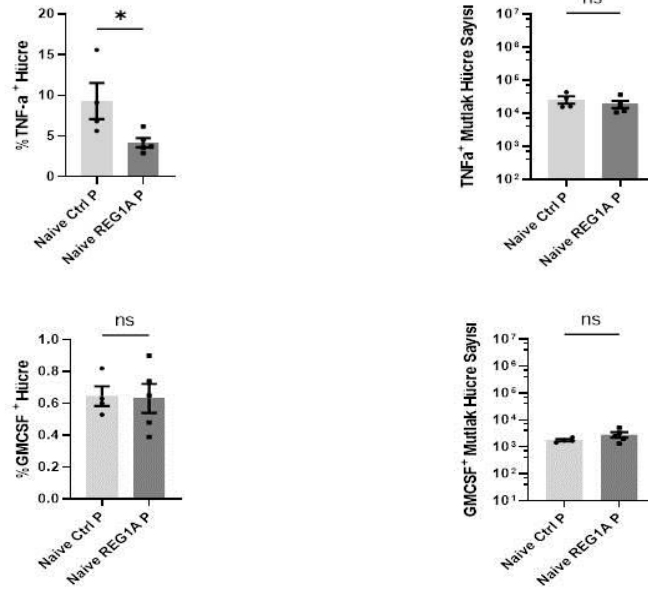
Treg hücreleri ve kontrol noktası inhibitörleri: Lenf nod ve dalaktaki lenfositler Tablo 3.5’de Karışım 3 ve Karışım 4’de verilen antikorlar ile ayrı ayrı boyanmış Treg hücreleri ve kontrol noktası inhibitörleri incelenmiştir.

A



Şekil 4.26. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05

B



Şekil 4.26. Naif grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **B)** TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05 (**Devamı**)

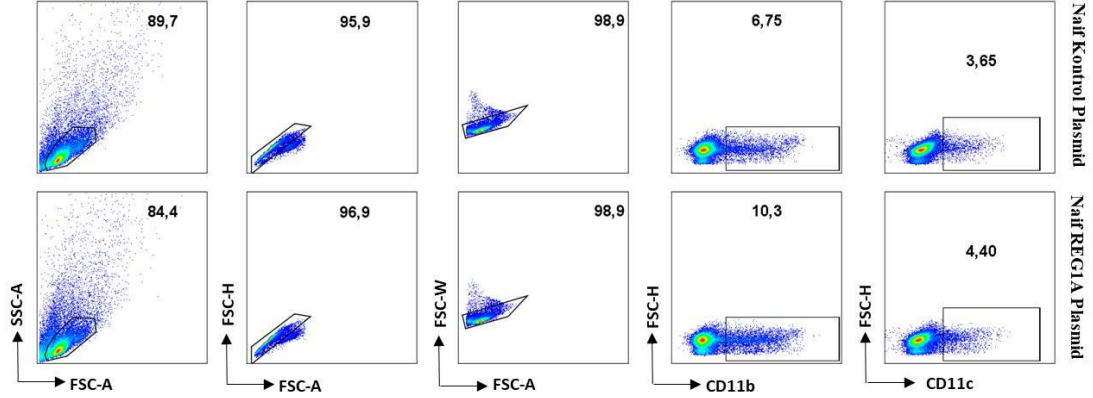
Kontrol plasmidi ve REG1A Plasmidi verdiğimiz gruplarda Treg hücrelerini belirlemek amacıyla CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ hücreler kapılanmıştır. Ayrıca CD4⁺FOXP3⁺ ve CD4⁺FOXP3⁻ populasyonları içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ olmak üzere iki ayrı kapılama gerçekleştirilmiştir.

Naif farelerde lenf nodunda FOXP3⁺ hücrelerin yüzdeleri kontrol plasmidi ile REG1A Plasmidi verdiğimiz gruplar arasında karşılaştırılmıştır. REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta FOXP3⁺ hücreler yüzde olarak anlamlı bir artış göstermiştir (p≤0.01; Şekil 4.29). Ayrıca REG1A'nın overekspresyonu FOXP3⁺ hücrelerin mutlak sayısını da arttırmıştır ancak anlamlı değildir. REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta FOXP3⁺ hücrelerin MFI miktarında ise anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p≤0.05). Lenf nodunda CD25⁺ hücrelerinin yüzde değerlerine baktığımızda REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta artış gözlenmiş ancak anlamlı değildir. MFI ve mutlak sayılarında ise gruplar arasında bir fark gözlenmemiştir.

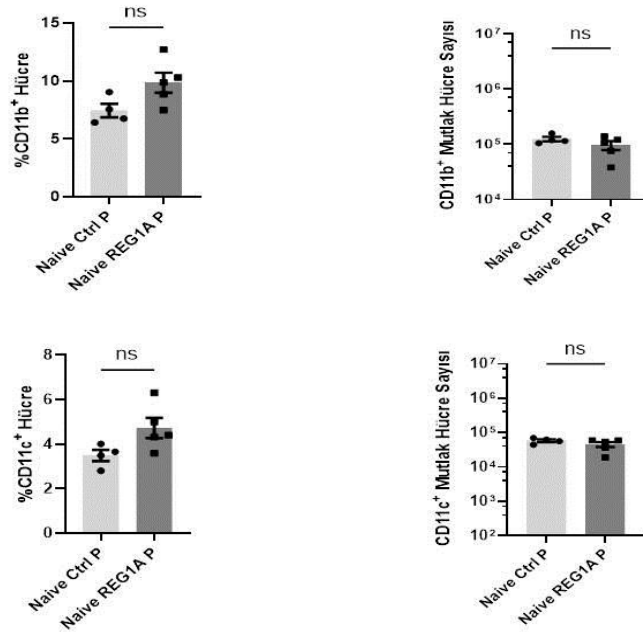
Lenf nodunda CD4⁺FOXP3⁺ ve CD4⁺FOXP3⁻ populasyonları içinden immün checkpoint ifadelerine bakılmış yüzde ve MFI değerleri incelenmiştir. Kontrole

kıyasla REG1A Plasmid grubunda $CD4^+FOXP3^+$ hücre popülasyonunda $ICOS^+$, $KLRG1^+$, $PD1^+$ yüzde ifadeleri artmış ancak anlamlı değildir. MFI değerlerine baktığımızda REG1A Plasmid grubunda $ICOS^+$ hücrelerde anlamlı bir azalma olduğu belirlenmişken $KLRG1^+$, $PD1^+$ hücrelerde önemli bir fark yoktur ($p \leq 0.0$; Şekil 4.30).

A

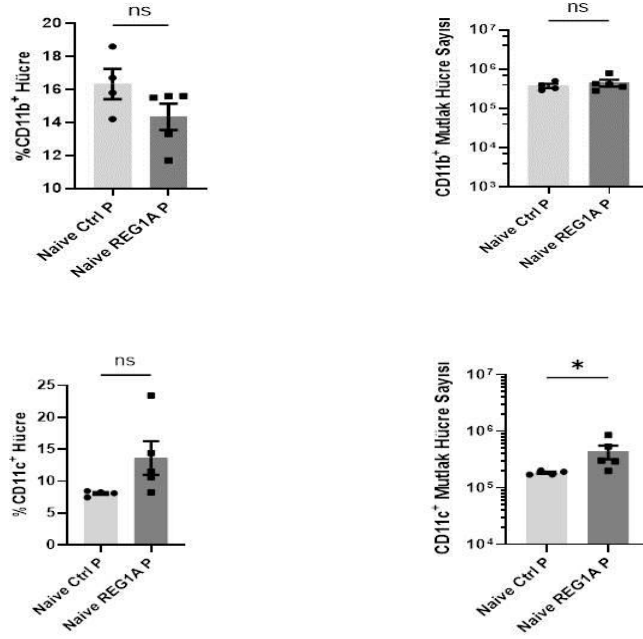


B



Şekil 4.27. Naif grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin lenf nodda incelenmesi. **A)** Miyeloid linyeç hücrelerin kapılama stratejisi **B)** CD11b ve CD11c⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri.

A



Şekil 4.28. Naif grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** CD11b ve CD11c⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05

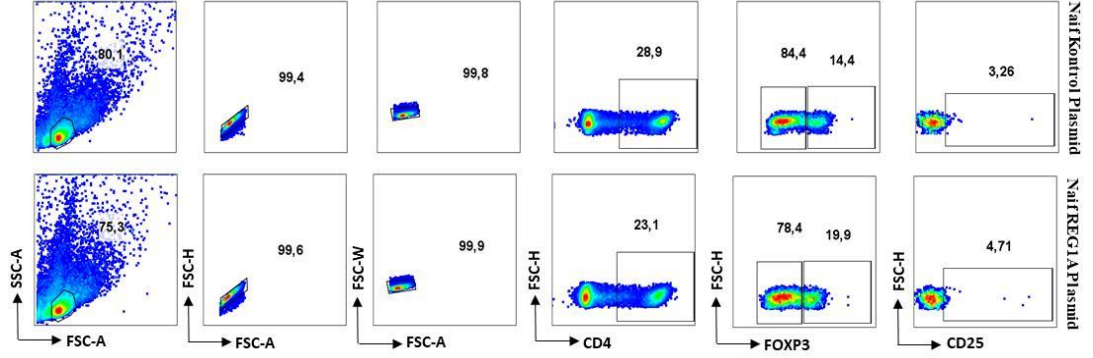
Kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda CD4⁺FOXP3⁻ hücre popülasyonunda ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerde yüzde ve MFI sayılarında ise gruplar arasında bir fark bulunmamaktadır (Şekil 4.31).

Naif grupta dalakta CD4⁺FOXP3⁺ hücre popülasyonunda REG1A Plasmid grubunda ICOS⁺ hücrelerde MFI miktarları anlamlı azalmıştır (p≤0.05; Şekil 4.32). KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerde yüzde ve MFI miktarlarında önemli bir fark yoktur.

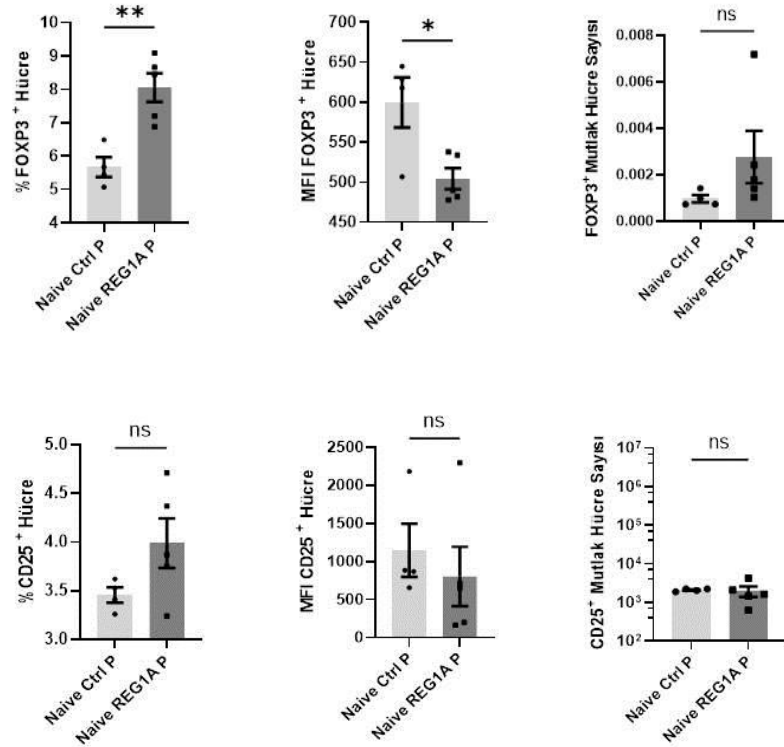
Kontrole kıyasla REG1A plasmid grubunda CD4⁺FOXP3⁻ hücre popülasyonunda ICOS⁺ hücrelerde yüzde ve MFI sayılarında gruplar arasında bir fark bulunmamaktadır. KLRG1⁺ MFI değeri kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A plasmid grubunda anlamlı bir artış göstermiştir (p ≤0.01; Şekil 4.33). PD1⁺ hücrelerin REG1A plasmid grubunda yüzde ifadesi anlamlı olarak artmışken (p≤0.05), MFI miktarındaki artma anlamlı değildi.

Naif farelerde dalakta FOXP3⁺ hücrelerin yüzde ve MFI değerleri kontrol plasmidi ile karşılaştırıldığında REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta azalmıştır ancak anlamlı değildir. Mutlak sayılarında ise gruplar arasında bir fark gözlenmemiştir.

A

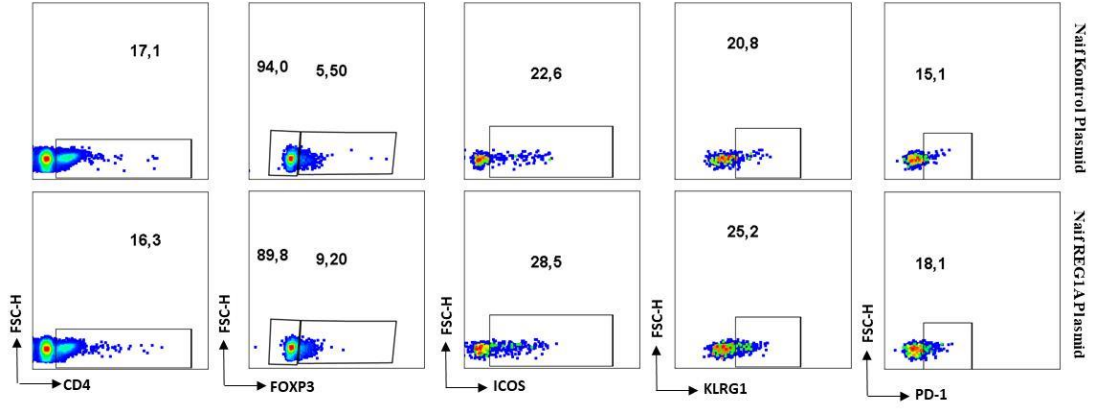


B

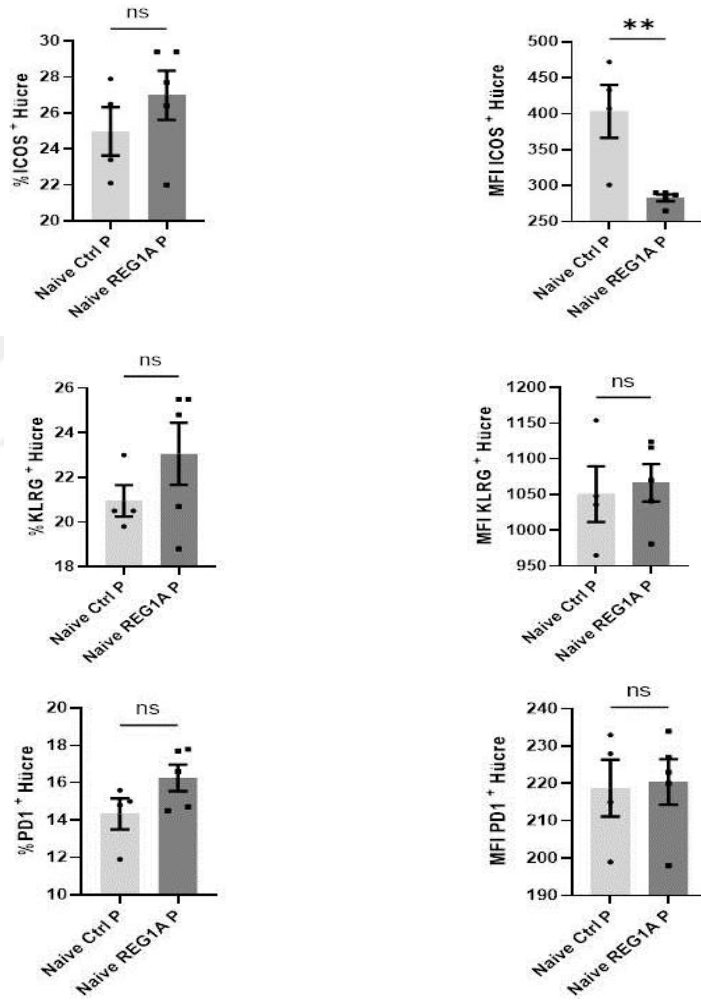


Şekil 4.29. Naif grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ hücrelerin kapılama stratejileri **B)** FOXP3⁺ ve CD25⁺ hücrelerinin yüzde, MFI ve mutlak sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

A



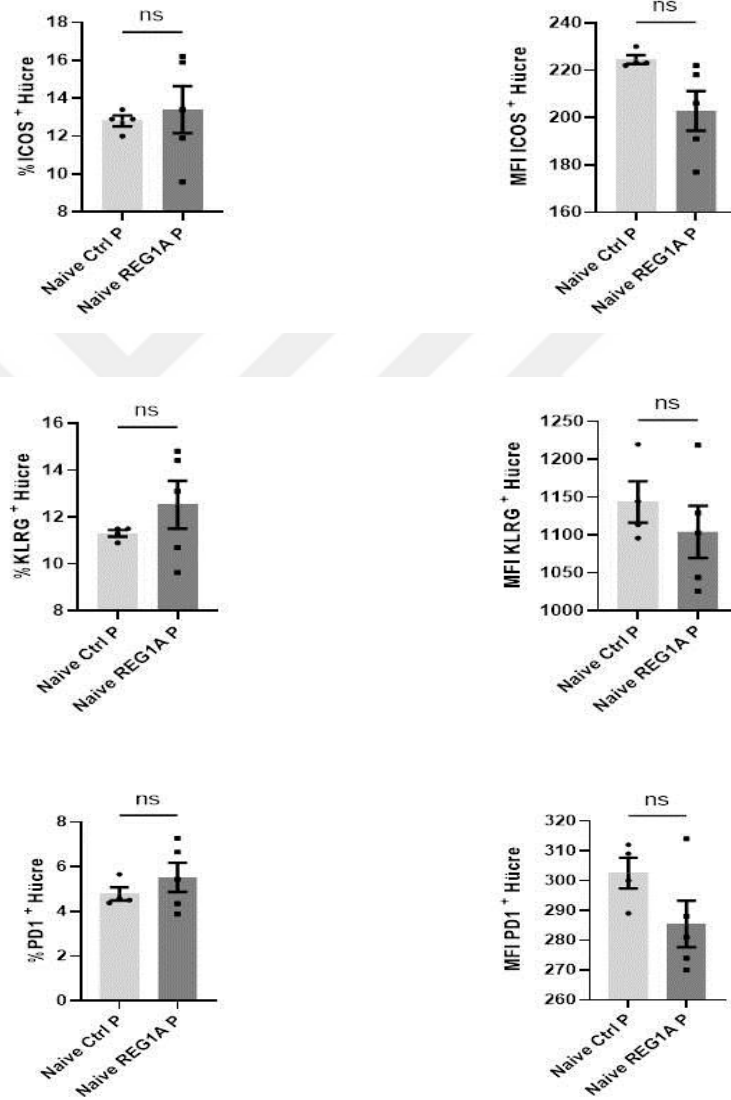
B



Şekil 4.30. Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin kapılama stratejisi **B)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. ** p ≤ 0.01

Dalakta CD25⁺ hücrelerinin yüzde değerlerine baktığımızda REG1A plasmidi verdiğimiz grupta anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0.05$; Şekil 4.34). MFI değeri REG1A plasmidi verdiğimiz grupta bir miktar azalmış olmasına rağmen anlamlı değildir.

A

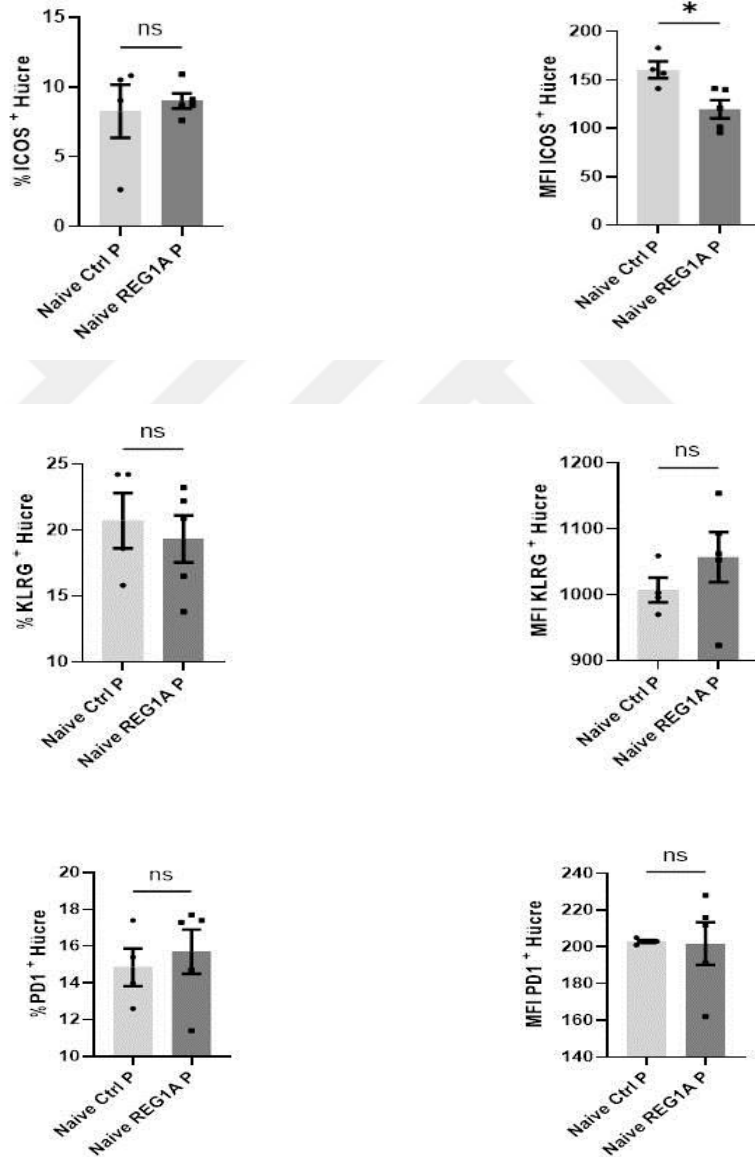


Şekil 4.31. Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri.

4.15. REG1A'nın Overekspresyonunun DOE Klinik Skorlama, İnsidans ve Vücut Ağırlığına Etkisi

İnsan REG1A plasmidi ve Empty (boş) plasmidinin farelere enjeksiyonundan 1 gün sonra her iki grupta DOE modeli oluşturuldu. Empty (boş) plasmidinin verildiği grup kontrol grubu olarak kullanılmıştır

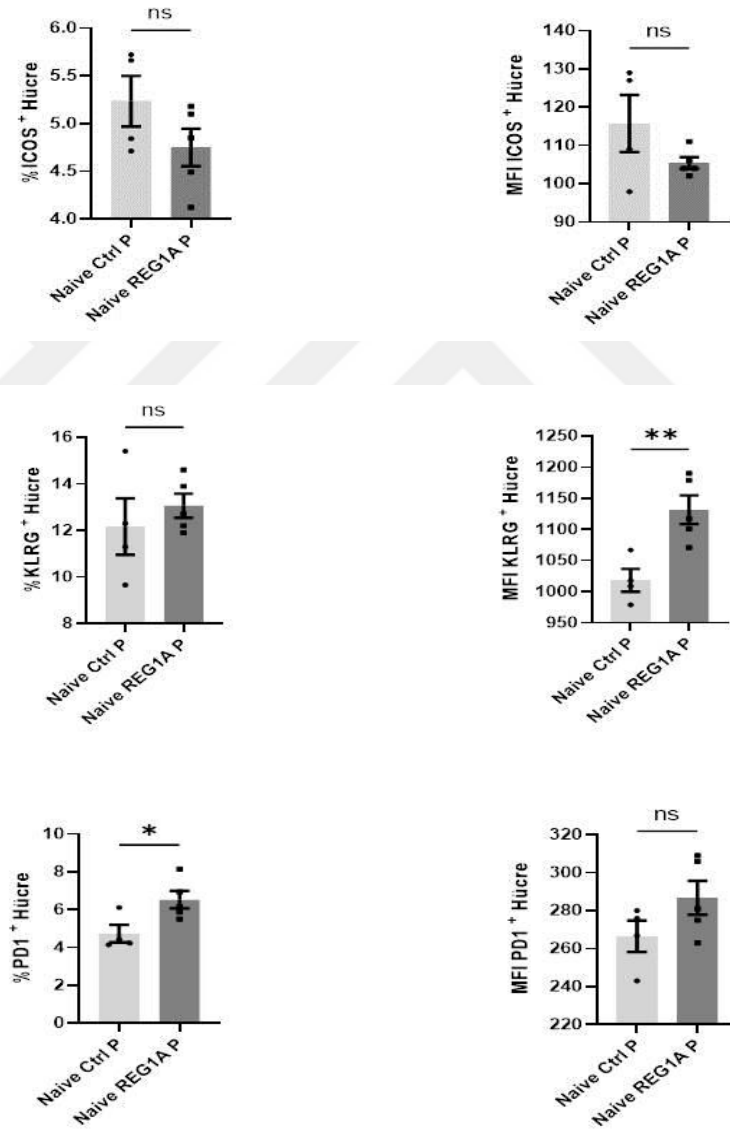
A



Şekil 4.32. Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$

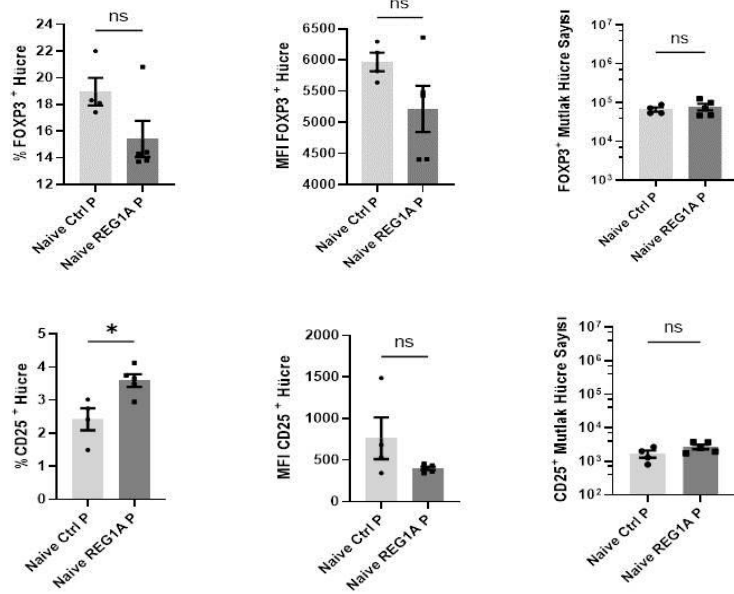
Bu çalışmada DOE Klinik skor grafiğine göre REG1A plasmidi verilen grupta hastalık daha geç başlamış ve skorlar Emtı plasmid verdiğimiz gruba göre daha düşüktür. Ayrıca REG1A plasmidi verilen grupta hastalığın sonlarına doğru skorlar düşmüş ve iyileşme gözlenmiştir. Eğri altında kalan alan hesaplandığında özellikle REG1A plasmidi verilen grupta anlamlı bir azalma vardır ($p \leq 0.05$; Şekil 4.35). DOE insidansı REG1A plasmidi verilen grupta da kontrol grubuna göre düşüktür

A



Şekil 4.33. Naif grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

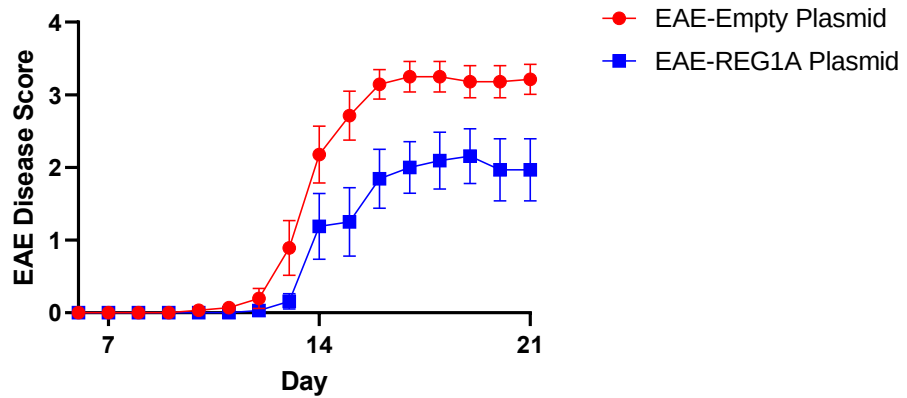
A



Şekil 4.34. Naif grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ ve CD25⁺ hücrelerinin yüzde, MFI ve mutlak sayı grafikleri. * p ≤ 0.05

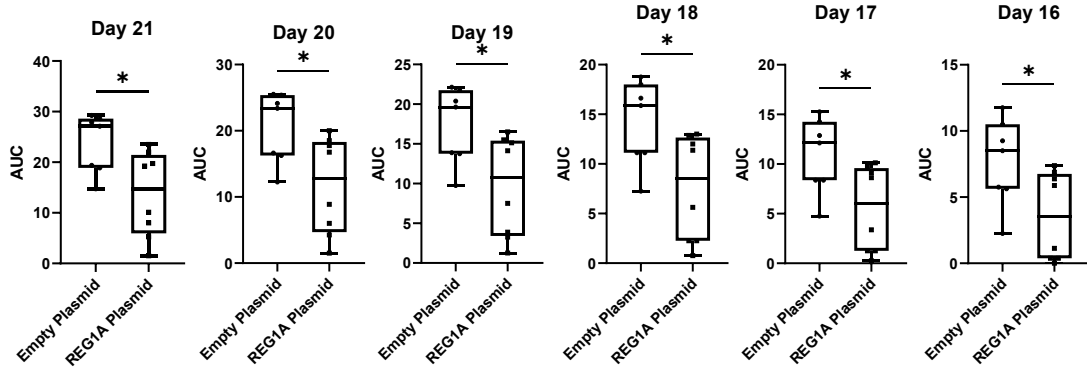
DOE grupları arasında ağırlık kaybını karşılaştırdığımızda ise REG1A plasmid uygulaması yaptığımız grupta ağırlık kaybı daha azdır. Bu durum bize REG1A plasmid uygulamasının vücut ağırlığı üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

A

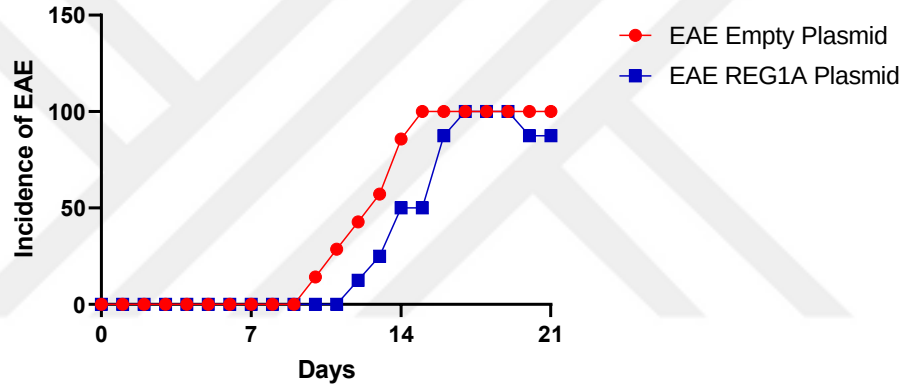


Şekil 4.35. REG1A Plasmid uygulaması DOE klinik skorlamaları Empty plasmid-kontrol grubuna göre azaltmıştır. İnsidans ve ağırlık kaybı bu grupta daha azdır **(A)** DOE Skorlaması sonucu oluşan klinik skor grafiği.

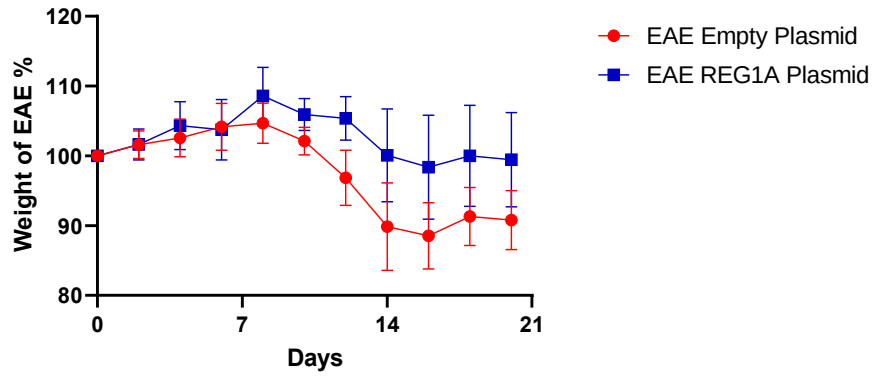
B



C



D



Şekil 4.35. REG1A Plasmid uygulaması DOE klinik skorlamaları Empty plasmid-kontrol grubuna göre azaltmıştır. İnsidans ve ağırlık kaybı bu grupta daha azdır **(B)** DOE Skorlaması sonucu oluşan eğri altında kalan alan hesaplamaları **(C)** DOE grupları arasında hastalığın görülme sıklığı **(D)** DOE grupları arasında kilo kaybı.* $p \leq 0.05$ **(Devamı)**

İmmünizasyondan sonra hastalığın en şiddetli döneminde 23. gün Reg1A overekspresyonunun MSS’de ve periferde immün hücre supsetlerine etkisini incelemek amacıyla fareler sakrifiye edilmiştir. Beyin, dalak ve lenf nodlardan fiziksel yöntemle lenfositler elde edilmiştir. Bakılmak istenen hücre alt tiplerine göre yöntem bölümünde belirtilen yüzey boyama ve hücre içi boyamalar yapılarak flow sitometri ile incelenmiş ve grafikler değerlendirilmiştir. MSS’ne infiltre olan immün hücre profili ve periferde sekonder lenfoid organlardaki (lenf nod ve dalak) immün hücre profili ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.16. İnsan REG1A Sistemik Overekspresyonunun DOE Farelerde MSS’ de İmmün Sistem Hücrelerine Etkilerinin İncelenmesi

T hücre alt tipleri ve üretilen sitokinler: Beyinde lenfositler Tablo 3.5’de Karışım 1 ve Karışım 2’de verilen antikolar (CD4, CD8, IL-17, IL-22, IL-2, IL-10 ve IFN-g, TNF-a, GMCSF) ile boyanmış, T hücre alt tipleri ve ürettiği sitokinler incelenmiştir. Empty plasmidi (kontrol grubu) ve REG1A Plasmidi verdiğimiz gruplarda T hücre alt tiplerini belirlemek amacıyla öncelikle CD4⁺ ve CD8⁺ olmak üzere iki ana kapılama stratejisi uygulanmıştır. Boyanan lenfositlerin kapılama stratejileri Şekil 4.36’da gösterilmiştir.

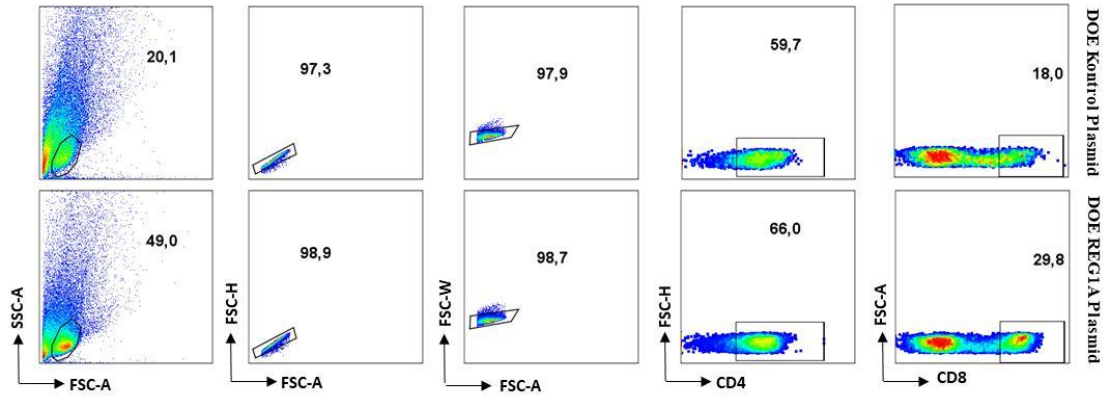
Beyinde DOE REG1A plasmid grubundaki CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerin yüzde ifadesi artmış ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerin mutlak sayılarında fark görülmemiştir.

DOE gupta beyindeki sitokin üretim miktarlarını belirlemek amacıyla kontrol plasmidi ve REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda CD4⁺ ve CD8⁺ kapılaması yapılarak belirlenen T hücrelerinin IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücreler kapılandı (Şekil 4.36).

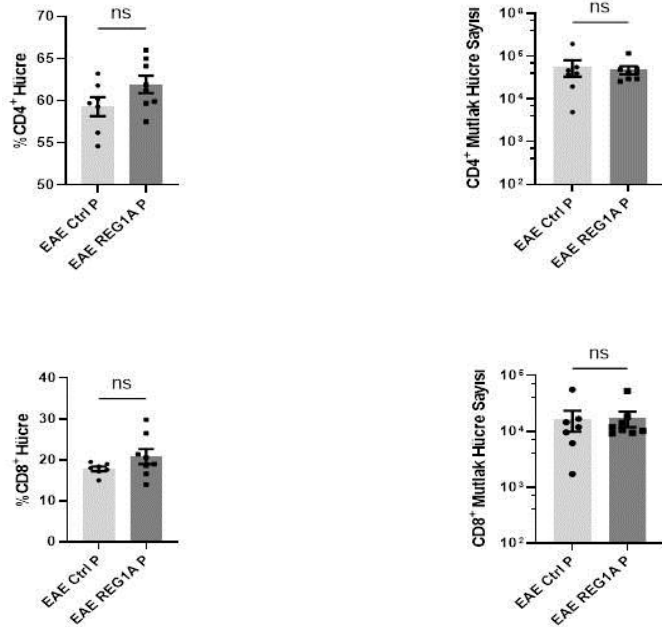
DOE gupta beyindeki CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda IL-22⁺, IL-17⁺, IL-2⁺ ve IFN-g⁺ yüzde ifadesi bir miktar artış göstermiş (Şekil 4.37), IL-10⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ yüzde ifadesi bir miktar azalmıştır ancak anlamlı değildir. Mutlak sayılarında önemli bir farklılık bulunmamaktadır.

DOE gupta beyindeki CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺ ve IL-2⁺ yüzde ifadesi bir miktar artış göstermiştir (Şekil 4.38). TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ yüzde ifadesi bir miktar azalmıştır ancak anlamlı değildir. Mutlak sayılarında önemli bir fark bulunmamaktadır.

A

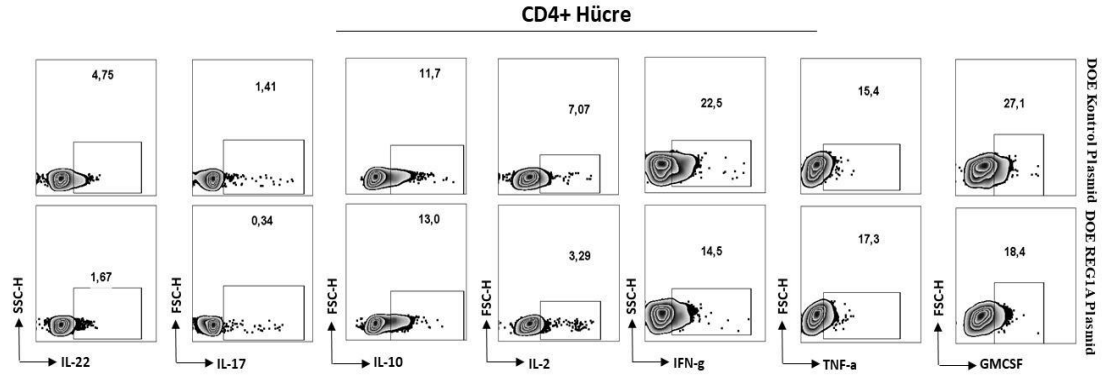


B

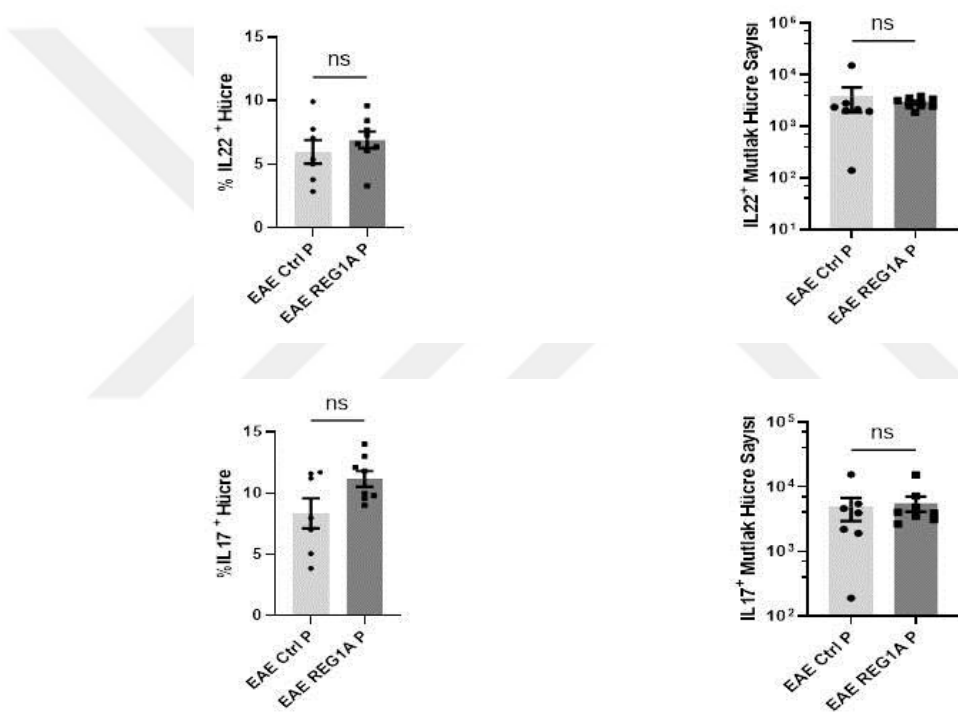


Şekil 4.36. DOE grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** T hücre alt tiplerinin kapılama stratejileri. **B)** CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri

A

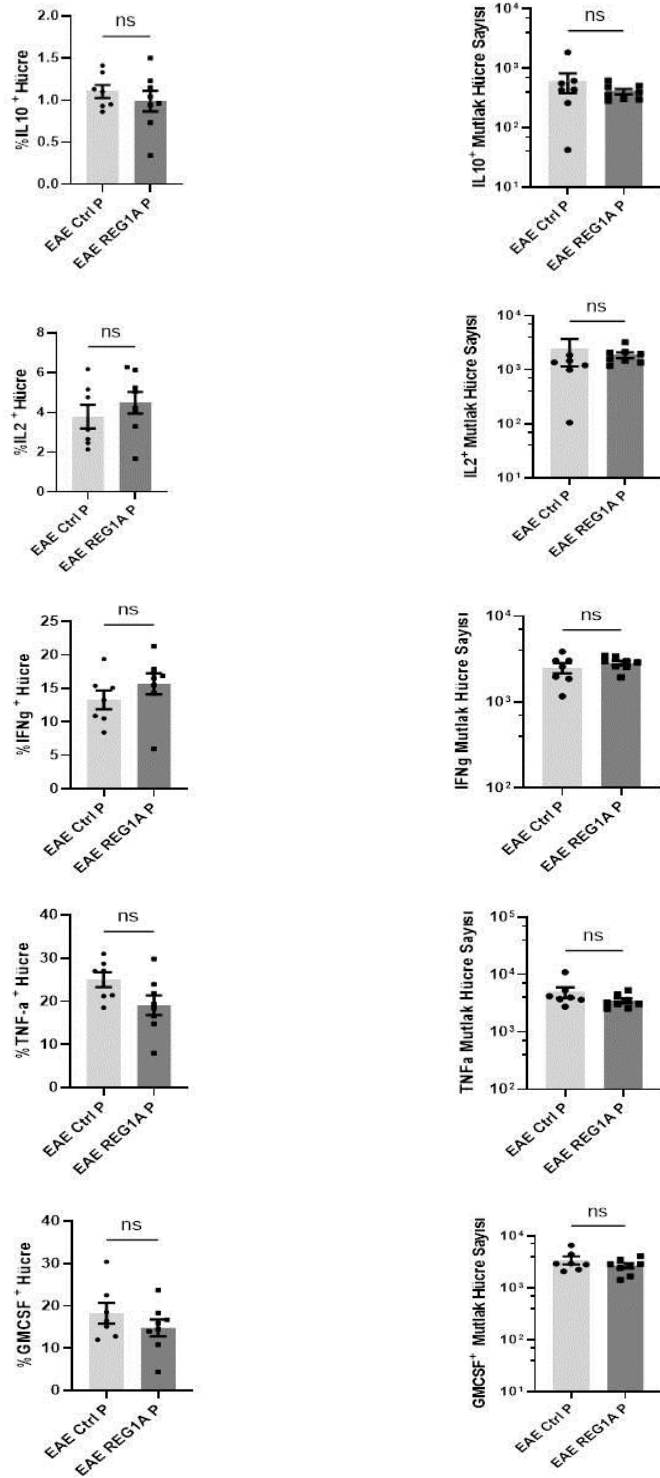


B



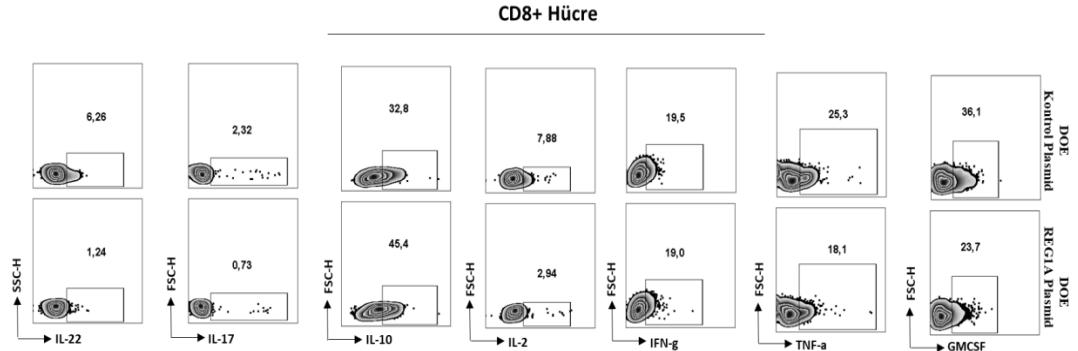
Şekil 4.37. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi kapılama stratejisi. **B)** IL-22⁺, IL-17⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri

C

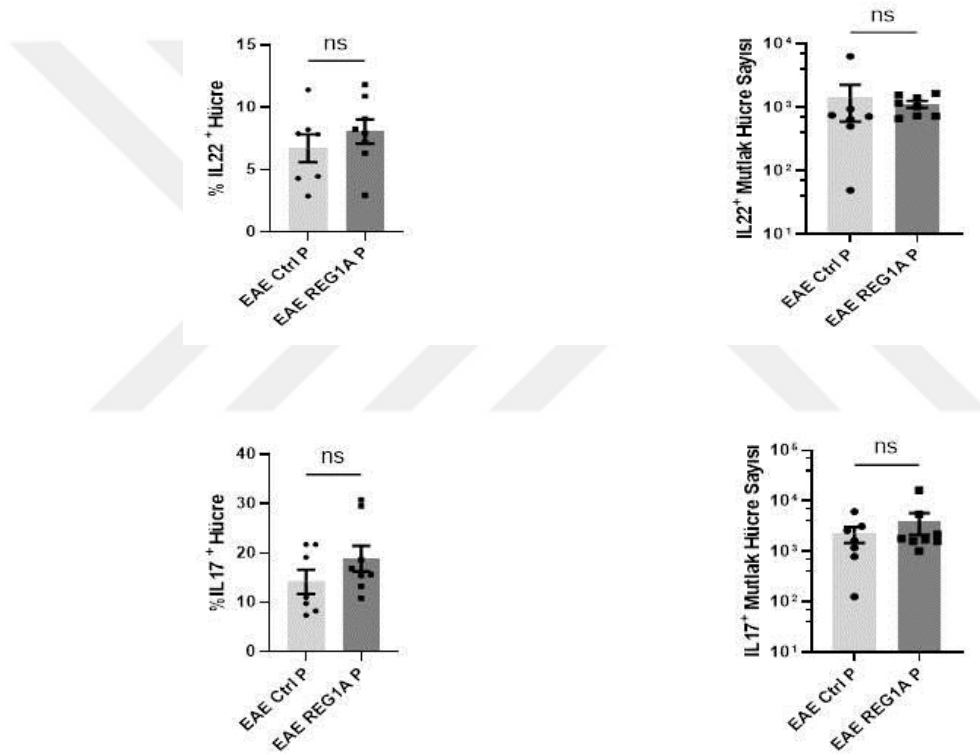


Şekil 4.37. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **C)** IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri **Devamı)**

A

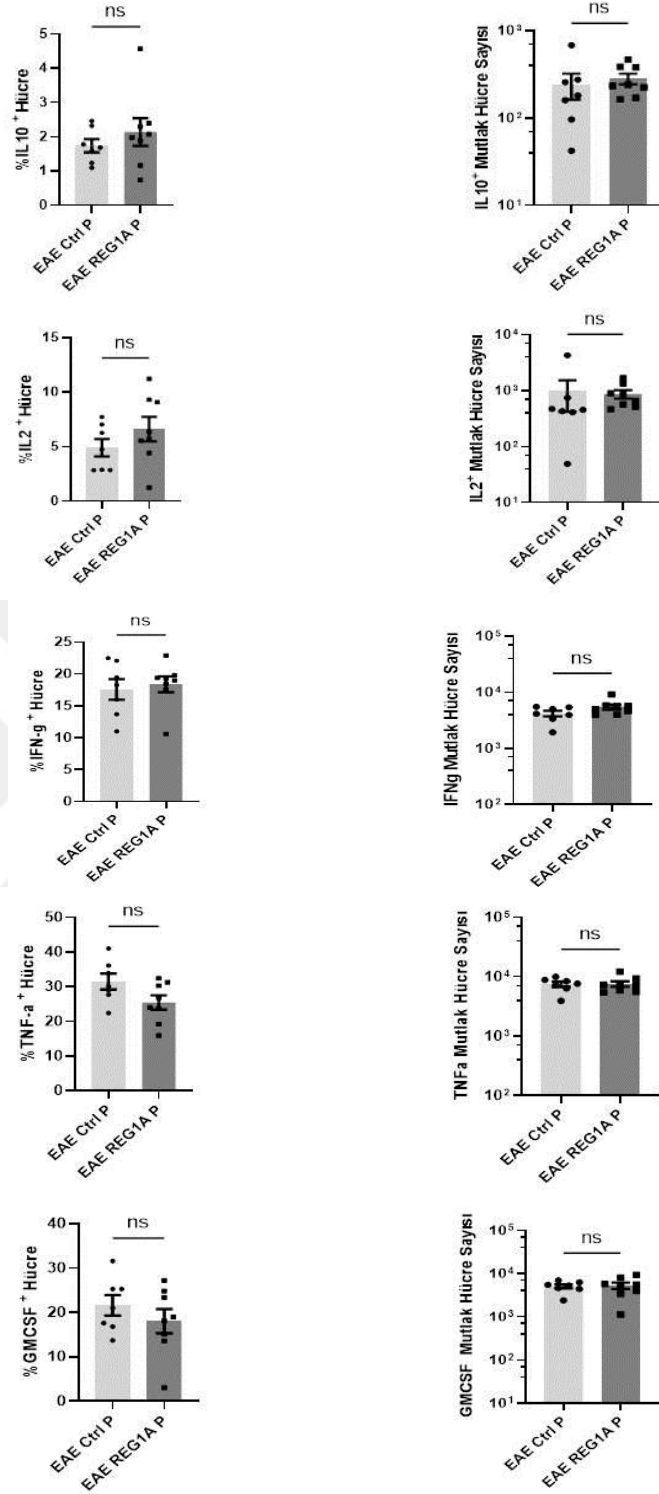


B



Şekil 4.38. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi kapılama stratejisi. **B)** IL-22⁺ , IL-17⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri

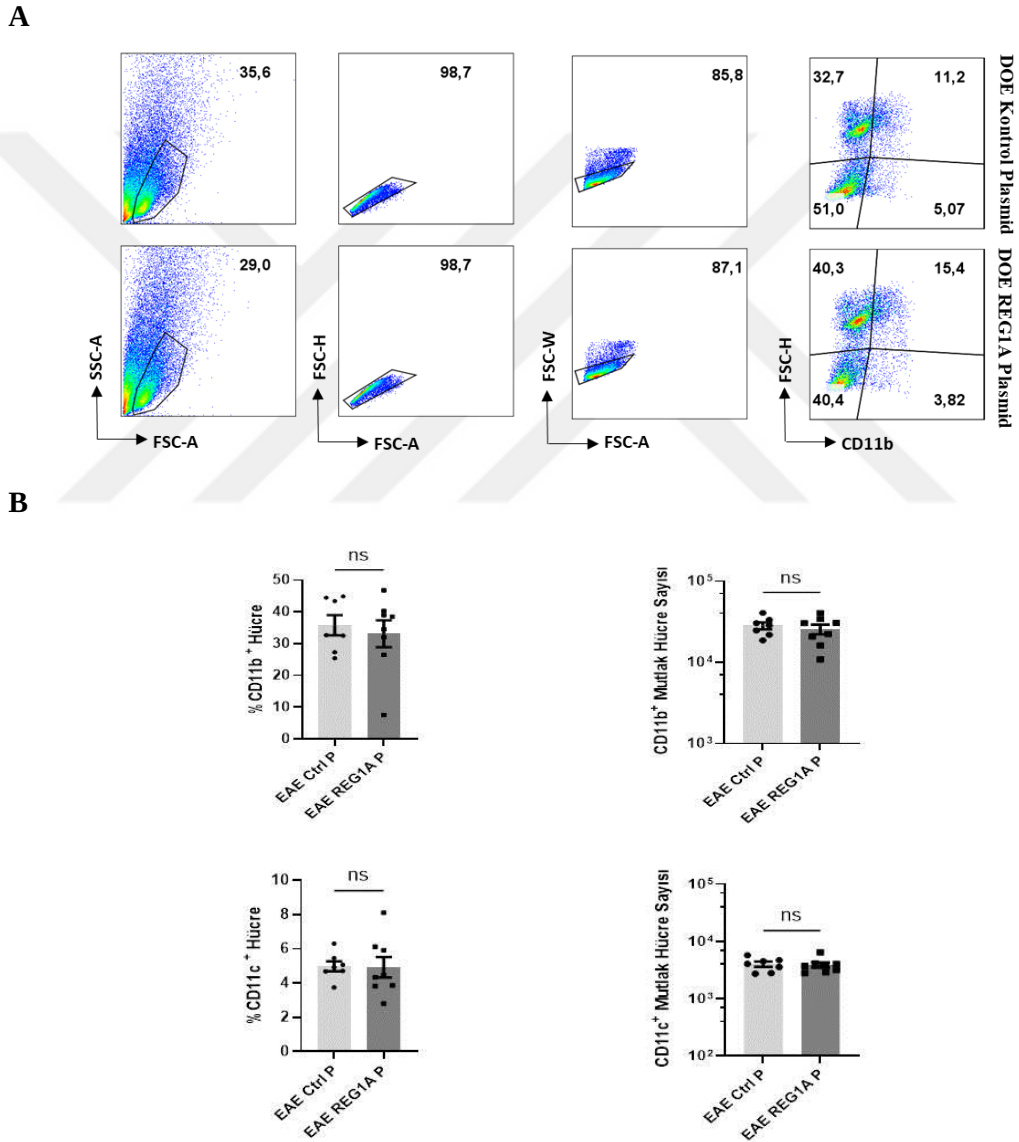
C



Şekil 4.38. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **C)** IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri (**Devamı**)

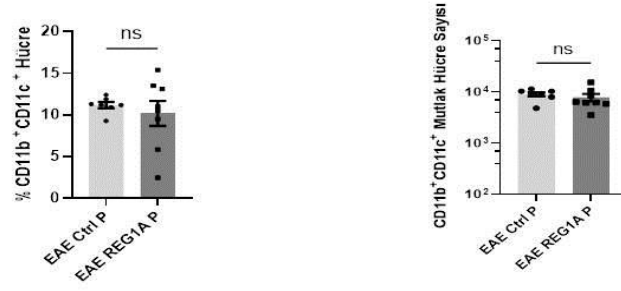
Miyeloid Hücreler: DOE gupta beyindeki miyeloid hücreleri belirlemek amacıyla Tablo 3.5’de Karışım 5’de verilen yüzey markırları olan CD11b ve CD11c antikorları ile yüzey boyama yapılmıştır. Miyeloid linyeç hücrelerin kapılamaları Şekil 4.39’de verilmiştir.

DOE gupta beyindeki CD11b⁺ ve CD11c⁺’nin yüzde ve mutlak sayı miktarları kontrol plasmid ve REG1A plasmid grubunda karşılaştırılmış ve farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.39. DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** Miyeloid linyeç hücrelerin kapılama stratejisi **B)** CD11b⁺ ve CD11c⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri.

C

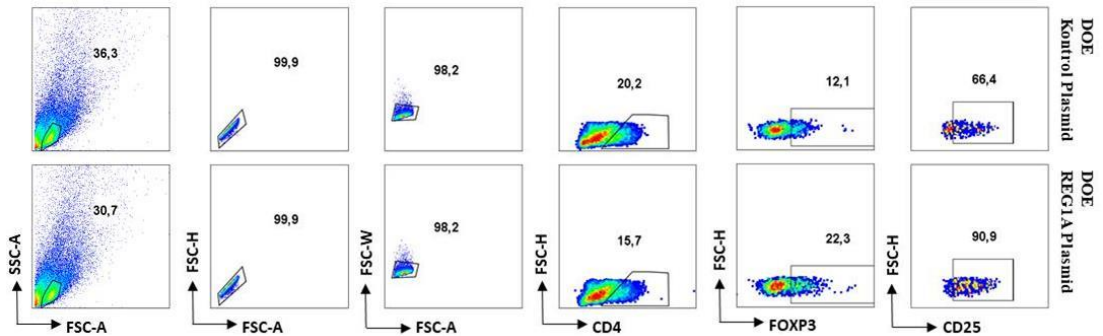


Şekil 4.39. DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. C) CD11b⁺CD11c⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri (Devamı)

Treg hücreleri ve kontrol noktası inhibitörleri: DOE gupta beyindeki lenfositler Tablo 3.5’de Karışım 3 ve Karışım 4’de verilen antikorlar ile ayrı ayrı boyanmış Treg hücreleri ve kontrol noktası inhibitörleri incelenmiştir. Kontrol plasmidi ve REG1A Plasmidi verdiğimiz gruplarda Treg hücrelerini belirlemek amacıyla CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ hücreler kapılanmıştır (Şekil 4.40). Ayrıca CD4⁺FOXP3⁺ ve CD4⁺FOXP3⁻ populasyonları içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ olmak üzere iki ayrı kapılama gerçekleştirilmiştir.

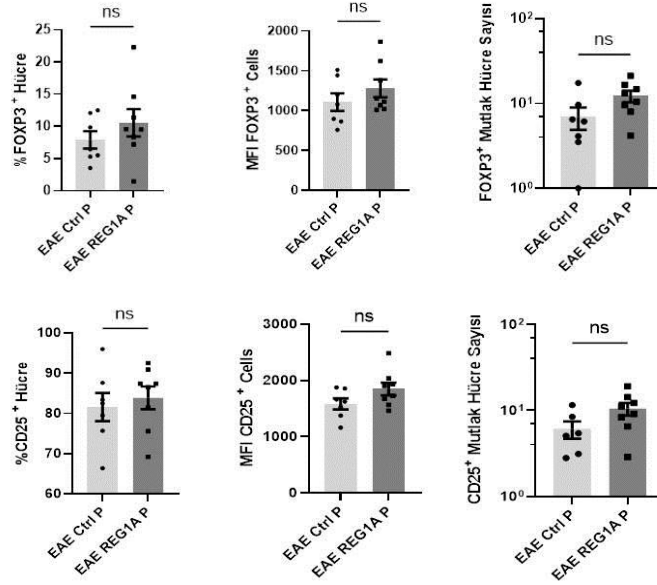
DOE gupta beyindeki FOXP3⁺ ve FOXP3⁺CD25⁺ hücrelerin yüzde, mutlak sayı ve MFI miktarları kontrol plasmid grubu ile karşılaştırıldığında REG1A plasmid grubunda bir miktar artış göstermiş ancak anlamlı değildir.

A



Şekil 4.40. DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. A) CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ hücrelerin kapılama stratejileri

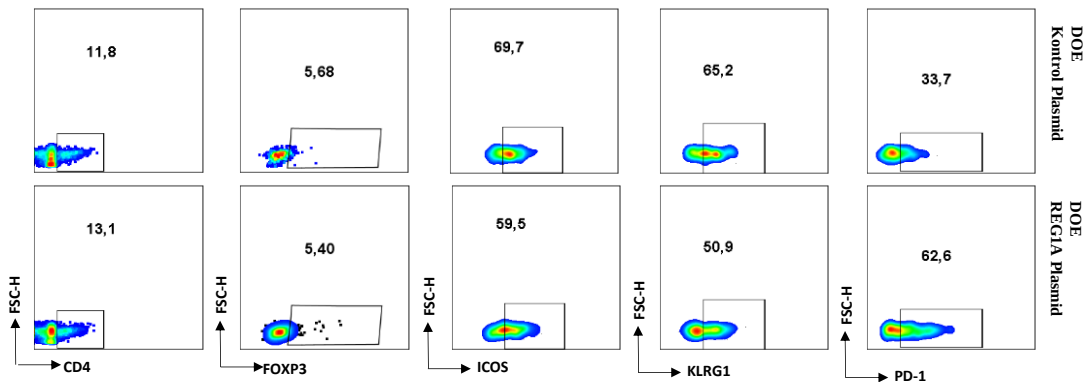
B



Şekil 4.40. DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **B)** FOXP3⁺ ve CD25⁺ hücrelerinin yüzde, MFI ve mutlak sayı grafikleri (**Devamı**)

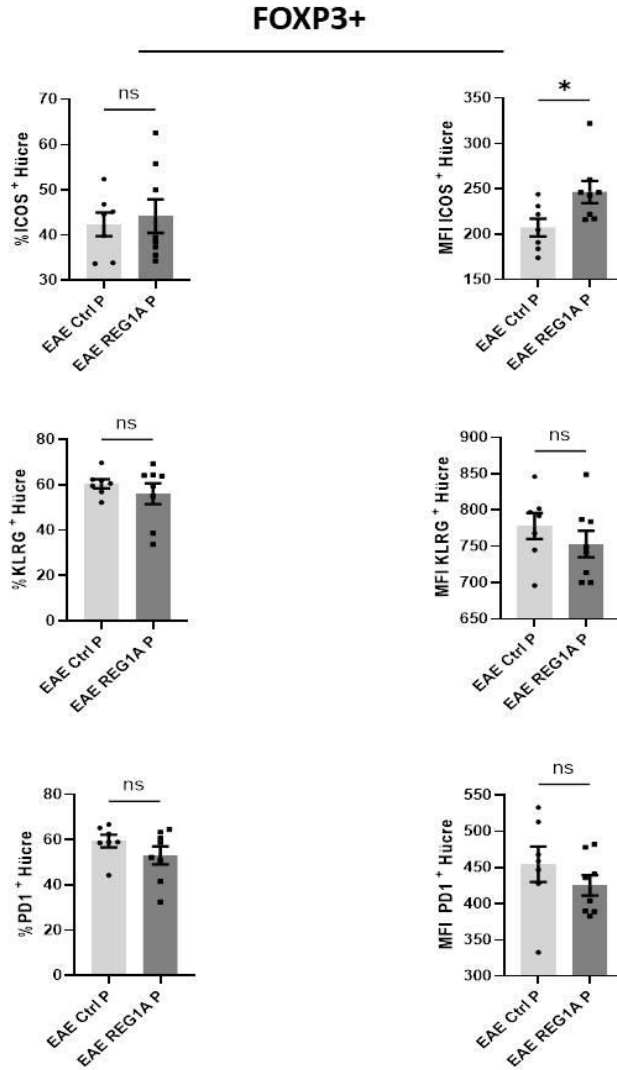
DOE gupta beyindeki CD4⁺FOXP3⁺ ve CD4⁺FOXP3⁻ populasyonları içinden immün checkpoint ifadelerine bakılmış yüzde ve MFI değerleri incelenmiştir. Kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda CD4⁺FOXP3⁺ hücre populasyonunda ICOS⁺ hücrelerin yüzdesi bir miktar artmış ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. ICOS⁺ hücrelerin MFI değerleri ise istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p \leq 0.05$; Şekil 4.41). KLRG1⁺ ve PD1⁺ yüzde ve MFI miktarları azalmış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

A



Şekil 4.41. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin hücrelerin kapılama stratejisi.

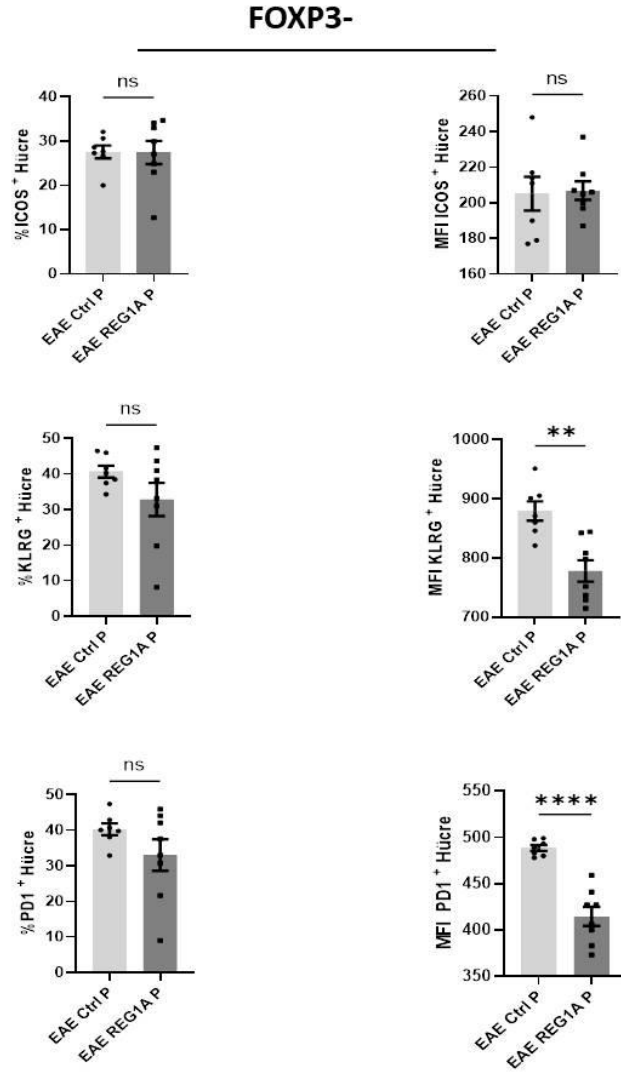
B



Şekil 4.41. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılma içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$ (**Devamı**)

Kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda CD4⁺FOXP3⁻ hücre popülasyonunda ICOS⁺ hücrelerin yüzde ve MFI miktarında fark gözlenmemiştir. KLRG1⁺ ve PD1⁺ hücrelerin yüzdeleri azalmış ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. KLRG1⁺ ve PD1⁺ hücrelerin MFI değerleri ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$; Şekil 4.42).

A



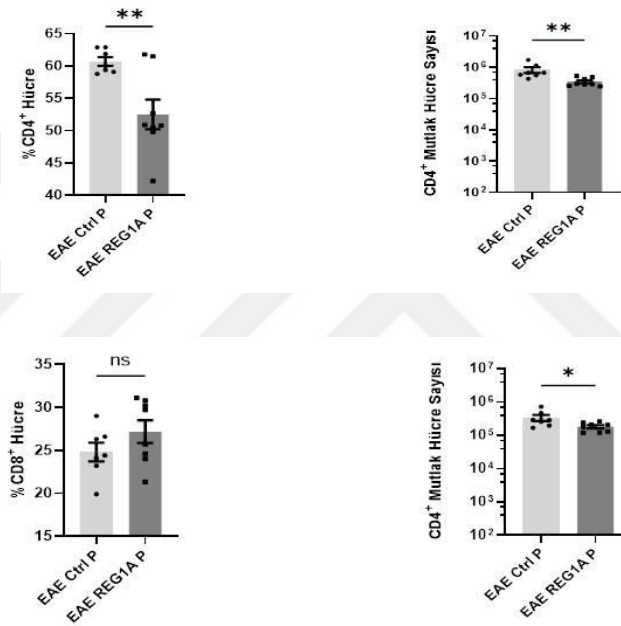
Şekil 4.42. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin beyinde incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.001$

4.17. İnsan REG1A Sistemik Overekspresyonunun DOE Farelerde Periferde İmmün Sistem Hücrelerine Etkilerinin İncelenmesi

T hücre alt tipleri ve üretilen sitokinler: DOE grupta lenf nod ve dalaktaki sitokin üretim miktarlarını belirlemek amacıyla kontrol plasmidi ve REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda CD4⁺ ve CD8⁺ kapılaması yapılarak belirlenen T hücrelerinin IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺, IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ ve GM-CSF⁺ hücreler kapılandı.

DOE grupta lenf nodundaki REG1A Plasmid grubundaki CD4⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı ifadesi kontrol plasmid grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalış göstermiştir ($p \leq 0.01$; Şekil 4.43). CD8⁺ hücrelerinin yüzde dağılımına baktığımızda REG1A Plasmid grubunda artış olsada, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. CD8⁺ hücrelerinin mutlak sayılarına baktığımızda ise REG1A Plasmid verdiğimiz grubu kontrol plasmid grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p \leq 0.05$; Şekil 4.42).

A

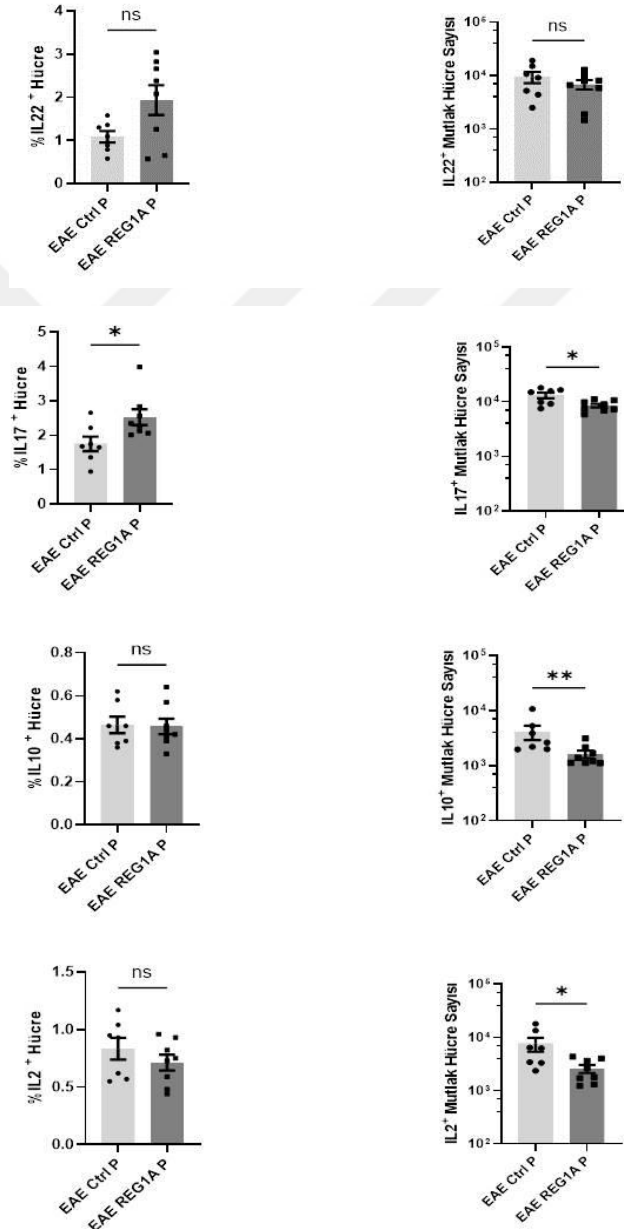


Şekil 4.43. DOE grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** CD4⁺ T hücrelerin ve CD8⁺ T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$

DOE grupta lenf nodundaki CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde REG1A Plasmid grubunda IL-22⁺ yüzdesi artmış ancak anlamlı değildir. IL-22⁺ hücrelerin mutlak sayısında önemli bir farklılık bulunmamaktadır. IL-17⁺ yüzdesi kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p < 0.05$). Mutlak sayıları açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($p < 0.05$; Şekil 4.44). Her iki grupta IL-2⁺ ve IL-10⁺ üretim yüzdesi değişmezken, mutlak sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($p < 0.05$; $p < 0.01$). TNF-a⁺ yüzdesi

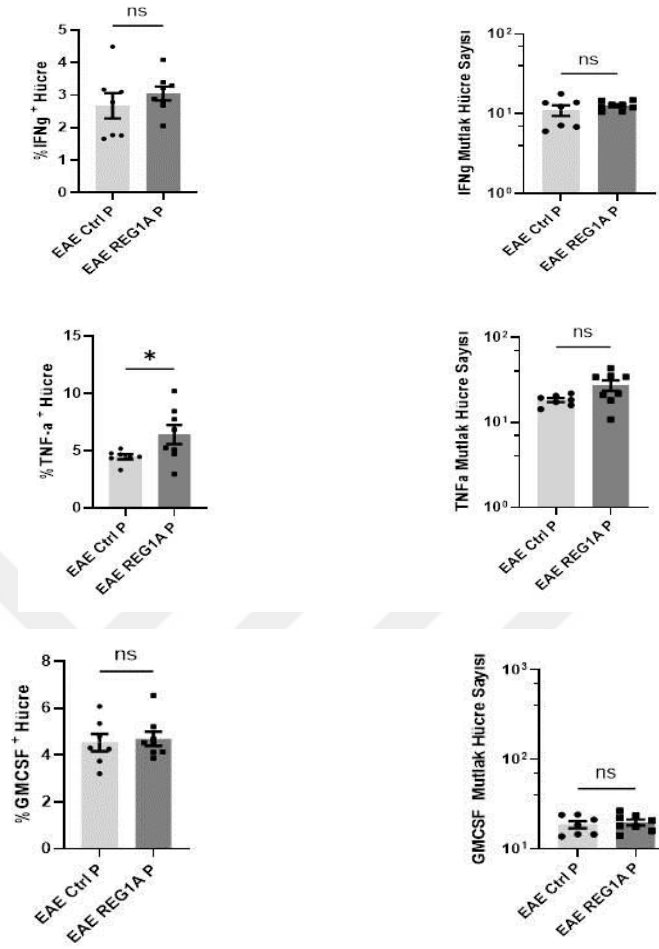
kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p < 0.05$). Mutlak sayıları açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında fark bulunmamaktadır. IFN- γ^+ ve GM-CSF $^+$ hücrelerin sitokin üretim miktarlarına baktığımızda ise yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir farklılık bulunmamaktadır.

A



Şekil 4.44. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4 $^+$ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. A) IL-22 $^+$, IL-17 $^+$, IL-10 $^+$, IL-2 $^+$ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

B



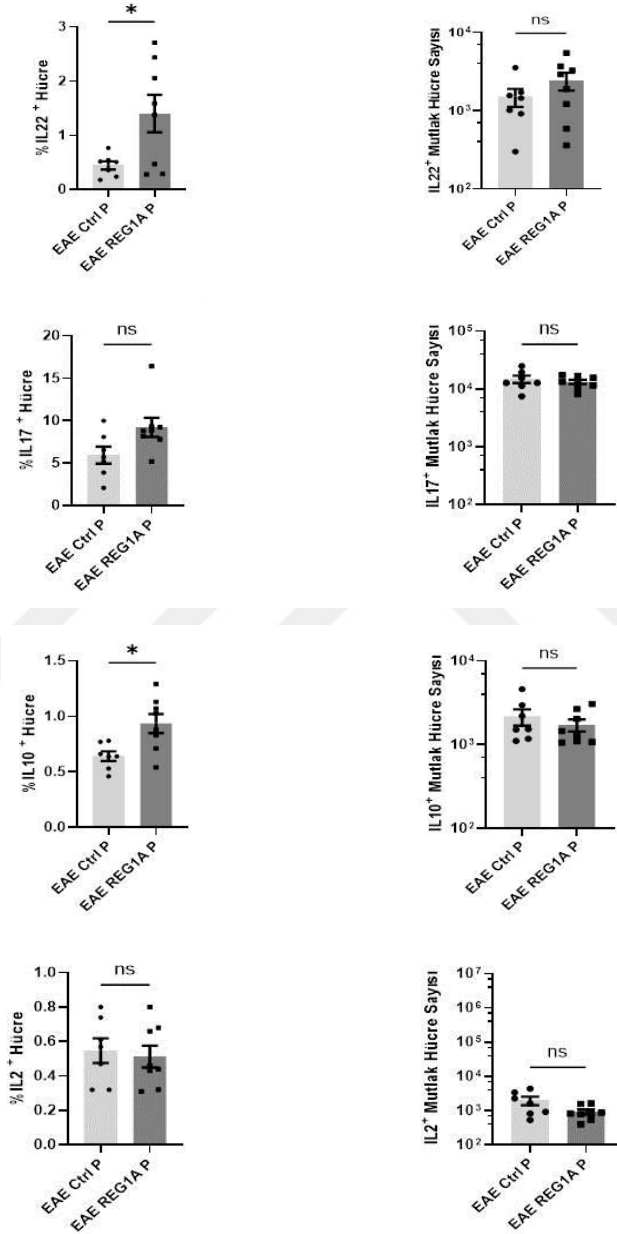
Şekil 4.44. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **B)** IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05 (**Devamı**)

DOE grupta lenf nodundaki CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde REG1A Plasmid grubunda IL-22⁺ yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (p<0.05). IL-22⁺ hücrelerin mutlak sayısı REG1A Plasmid grubunda artmış ancak anlamlı değildir.

IL-17⁺ yüzdesi kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda artmış ancak anlamlı değildir. Mutlak sayıları açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında fark yoktur. REG1A plasmid grubunda IL-10⁺ yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş, mutlak sayıları ise bir miktar azalmıştır (p<0.05; Şekil 4.45). IL-2⁺, IFN-g⁺ ve TNF-a⁺ yüzde ve mutlak sayılarında REG1A Plasmid grubunda azalma olsada bu azalma anlamlı değildir. GMCSF⁺ hücrelerin sitokin üretim

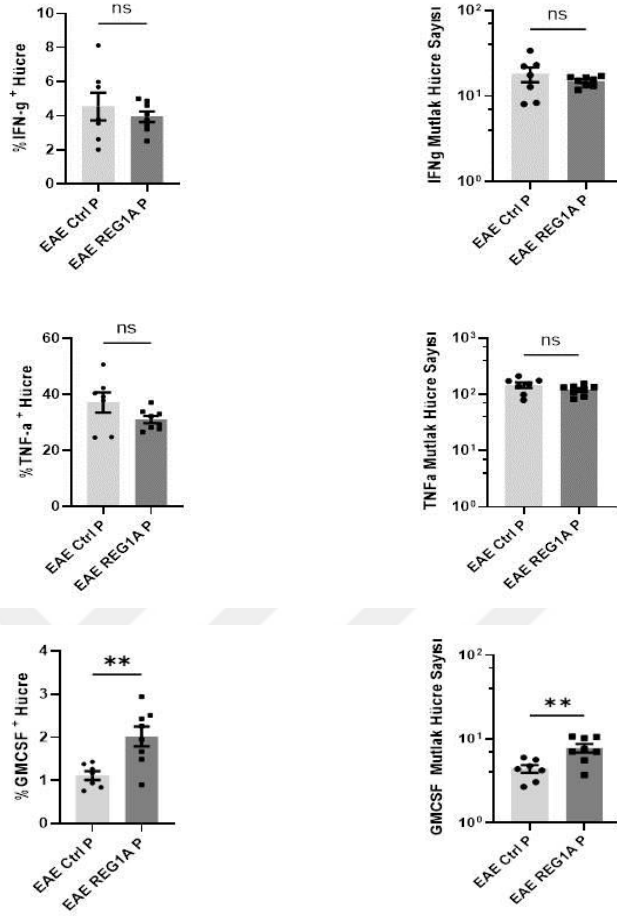
miktarlarına baktığımızda kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda yüzde ve mutlak sayıları istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.01$; Şekil 4.45).

A



Şekil 4.45. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * $p<0.05$

B



Şekil 4.45. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **B)** IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. ** p<0.01 (**Devamı**)

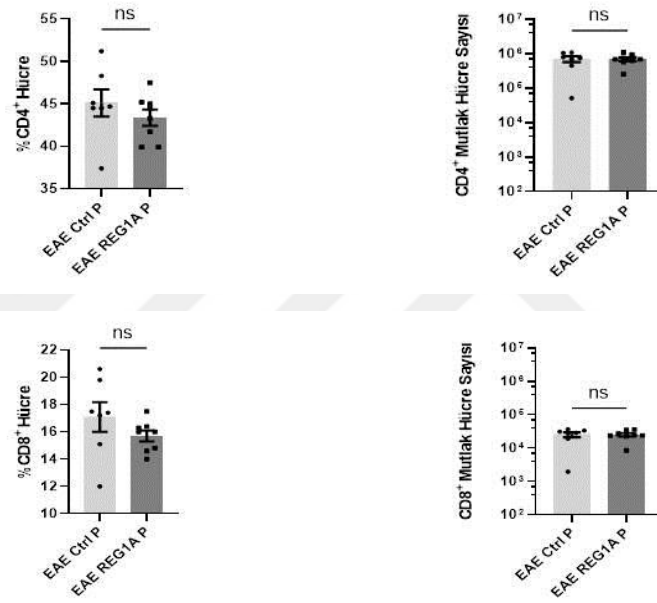
DOE grupta dalaktaki T hücre alt tiplerine baktığımızda CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin REG1A Plasmid verdiğimiz grupta kontrol plasmid grubuna kıyasla yüzde ifadeleri bir miktar azalmış (Şekil 4.46) mutlak sayılarında ise bir fark bulunmamaktadır.

DOE grupta dalaktaki sitokin üretim miktarlarını belirlemek amacıyla kontrol plasmidi ve REG1A plasmidi verdiğimiz gruplarda CD4⁺ ve CD8⁺ kapılaması yapılarak belirlenen T hücrelerinde IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺, IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücreler kapılandı.

CD4⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde IL-22⁺, IL-17⁺ ve GMCSF⁺ yüzdesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda azalmış mutlak sayılarında fark bulunmamaktadır.

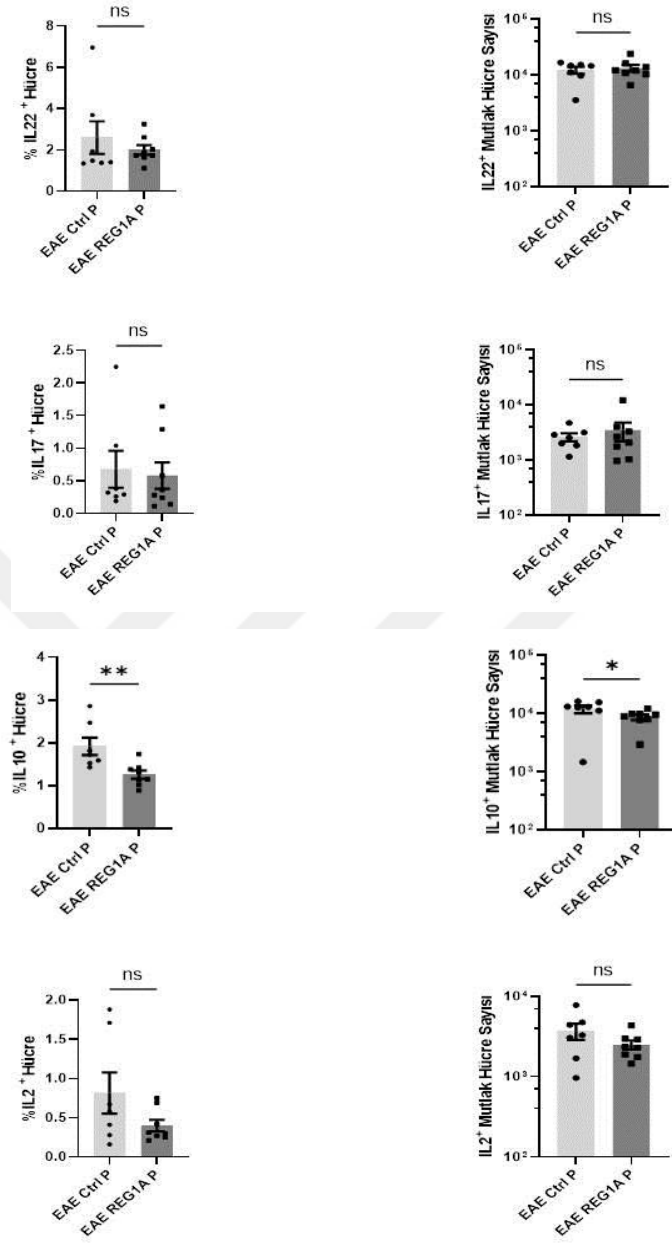
IL-10⁺ hücrelerin sitokin üretim miktarlarına baktığımızda kontrol plasmid grubuna kıyasla REG1A Plasmid grubunda yüzde ve mutlak sayıları istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir (p<0.01, p<0.05; Şekil 4.46). IL-2⁺, GMCSF⁺ yüzde ve mutlak sayıları ise REG1A Plasmid grubunda azalmış ancak anlamlı değildir. IFN-γ⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayıları ise REG1A Plasmid grubunda bir miktar artmış ancak anlamlı değildir. TNF-α⁺ sitokin üretim miktarlarında iki grup arasında yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir fark bulunmamaktadır.

A



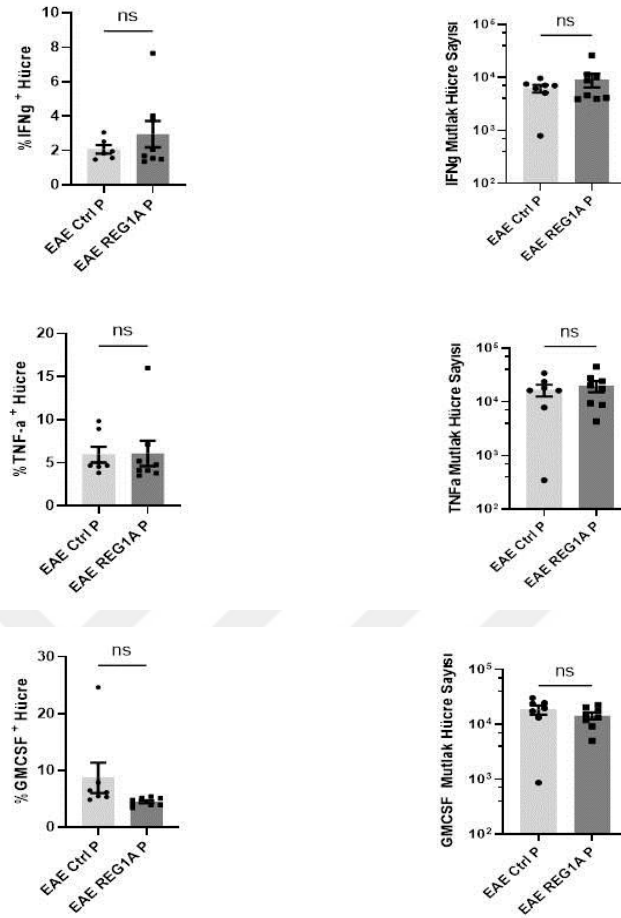
Şekil 4.46. DOE grupta REG1A overekspresyonunun T hücre alt tipleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** CD4⁺ ve CD8⁺T hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri.

A



Şekil 4.47. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * p<0.05; ** p<0.01

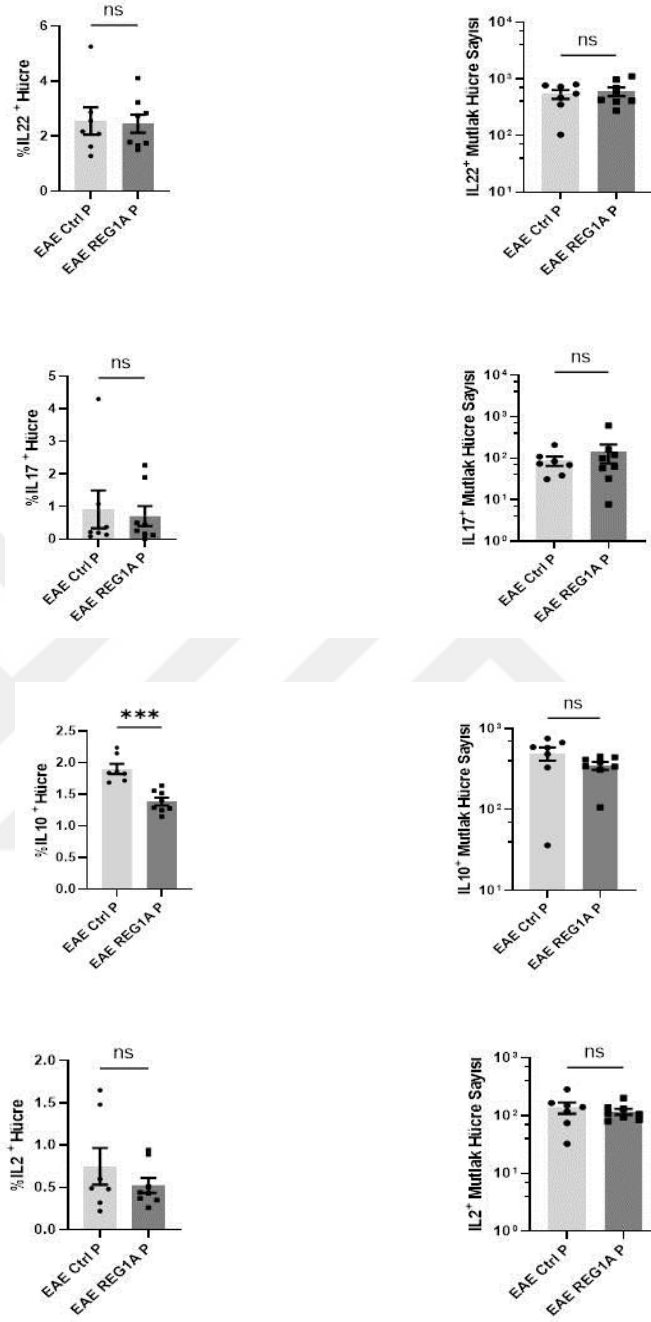
B



Şekil 4.47. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD4⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **B)** IFN-g⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri **(Devamı)**

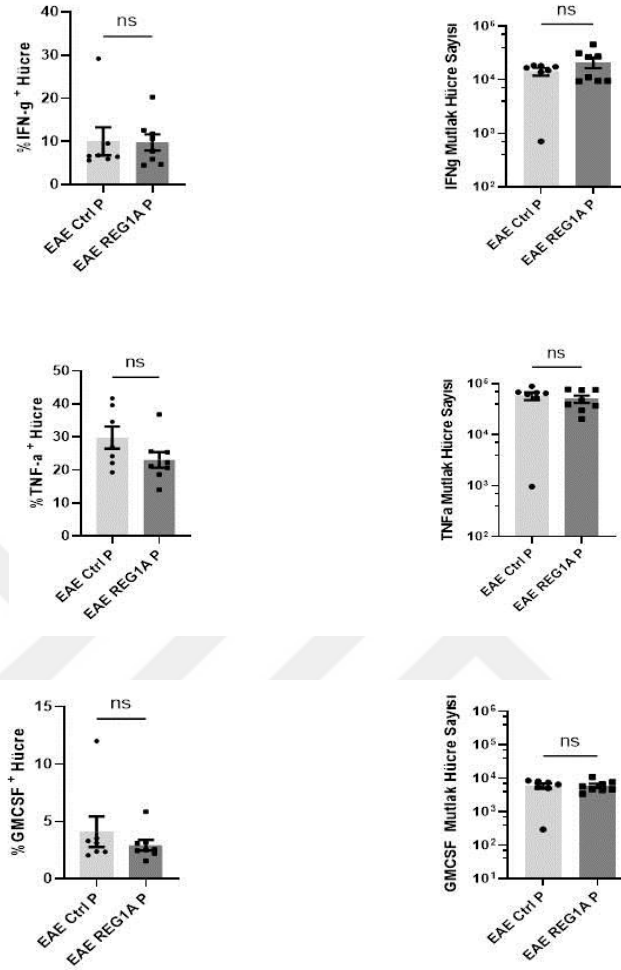
DOE grupta dalakta CD8⁺ T hücrelerinin sitokin üretimi incelendiğinde IL-22⁺ ve IFN-g⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayılarında önemli bir fark bulunmamaktadır. IL-17⁺, IL-2⁺, TNF-a⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerin yüzdesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda bir miktar azalmış mutlak sayılarında fark bulunmamaktadır. IL-10⁺ sitokin üretim yüzdesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p \leq 0.005$; Şekil 4.48). Mutlak sayısındaki azalma anlamlı değildir.

A



Şekil 4.48. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** IL-22⁺, IL-17⁺, IL-10⁺, IL-2⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. *** p ≤ 0.005

B



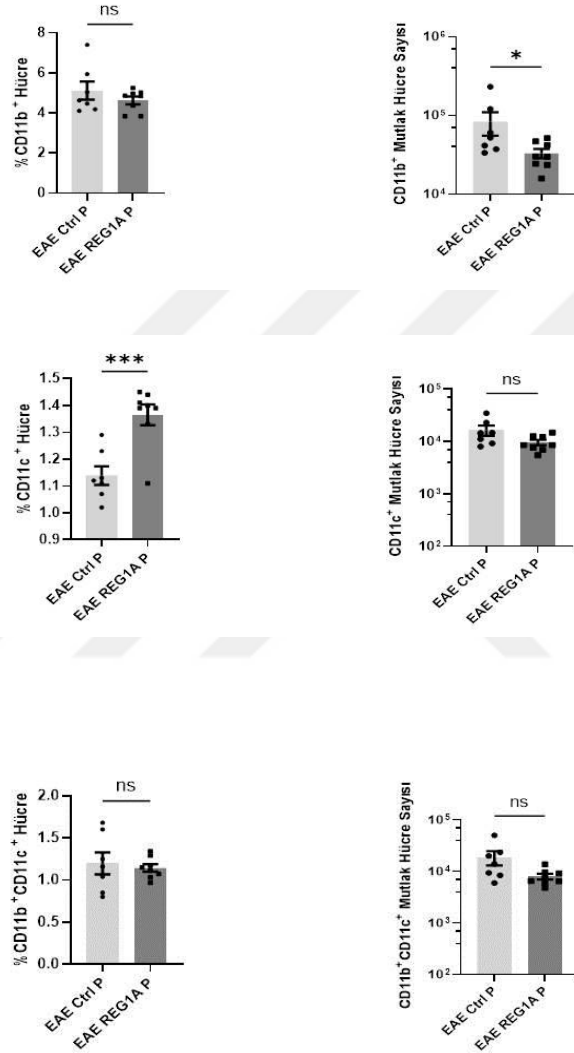
Şekil 4.48. DOE grupta REG1A overekspresyonunun CD8⁺ T hücre sitokin üretimi üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **B)** TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ve GMCSF⁺ hücrelerin yüzde ve mutlak sayı grafikleri **(Devamı)**

Miyeloid Hücreler: DOE grupta lenf nod ve dalaktaki miyeloid hücreleri belirlemek amacıyla Tablo 3.5’ de Karışım 5’de verilen yüzey markırları olan CD11b ve CD11c antikorları ile yüzey boyama yapılmıştır.

DOE grupta lenf nodlarda CD11b⁺ yüzde ifadesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda azalmıştır. Mutlak sayısı ise REG1A Plasmid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p \leq 0.05$; Şekil 4.49). CD11c⁺ yüzde ifadesine baktığımızda kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p \leq 0.005$). Mutlak sayı bakımından incelediğimizde REG1A

Plasmid grubunda anlamlı olmayan bir azalma vardır. $CD11b^+CD11c^+$ ifadesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda yüzde olarak fark göstermezken mutlak sayısı bakımından biraz azalmıştır.

A

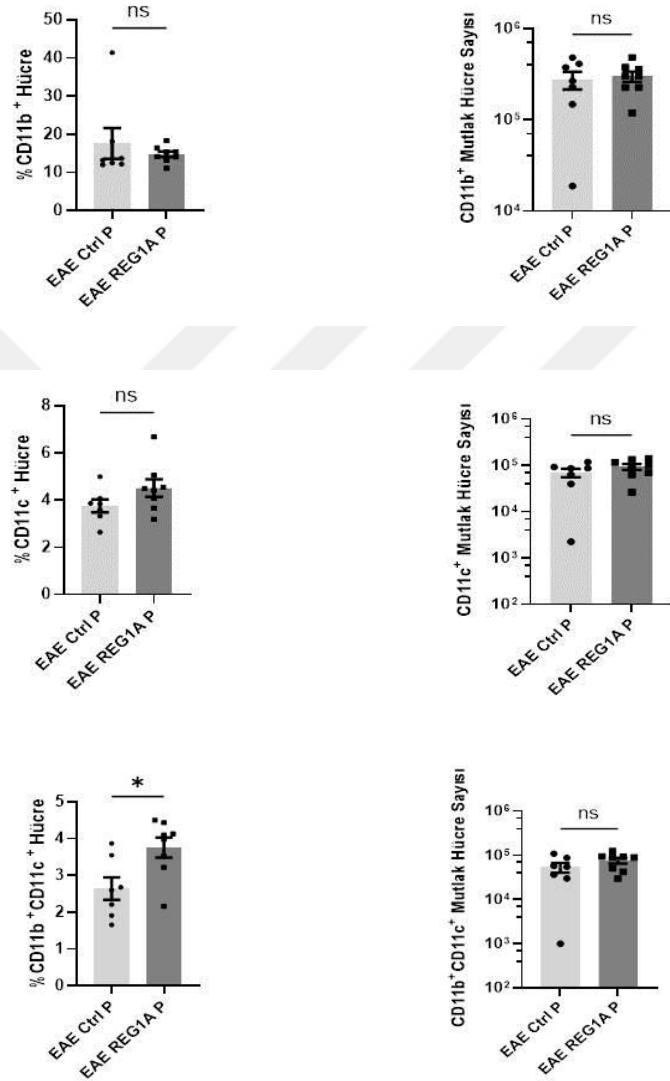


Şekil 4.49. DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin lenf nodda incelenmesi. **A)** $CD11b^+$, $CD11c^+$ ve $CD11b^+CD11c^+$ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$

DOE grupta dalaktaki $CD11b^+$ yüzde ve mutlak sayıları kontrol grubu ile REG1A Plasmid grubu karşılaştırılmış ancak önemli bir fark gözlenmemiştir. $CD11c^+$ yüzde ifadesine baktığımızda kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.50). $CD11b^+CD11c^+$ yüzde ifadesi kontrole kıyasla REG1A Plasmid

grubunda istatistiksel olarak anlamlı artmıştır ($p \leq 0.05$). Mutlak sayı bakımından incelediğimizde $CD11c^+$ ve $CD11b^+CD11c^+$ miktarında önemli bir fark bulunmamıştır.

A



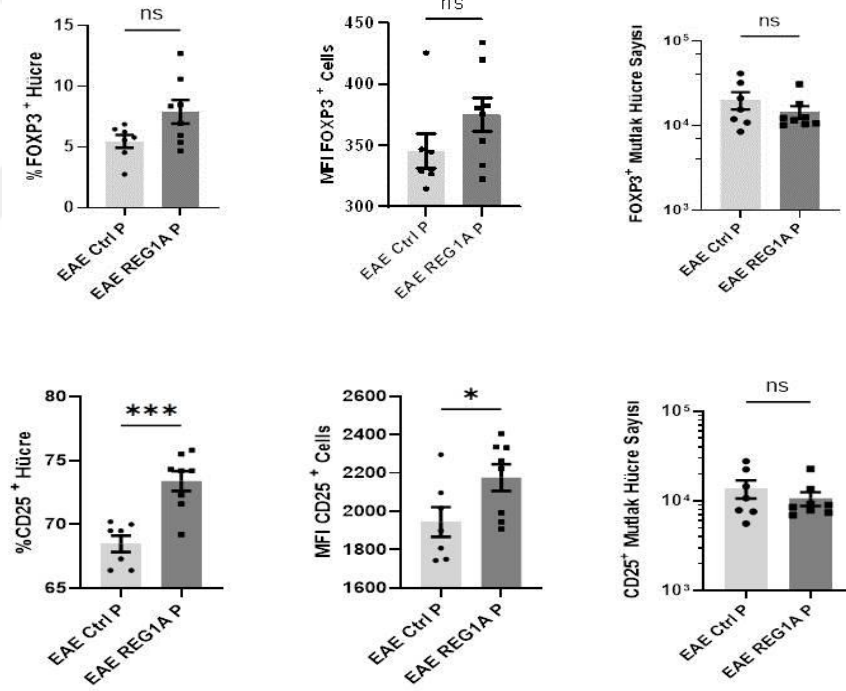
Şekil 4.50. DOE grupta REG1A overekspresyonunun miyeloid hücreler üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** $CD11b^+$, $CD11c^+$ ve $CD11b^+CD11c^+$ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$

Treg hücreleri ve kontrol noktası inhibitörleri: DOE grupta lenf nod ve dalaktaki lenfositler Tablo 3.5’de Karışım 3 ve Karışım 4’de verilen antikorlar ile ayrı ayrı boyanmış Treg hücreleri ve kontrol noktası inhibitörleri incelenmiştir. Kontrol plasmidi ve REG1A Plasmidi verdiğimiz gruplarda Treg hücrelerini belirlemek

amacıyla $CD4^+FOXP3^+CD25^+$ hücreler kapılanmıştır. Ayrıca $CD4^+FOXP3^+$ ve $CD4^+FOXP3^-$ populasyonları içinden $ICOS^+$, $KLRG1^+$, $PD1^+$ olmak üzere iki ayrı kapılama gerçekleştirilmiştir.

DOE grupta lenf nodunda REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta $FOXP3^+$ hücrelerin yüzde ve MFI miktarları anlamlı olmayan bir artış göstermiştir. Ayrıca REG1A'nın overekspresyonu $FOXP3^+$ hücrelerin mutlak sayısını da azaltmıştır ancak anlamlı değildir (Şekil 4.51). Lenf nodunda $CD25^+$ hücrelerinin yüzde ve MFI miktarlarına baktığımızda REG1A plasmidi verdiğimiz grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır ($p \leq 0.005$, $p \leq 0.05$). Mutlak sayılarında ise $CD25^+$ ifadesinde bir miktar azalma gözlenmemiştir.

A

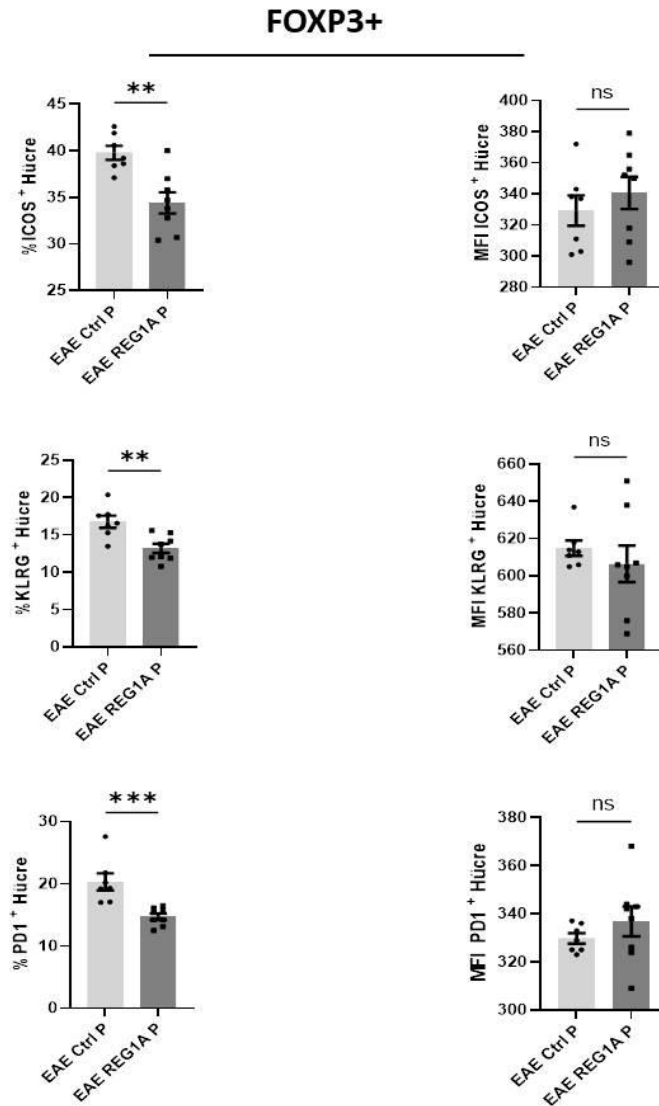


Şekil 4.51. DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** $FOXP3^+$ ve $CD25^+$ hücrelerinin yüzde, MFI ve mutlak sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.005$

Lenf nodunda $CD4^+FOXP3^+$ ve $CD4^+FOXP3^-$ populasyonları içinden immün checkpoint ifadelerine bakılmış yüzde ve MFI değerleri incelenmiştir.

Lenf nodunda kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda $CD4^+FOXP3^+$ hücre popülasyonunda $ICOS^+$, $KLRG1^+$, $PD1^+$ yüzde ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.005$; Şekil 4.52). MFI değerlerine baktığımızda REG1A Plasmid grubunda $ICOS^+$ ve $PD1^+$ ifadesi bir miktar artmışken, $KLRG1^+$ ifadesi bir miktar azalmıştır.

A

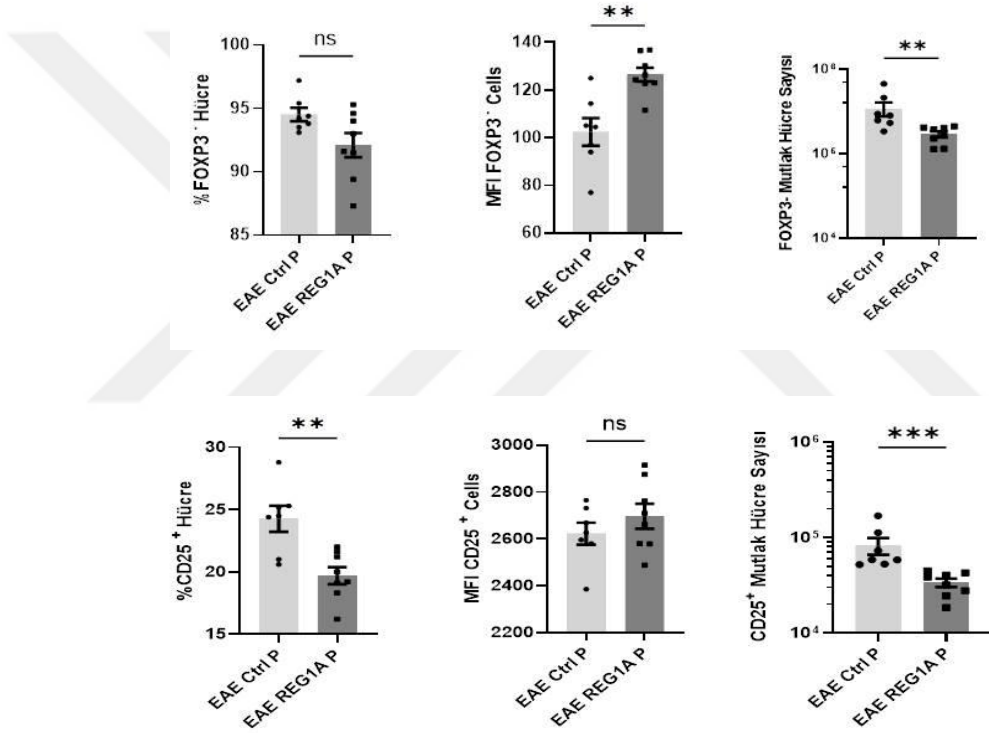


Şekil 4.52. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi. **A)** $FOXP3^+$ kapılama içinden $ICOS^+$, $KLRG1^+$, $PD1^+$ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$

DOE grupta lenf nodunda REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta FOXP3⁺ hücrelerin yüzdesi azalmıştır. MFI miktarları istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiş, mutlak sayısı ise anlamlı bir azalma göstermiştir ($p \leq 0.01$; Şekil 4.53).

Lenf nodunda CD25⁺ hücrelerinin yüzde ve mutlak sayısı miktarlarına baktığımızda REG1A Plasmidi verdiğimiz grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardır ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.005$; Şekil 4.52). MFI miktarı ise CD25⁺ ifadesinde bir miktar artmıştır.

A

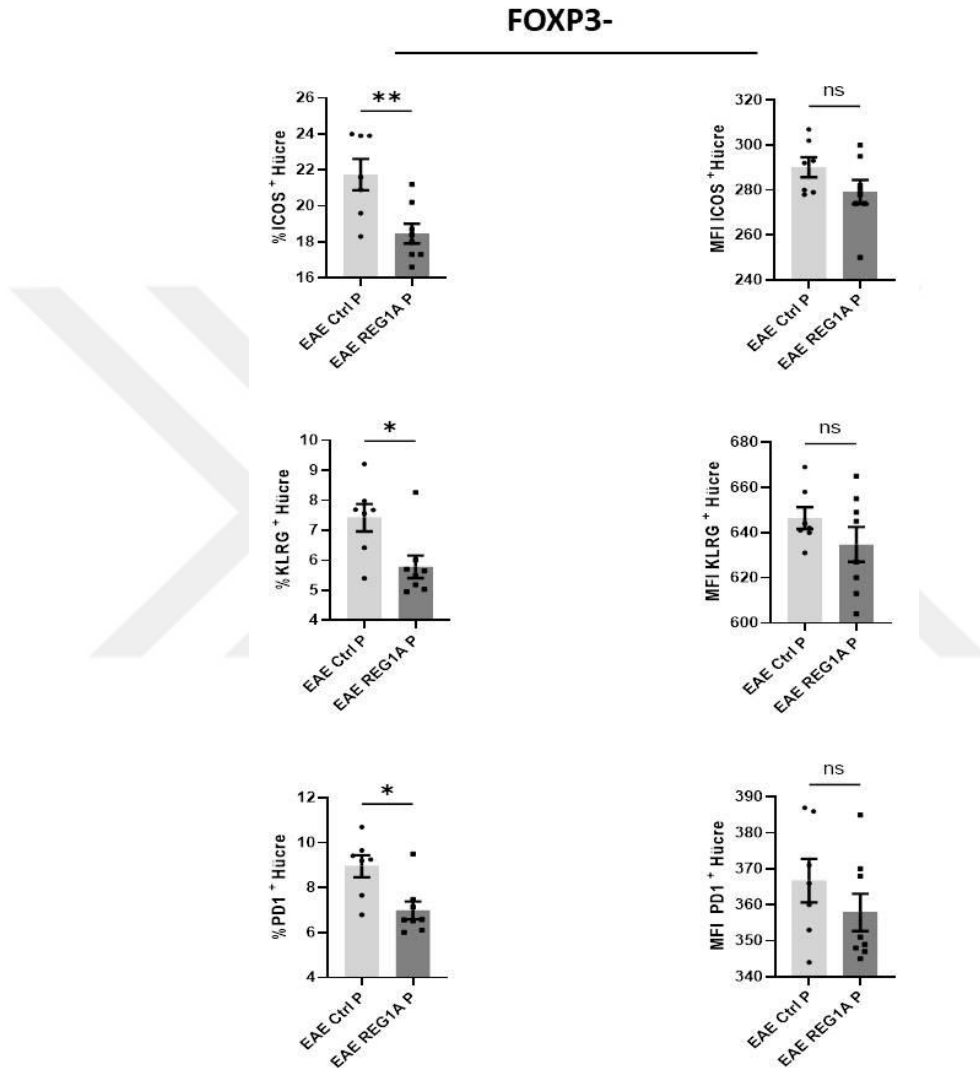


Şekil 4.53. DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin lenf nodunda incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ ve CD25⁺ hücrelerinin yüzde, MFI ve mutlak sayı grafikleri. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$

Lenf nodunda kontrole kıyasla REG1A Plasmid grubunda CD4⁺FOXP3⁺ hücre popülasyonunda ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerde yüzde ifadeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.54). MFI değerlerine baktığımızda REG1A Plasmid grubunda azalma vardır ancak anlamlı değildir.

Sonuç olarak DOE grupta lenf nodda REG1A overekspresyonu FOXP3⁺ hücrelerdeki CD25 ifadesi bir miktar artmış aynı zamanda FOXP3⁺ hücrelerdeki aktivasyon durumlarında bir miktar baskılanmıştır.

A

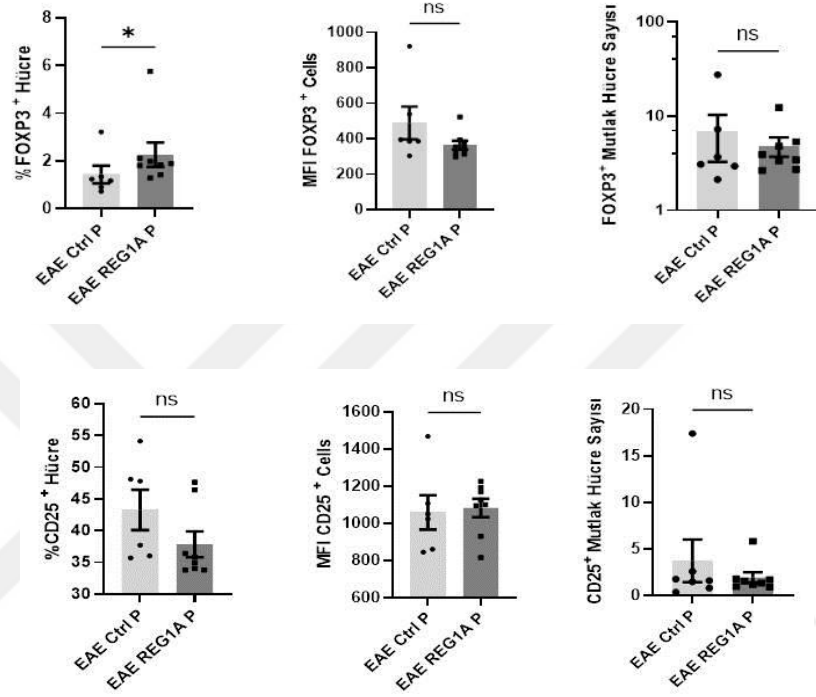


Şekil 4.54. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin lenf noduna incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

DOE grupta dalaktaki REG1A plasmidi verdiğimiz grupta FOXP3⁺ hücrelerin yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. REG1A plasmidi verdiğimiz grupta MFI değeri ile mutlak sayısı azaltmıştır ve anlamlı değildir. CD25⁺

hücrelerinin yüzde ve mutlak sayıları REG1A plasmidi verdiğimiz grupta azalmıştır (Şekil 4.55). CD25⁺ MFI değeri ise bir miktar artmıştır.

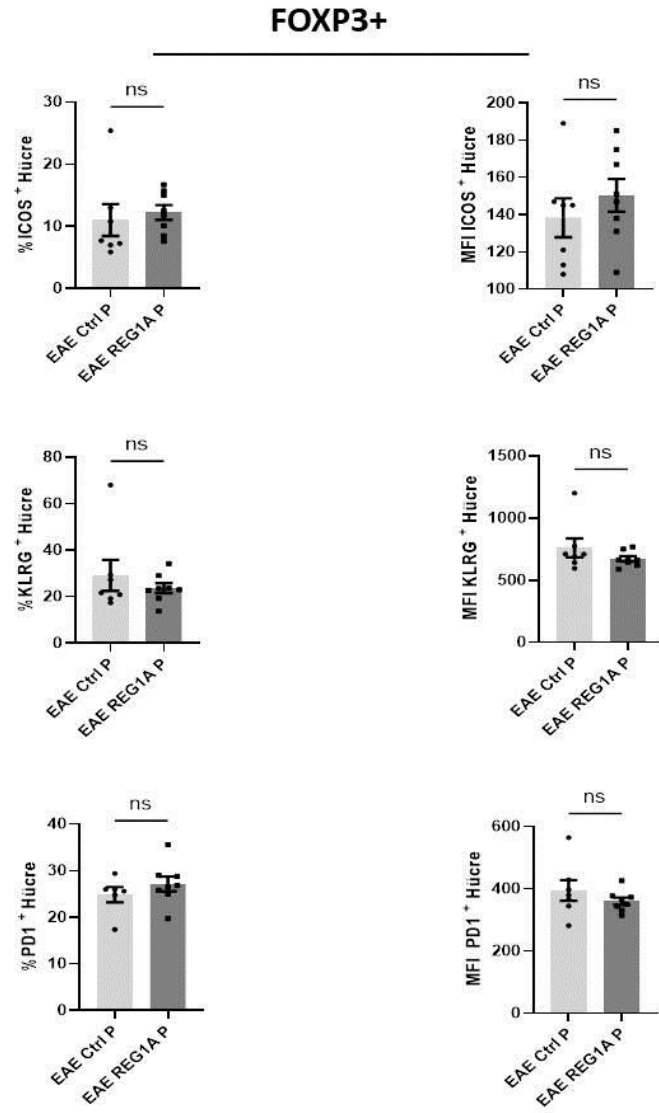
A



Şekil 4.55. DOE grupta REG1A overekspresyonunun Treg hücreleri üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ ve CD25⁺ hücrelerinin yüzde, MFI ve mutlak sayı grafikleri. * p ≤ 0.05.

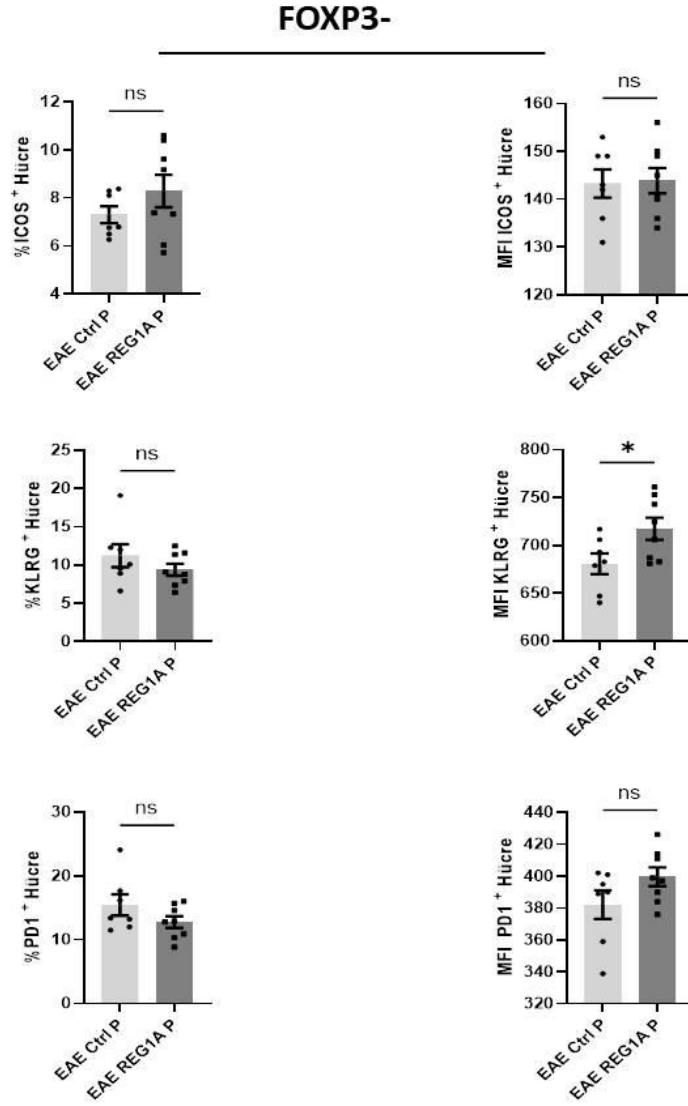
Dalakta CD4⁺FOXP3⁺ hücre popülasyonunda REG1A Plasmid grubunda ICOS⁺ hücrelerde yüzde ve MFI miktarları artmıştır (Şekil 4.56). KLRG1⁺, yüzde ve MFI miktarları azalmıştır. PD1⁺ hücrelerin yüzdesi bir miktar artmış, MFI miktarları ise bir miktar azalmıştır.

Dalakta CD4⁺FOXP3⁻ hücre popülasyonunda REG1A Plasmid grubunda ICOS⁺ hücrelerin yüzdesi artmışken, MFI değeri değişmemiştir. KLRG1⁺ yüzdesi bir miktar azalmış ve MFI miktarları istatistiksel olarak anlamlı artmıştır (Şekil 4.57). PD1⁺ hücrelerin yüzdesi bir miktar artmış, MFI miktarları ise bir miktar azalmıştır.



Şekil 4.56. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** FOXP3⁺ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri.

A



Şekil 4.57. DOE grupta REG1A overekspresyonunun kontrol inhibitör noktaları üzerine etkisinin dalakta incelenmesi. **A)** FOXP3⁻ kapılama içinden ICOS⁺, KLRG1⁺, PD1⁺ hücrelerin yüzde ve MFI sayı grafikleri. * $p \leq 0.05$

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Reg ailesi üyesi proteinleri önemli antimikrobiyal peptidler olup doğuştan gelen bağışıklığın temel bileşenleridir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarla Reg proteinlerinin daha çok mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkileri bilinmekteydi. Hücrenin membranında por oluşturarak ya da lipid tabakayı bozarak, iki fonksiyonla da mikrobisidal etki göstermektedir (Giuliani ve diğ., 2008). Ayrıca ek olarak bazı yayınlarda Reg proteinlerinin bazı hücrelerde (epitel, pankreas hücreleri gibi) reseptörleri olabileceği böylece konağın kendi hücrelerini etkileyerek inflamasyonu farklı mekanizmalarla da etkileyebilecekleri gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda AMP'lerin immünomodülatör rolleri olduğunu patojenlerin dışında bağlanabildikleri hücresel reseptörler ve etkiledikleri konağa ait hücreler olduğunu göstermiştir. Katelisidin-ilişkili antimikrobiyal peptit (CRAMP)'in ve insan ortologu LL-37'nin EAE ve MS'de spinal kordta üretildiği, farede astrosit kaynaklı CRAMP susturmasının EAE şiddetini azalttığı, ayrıca intratekal CRAMP enjeksiyonunun hastalığı şiddetlendiği gösterilmiştir (Bhusal ve ark., 2022). Kısa bir süre önce beta-defensinin T hücrelerini doğrudan veya dolaylı etkileyerek proksimal T hücre sinyali yolağını baskılamış ve rekombinant beta defensin uygulamasının graft versus host hastalığının şiddetini azalttığı gösterilmiştir. Alzheimer hastalığı bağlamında Aβ proteininin bir antimikrobiyal olarak çalıştığı son zamanlarda yapılan birçok yayında, hakkında tartışma olmakla birlikte gösterilmiştir (Stuart ve Franitza 2022). Ayrıca mikroglianin Aβ proteiniyle muamelesi mikroglia aktivasyonuna ve bir başka pro-inflamatuvar AMP olan LL-37 üretimine neden olmuştur. Dolayısıyla birçok AMP'nin yalnızca mikrobiyotayı etkileyerek değil, immün hücreler veya MSS veya PSS üzerinde doğrudan dolaylı etkilerle nöroimmünolojik hastalıkların patogenezinde katkıda bulunabileceği değerlendirilmektedir.

Ancak bugüne kadar literatürde bu antimikrobiyal protein peptidlerinin immün hücrelerde doğrudan etkilerinin olup olmadığı çalışmalara konu olmamıştır. Bu çalışmada birincil amaç olarak bu üç Reg proteininin immün sistem üzerindeki doğrudan veya dolaylı etkisini insan T hücresinde incelemek amaçlanmış ve buna dönük deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda;

- ✓ Jurkat hücreleri ve PBMC’lerde doğrudan rekombinant insan REG1A, REG3A, REG3G proteinlerinin *ex vivo* ortamda proliferasyon, apoptoz, IL-2 üretimi ve aktivasyon markırlarına (CD69, CD25, CD127) baktığımızda reg proteinleri bu parametrelerin hiçbirini etkilememiştir.
- ✓ Rekombinant insan REG1A proteininin *ex vivo* ortamda primer naive CD4⁺ insan T hücrelerinin Th17 hücrelerine farklılaşmasına etkisi incelenmiş ve REG1A’nın yüksek dozlarında Th17 farklılaşması azalttığı görülmüştür.
- ✓ Rekombinant insan REG1A proteininin *ex vivo* ortamda primer naive CD4⁺ insan T hücrelerinin Treg hücrelerine farklılaşmasına etkisi incelenmiş ve REG1A’nın yüksek dozlarında Treg farklılaşması azalttığı görülmüştür.
- ✓ Rekombinant insan REG1A proteininin *ex vivo* ortamda dendritik hücre olgunlaşmasına etkileri incelenmiş ve REG1A CD11c ifadesini arttırmıştır. Diğer yüzeydeki maturasyon markırlarında dramatik bir etki yoktur.
- ✓ Reg proteinlerinin gerçekten çalıştığını teyit etmek amacıyla antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. REG1A, REG3A ve REG3G’ nın farklı konsantrasyonlarının *S. aureus* üzerine anti-mikrobiyal etkisi teyit edilmiş ve her üç reg proteininin farklı konsantrasyonlarında koloni sayılarında azalma belirlenmiştir.
- ✓ CD4⁺ T hücrelerinde tranfeksiyon ile susturma sonrası REG1A/REG3A reseptörü olduğu düşünülen EXTL3 ifadesi azalmıştır. Ancak EXTL3 reseptörünün knock downu proliferasyon, IL-2 üretimi ve aktivasyon markırı olan CD69 ifadesini etkilememiştir.
- ✓ Naif farelerde (inflamasyon olmayan durumda) Reg overekspresyonunun 8. günü immün sistem parametrelerine baktığımızda insan REG1A proteininin sistemik overekspresyonu lenf nodda CD4⁺ T hücrelerini arttırmış, sitokin profiline baktığımızda ise IL-10⁺, IFN- γ ⁺, TNF- α ⁺ ve GM-CSF⁺ ifadesini arttırmıştır.

- ✓ İnsan REG1A overekspresyonu naif farelerde lenf nodunda FOXP3⁺ ve CD25⁺ ifadelerini de arttırmıştır. Dalakta non-treg hücrelerde kontrol noktası inhibitörlerinden PD-1 artmıştır.
- ✓ REG1A Plasmidinin overekspresyonu DOE Klinik skorlarını azaltmış, eğri altında kalan alan değerlerini düşürmüş ve demiyelinasyonu sınırlamıştır.
- ✓ DOE farelerde (inflamasyon durumunda) 23. gün immün sistem parametrelerine baktığımızda lenf nodda CD4⁺ T hücre sayısını azaltmış, Treg hücrelerinin sayısını ve aktivasyon belirteci olan CD25 ifadesini arttırmıştır. Öte yandan patojenik olan konvansiyonel Treg hücrelerinin sayısını ve CD25 ifadesini azaltmıştır.
- ✓ Ayrıca naiflerde kontrol noktası inhibitörleri periferde artmışken immünizasyon yaptığımız DOE farelerde kontrol noktası inhibitörleri hem periferde hemde MSS'de azalmıştır.

5.1. REG'in *In Vitro* Kültür Sistemindeki Etkileri

Hem Jurkat hücrelerini hemde PBMC'leri insan REG1A, REG3A, REG3G proteinleri doğrudan yada dolaylı olarak etkileyip etkilemediğini araştırdık ve buna dair bir takım bilimsel kanıtlar elde etmeye çalıştık. Bu bağlamda **proliferasyon, apoptoz, IL-2 üretimi ve CD69 ifadesine** baktık.

Yaptığımız detaylı incelemede **proliferasyon** bağlamında baktığımızda Jurkat hücreleri üzerinde Reg proteinlerinin birbirinden farklı dozlar denendi çok majör etkilerinin olmadığı gözlemlendi.

Bugüne kadar birkaç Reg ailesi üyesinin, farklı sinyal yollarını aktive ederek farklı hücre tiplerinde proliferasyonu, farklılaşmayı teşvik ettiği ve apoptozu önlediği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda Reg1A geninin aşırı ekspresyonu pankreatik kanser hücrelerinde incelenmiş ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak hızlandırılmış hücre proliferasyonu ve tümör büyümesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2016b). Başka bir çalışmada Reg1 eksikliği olan farelerde kriptlerde kök hücre proliferasyonunun azaldığı ve ince bağırsakta villus boyunca epitel göçünün bozulduğunu bildirerek, Reg1'in bağırsak villöz yapısının korunması ve yenilenmesindeki rolünü ortaya çıkarmıştır. Bizim çalışmamızın odağında daha

çok immün hücreleri oldu ve proliferasyon bağlamında doza bağlı dramatik farklar gözlenmedi.

REG3A' nın, kolorektal kanser, gastrik kanser olmak üzere çoğu kanser türlerinde etkisinin olduğu bildirilmiştir (Lieu ve ark., 2005). REG3A' nın ekspresyonunun artmasından dolayı tümör boyutunda büyüme, olumsuz farklılaşmalar, tümör evresinin daha hızlı ilerlemesi ve daha düşük sağ kalımla ilişkili olduğu ve azalan ekspresyon ile de hücre migrasyonu ve invazyonunun inhibe edildiği bildirilmiştir (Ye ve ark., 2016).

Reg3A'nın, gastrik kanser hücrelerinin invazyonunu, proliferasyonunu ve apoptozisini düzenlediği bildirilmiştir (Qiu ve ark., 2018). REG3A'nın bağırsakta bakterisidal bir ajan olarak ve epitel hücrelerinin apoptozunu azaltan ikili bir rol oynadığı gösterilmiştir. Pro-segmentin varlığı potansiyel olarak REG3A üreten epitel hücrelerinin istenmeyen hasarını önler. (Mukherjee et al . al., 2014). REG3γ, grefte karşı konakçı hastalığında (GVHD) etkileri incelenmiş ve hem bağırsak kök hücrelerinin (ISC'ler) hem de Paneth hücrelerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* apoptozunu önlemiştir.

Bizim çalışmamızda doğrudan T hücrelerinin **apoptotik etkilerinin** incelenmesinde Jurkat hücreleri ve PBMC'ler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan pg dozlarında bu üç antimikrobiyal proteinin canlılığı etkilemediği gözlenmiştir, kullandığımız dozlarda toksik bir etki görülmemektedir.

Hem Jurkatlarda hem de PBMC'lerde bu üç antimikrobiyal proteinin **IL-2 üretimi** üzerine etkilerinin olup olmadığını değerlendirdik. IL-2, T hücre çoğalması ve farklılaşması için gerekli olan önemli bir sitokindir. Literatürde bu 3 protein özelinde IL-2 ile ilişkili şu ana kadar hiçbir çalışma yapılmamıştır. Reg proteinlerini doğrudan T hücrelerine verdiğimizde kullandığımız dozlar IL-2 üretimini herhangi bir şekilde etkilememiştir. Bu sonuçlar Reg proteinlerinin doğrudan IL-2 üretimini etkilemediğini göstermekle birlikte dolaylı yollardan başka hücreleri etkileyerek T hücresi üzerinde etkiler göstermesi muhtemeldir. Bizim deney kurgumuzda doğrudan T hücresi üzerine verildiği için dolaylı etkilerini gösterecek kanıtlar sunmamıştır. CD69 ekspresyon seviyeleri, erken T hücresi aktivasyonunu değerlendirmek için kullanılır. Bu çalışmada Regin ilk kez **CD69 aktivasyon markırları** incelenmiş ve

şuana kadar insan yada fare hücrelerinde etkileri *vitro* ortamda başka araştırmacılar tarafından test edilmemiştir. Çalışmada ilk kez rekombinant proteinlerin *in vitro* kültür ortamında doğrudan T hücre ve PBMC'lerin üzerine atılarak incelenmiştir.

Reg proteinleri direk T hücresinin üzerine attığımızda proliferasyon, apoptoz, IL-2 üretimi ve aktivasyon markırları bakımından etkilememiştir. Ancak T hücreleri dentritik hücreler ile birlikte çalışmaktadır. Dentritik hücreler, mikrogliya ve makrofajlar gibi antijen sunan hücreler (ASH) tarafından T hücresi subsetleri aktive edilir. Reg proteinlerini dentritik hücre üzerine attığımızda dentritik hücreye cevaben ürettiği şey üzerinden hücrelerin üzerinde değişimler yaratarak T hücresini dolaylı etkiliyor olabilir. Çünkü sadece T hücrelerini koyduğumuz kültürlerde bu etkiyi görememiş olmak dolaylı etkiyi dışlamaz. Sonuç olarak doğrudan T hücrelerinin üzerine koyduğumuzda dramatik bir etki göremedik ve baktığımız parametreler üzerinden Reg proteinleri bu cevabı etkilememektedir. Bu proteinlerin *in vitro* ortamda doğrudan T hücreleri üzerine etkileri ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.

You ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, miR-10a-3p restorasyonunun REG3A'yı inhibe ederek Th17/Treg oranını azalttığını ve Lupus nefritinde böbrek hasarını hafiflettiğini göstermişlerdir (You ve ark., 2020). REG1A proteininin ise bu zamana kadar *in vitro* kültür ortamında T hücre farklılaşmalarına etkileri tanımlanmamıştır. Bu çalışmada ilk kez T hücre alt soylarına farklılaşmada farklı antimikrobiyal reg proteinlerinin etkileri incelenmiştir. **Th17 farklılaşmalarında** REG1A'nın yüksek dozlarının T hücrelerini öldürdüğü gözlenmiştir. Farklı lineyç farklılaşmalarında regin inhibe edici etkisi yokken sadece Th17 kondüsyonunda daha yüksek doza bağlı bir etkinin olduğunu görmekteyiz. Dolayısıyla REG1A'nın yüksek dozlardaki Th17 farklılaşmaları üzerinde bu azaltıcı etkisini hem IL-17A üretimini baskılamak hemde hücre üzerine sitotoksik etki göstermiş olma ihtimalinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Zira doza bağlı olarak FSC-SSC grafiklerinde canlı lenfosit gatelerinde daha az hücre gözlenmiştir. Buradaki Th17 üzerindeki inhibisyon etkisi sitokin kombinasyonundan kaynaklı apoptotik etkinin daha belirgin hale gelmesiyle ortaya çıkmış olabilir.

Miyeloid hücreler, IL-12, IL-23, IL-6 ve IL-1 β üreten proinflamatuvar M1 makrofajlar veya IL-10/IL-4 üreten antiinflamatuvar M2 makrofajlar T hücre cevabının oluşumunda önemli rol oynar. Bu miyeloid hücrelerin yanıtı farklılaşmış T

hücrelerinin etkisi altındadır (Milo, 2019). Çalışmamızda Reg proreininin **antijen sunan hücreler** aracılığıyla T hücre üzerine yapabileceği muhtemel etkileri değerlendirmek amacıyla dentritik hücreler farklılaştırılarak Reg proteinlerinin farklılaşmaya ve kostimülatör moleküllerin ifadelerine etkisini inceledik. Bu bağlamda REG1A'nın farklı dozları CD11c ifadesini arttırmıştır ancak yüzeydeki diğer maturasyon markırlarında dramatik bir etkisi yoktur. Literatürde bu bağlamda bir çalışma bulunmamaktadır.

Reg proteinleri **EXTL3 reseptörü** üzerinden hücelere bağlanabileceği ve bir sinyal kaskadı oluşturarak proliferasyonu etkilediği bir takım çalışmalarda rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2019). Reg3 γ -Extl3 bağlanmasının sinyal yollarını aktive ederek keratinosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir (Lai ve ark 2012). Ayrıca Reg1 α 'nın sıçanlarda EXTL-3 reseptörünü bağlayarak nörit büyümesini uyardığı bildirilmiştir (März-Weiss ve ark., 2011). Bu nedenle EXTL3 reseptörünün blokajının Reg aracılı bu hücre davranışında değişiklikler oluşturup oluşturmayacağını test etmek için EXTL3'ü susturma deneyleri yaptık ve EXTL3 susturmasının transfeksiyona etkilerini inceledik. Yaptığımız bu deneyde EXTL3'ün başarılı bir şekilde susturulduğunu konfirme ettik. EXTL3 reseptörünün susturulması proliferasyon, IL-2 üretimi ve aktivasyon markırı olan CD69 ifadesini etkilememiştir. Volpi ve arkadaşları (Volpi ve ark., 2017) *EXTL3* mutasyonlarının Primer İmmün yetmezliğe neden olduğu ve T hücre gelişimini düzenlediğini, EXTL3'ün yokluğunda T hücrelerinin gittiğini bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımız olgun T hücrelerinde EXTL3 susturmasının en azından izlediğimiz parametreler açısından dramatik etkiler yaratmadığına işaret etmektedir. Dolayısıyla EXTL3'e olan ihtiyacın T hücrelerinin erken gelişim safhalarında daha fazla olduğu yorumu yapılabilir.

Reg proteinlerinden, insan REG3A ve fare Reg3 γ , bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesine katkıda bulunan antimikrobiyal peptitler olarak işlev görür (Chen ve ark., 2019; Vaishnava ve ark., 2011). Reg3 proteinleri esas olarak ince bağırsak boyunca eksprese edilir ve bakterisidal aktivite yoluyla konakçı savunma sürecini modüle eder. Bağırsaklarda *Lactobacillus reuteri*, tip-3 doğal lenfoid hücreler (ILC3'ler) tarafından eksprese edilen aril hidrokarbon reseptörünü (AhR) aktive

ederek IL-22 sitokininin üretimi artırır. Patojen istilasına yanıt olarak hızla REG3 γ 'nin bağırsak epitelyal hücre ekspresyonu artar. (Cheng ve ark., 2019; Murray ve Perdew 2017; Sonnenberg ve ark., 2011) REG3 γ ve REG3 β , *Enterococcus faecalis* *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia pseudotuberculosis* dahil olmak üzere spesifik bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma sağlar (Abreu 2010; Burger-van Paassen ve ark., 2012; Dessein ve ark., 2009; Gallo ve Hooper 2012; Mukherjee ve Hooper 2015).

Bizde çalışmamızda Jurkatlardaki verilerimizin anlamlı olamaması nedeniyle proteinlerin çalıştığından emin olmak amacıyla Reg proteinlerinin *S.aureus* üzerinde **antimikrobiyal etkisini** değerlendirmek istedik. Her üç reg proteininin farklı konsantrasyonlarında test edilen bakteri koloni sayılarında pleylerde doza bağlı azalma belirlenmiştir. Böylece çalışmamızda kullandığımız rekombinant proteinlerin test edilmiş ve bu proteinlerin çalıştığı doğrulanmıştır.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda proteinlerimizin antimikrobiyal etkisinin olduğunu ancak sonuçlarımızın T hücre bağlamında çokta farklılıklar göstermediğini gördük. Bu veriler proteinlerin Th17 hücreleri veya farklılaşmaları üzerinde doğrudan etkileri olabileceğine bazı başka parametreler açısında ise gözlenebilir etkilerinin olmadığına işaret etmektedir. Bundan yola çıkarak bu *in vitro* verileri daha iyi anlayabilmek ve ayrıca bu hücrelerden bağımsız REG1A'nın T hücreleri üzerindeki dolaylı etkilerini de değerlendirmek amacıyla bu proteinlerin *in vivo* overekspresyonla hastalık olmayan homeostatik durumda ve hastalık durumunda etkilerini test etmeyi istedik.

5.2. REG1A Overekspresyonunun *In Vivo* Homeostatik Durumda İmmün Sistem Parametrelerine Etkileri

Önceki çalışmalar, çeşitli türlerde nöronlarda Reg ailesi proteinlerinin üyelerinin ekspresyonunu göstermiştir. REG1A'nın nöronal büyümede rol aldığı bildirilmiştir (van Ba ve ark, 2012). REG1 ve REG3 ekspresyonu, Alzheimer hastalarının plaklarında ifadesi ve beyin omurilik sıvısında varlığı rapor edilmiştir (Ozturk ve ark., 1989). Reg1a'nın daha önce nöronlarda ekspresyonunun etkilendiği bildirilmiş olduğu için biz bu çalışmada koruyucu etkisinin olabileceğini düşündük ve overekspresyonlarını denemek istedik.

Naif farelerde overekspresyonun konfirme edilmiştir. Overekspresyonun (inflamasyon olmayan durumda) 8. günü immün sistem parametrelerine baktığımızda insan REG1A proteinin sistemik overekspresyonu lenf nodda CD4⁺ T hücrelerini arttırmış, sitokin repertuvarına baktığımızda ise IL-10 ifadesini arttırmıştır. Diğer sitokinleri etkilememiştir.

İnsan REG1A overekspresyonunun naif farelerde lenf nodunda FOXP3⁺ ve CD25⁺ ifadelerini de arttırmıştır. Hem lenf nod hemde dalakta checkpoint inhibitörleri artmıştır. Naif farelerde overekspresyonu genel anlamda immün sistem parametreleri üzerine etkilerine baktığımızda lenf nodunda bir miktar etki göstermiştir. REG1A'nın lenf nodunda etkiliyor olması dalakta bu etkinin gözlemlenmemiş olması mikroçevenin bu bağlamda önemli olabileceğine işaret etmektedir.

5.3. REG1A Overekspresyonunun İnflamasyon Durumunda İmmün Sistem Parametrelerine Etkileri

REG1A proteininin hidrodinamik enjeksiyonlarla overekspresyonlarının T hücreleri üzerine etkileri *in vivo* MS fare modeli olan DOE'de incelenmiş ve bu bağlamda terapötik etkilerine ilk kez bu çalışmada bakılmıştır ve REG1A'nın bu modelde hastalık skorlarını azaltabileceği *in vivo* etkileri ilk kez bu proje önerisinde gösterilmiştir.

MOG35-55 immünizasyonu ile DOE oluşturulan farelerde hidrodinamik enjeksiyonlarla mürin Reg3g plazmidinin overekspresyonunun beyine patojen T hücre infiltrasyonunu artırdığını, Treg hücre miktarını azalttığını ve DOE şiddetini farelerde arttırdığını rapor ettik (Eken ve ark. (2021).

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada ise kullandığımız mürin REG1A'sı değil insan REG1A'sıdır. Fare Reg1 ile % 72-74 benzerlik göstermektedir (Chen ve ark., 2019). REG1A plazmidinin overekspresyonu bu çalışmada DOE Klinik skorlarını azaltmış, eğri altında kalan alan değerlerini düşürmüş ve demiyelinasyonu sınırlamıştır. İlk yapılan immünizasyon sonrasında farelerde bir defalık bir hidrodinamik enjeksiyonla REG1A overekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Fare Reg1a'sı ile benzerliği % 100 homoloji olmadığından birinci immünizasyondan sonra antikorlar geliştirebilecek ve buna bağlı olarak etkinliğini azalacaktır. O yüzden birkez yaptığımız immünizasyon

sonrasında erken dönemlerde etki daha belirgin olacaktır. İleriki çalışmalarda fare Reg1a'sı kullanılması ve deneylerin bu şekilde tekrar edilmesi bu bağlamda önem arz etmektedir.

Birçok çalışmada Treg hücrelerinin supresif hücreler olduğu ve immün hücreleri inhibe ederek MS patogenezi yavaşlattığı gösterilmiştir. (Danikowski ve ark., 2017; Mastorodemos ve ark., 2015; Ziegler, 2006). Treg hücreleri yüzeylerinde yüksek düzeyde IL-2R α (CD25)'yı da ifade eder. CD4⁺ CD25⁺ Treg hücreleri, otoimmünitenin aktif baskılanması için gereklidir (Fontenot ve ark., 2003). IL-2 reseptörü, α (CD25), β (CD122) ve γ (γ c) zincirleri olmak üzere 3 farklı alt birimden oluşur. Treg hücrelerine IL-2 sinyallerinin iletilmesi için önemli olan CD122 (β c) ve γ c ile birlikte IL-2'ye yüksek afiniteli bağlanma sağlayan CD25'in ifadesidir. IL-2 sinyal iletimi, CD25'in ekspresyonu ile gerçekleşir (Boyman ve ark., 2015). Ayrıca Treg hücreleri IL-10, IL-35 ve TGF- β gibi sitokinlerin üretiminde de önemli rol oynar (Oral, 2018). Yapılan çalışmalar IL-10'un otoimmün hastalıklarda potansiyel terapötik bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Ratlara rekombinant IL-10 uygulanması DOE gelişimini önlemektedir (Rott ve ark., 1994). MSS içindeki IL-10 mRNA ekspresyonu artışı ile DOE 'in klinik seyrinin iyileşmesi ile bir korelasyon göstermektedir (Diab ve ark., 1997; Kennedy ve ark., 1992). Bir diğer çalışmada İnflamatuvar barsak hastalığı modelinde MS hastalığında kullanılan ilaçlardan olan Glatiramer asetatın etkisine bakılmış ve TNF- α ve IL-6 üretimini azalttığını, IL-10 sitokinini arttırdığını bulmuşlardır (Touw ve ark., 2018).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise DOE farelerde (inflamasyon durumunda) 23. gün immün sistem parametrelerine baktığımızda REG1A overekspresyonu lenf nodda CD4⁺ T hücre sayısını azaltmış, Treg hücrelerinin sayısını ve aktivasyon belirteci olan CD25 ifadesini arttırmıştır. Öte yandan patojenik olan konvansiyonel Treg hücrelerinin sayısını ve CD25 ifadesini azaltmıştır. Ayrıca periferde lenf nodunda otoimmünitenin baskılanmasında görevli regülatör T hücrelerinin sayısını arttırmıştır. Ayrıca beyinde ise T hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran en önemli sitokin olan IL-2 miktarı ile proinflamatuvar sitokin olan TNF-a miktarını azaltmış ve supresif sitokin olan IL-10 miktarını ise arttırmıştır.

Ayrıca naif farelerde kontrol noktası inhibitörleri periferde artmışken, immünizasyon yaptığımız DOE farelerde kontrol noktası inhibitörleri hem periferde hemde MSS'de azalmıştır. İmmünisasyon bunu baypas etmiş olabilir.

Sonuç olarak REG1A'nın overekspresyonunun *in vivo* bir takım etkilerini daha çok periferde gözlemledik, beyinde bazı parametreler açısından dramatik bir etki gözlemlenemedi. Farelerin immünizasyondan 23 gün sonra kurban edilmüş olması dolayısıyla zamansal olarak etki aralığı kaçırılmış olabilir. Önceki çalışmalarımız hidrodinamik enjeksiyonlardan sonraki 7-10 günlük zaman aralığında ekspresyonun devam ettiği gösterilmiştir (Eken ve ark., 2011; Eken ve ark., 2014). Dolayısıyla 21 gün süreye ulaşan bu DOE deneyinde 10.günden sonra proteininin sistemik etkisinin azalması nedeniyle anti-inflamatuar etkinin azalması muhtemeldir. Daha sonraki çalışmalarda etkiyi gösterebilmek adına bu deney 2 doz enjeksiyon veya rekombinant protein verilmesi ile tekrarlanabilir.

Özetle bu çalışma kapsamında literatürde ilk kez REG1A, REG3A ve REG3G'nin primer T hücreleri, Jurkat T hücreleri üzerine etkileri *ex vivo* deneylerle karakterize edilmiş, REG1A'nın fare MS modelinde koruyucu etkileri incelenmiş ve REG1A'nın profilaktik etkinliği konusunda umut vaat eden sonuçlar alınmıştır. Bu bağlamda Erciyes üniversitesi aracılığı ile patent başvuru yapılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abraham RT, Weiss Jurkat A. T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Immunology* 2004; 4; 301-308.
- Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 131–144.
- Allenspach EJ, Finn LS, Rendi MH, Eken A, Singh AK, Oukka M, Taylor SD, Altman MC, Fligner CL, Ochs HD, Rawlings DJ, Torgerson TR. Absence of functional fetal regulatory T cells in humans causes in utero organ-specific autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*, 2017; 140(2): 616-619.e7.
- Annibali V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, Romano S, Paolillo A, Abderrahim H, Diamantini A, Borsellino G, Aloisi F, Battistini L, Salvetti M. CD161(high)CD8⁺T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain*, 2011; 134(2): 542-554.
- Arrighi RB, Nakamura C, Miyake J, Hurd H, Burgess JG. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarias. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(7): 2104-2110.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 2007; 61(4): 288-299.
- Astorri E, Guglielmi C, Bombardieri M. Circulating Reg1alpha proteins and autoantibodies to Reg1alpha proteins as biomarkers of beta-cell regeneration and damage in type 1 diabetes. *Horm Metab Res*, 2010; 42: 955-960.
- Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013; 6(12): 1543-1575.
- Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS. Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res*, 1993; 53(13): 3052-3057.

- Baranzini SE, Elfstrom C, Chang SY, Butunoi C, Murray R, Higuchi R, Oksenberg JR. Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol*, 2000; 165(11): 6576-6582.
- Bar-Or A. Immunology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 2005; 23(1): 149-175.
- Barthelme S, Maurin N, Roussey M, Férec C, Murolo S, Berthézène P, Iovanna JL, Dagorn JC, Sarles J. Evaluation of 47,213 infants in neonatal screening for cystic fibrosis, using pancreatitis-associated protein and immunoreactive trypsinogen assays. *Arch Pediatr*, 2001; 8(3): 275-281.
- Bartoli C, Baeza N, Figarella C, Pellegrini I, Figarella-Branger D. Expression of peptide-23/pancreatitis-associated protein and Reg genes in human pituitary and adenomas: comparison with other fetal and adult human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(11): 4041-4046.
- Behnsen J, Jellbauer S, Wong CP, Edwards RA, George MD, Ouyang W, Raffatellu M. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity*. 2014; 40(2): 262-273.
- Bel S, Pendse M, Wang Y, Li Y, Ruhn KA, Hassell B, Leal T, Winter SE, Xavier RJ, Hooper LV. Paneth cells secrete lysozyme via secretory autophagy during bacterial infection of the intestine. *Science*, 2017; 357: 1047-1052.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441: 235-238.
- Bhusal A, Nam Y, Seo D, Rahman MH, Hwang EM, Kim SC, Lee WH, Suk K. Cathelicidin-related antimicrobial peptide promotes neuroinflammation through astrocyte-microglia communication in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, 2022; 70(10): 1902-1926.
- Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995; 13: 61-92.
- Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG, Hancock RE. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(5): 1727-1732.

- Boyman O, Kolios AG, Raeber ME. Modulation of T cell responses by IL-2 and IL-2 complexes. *Clin Exp Rheumatol*, 2015; 33: 54-57.
- Börü ÜT, Duman A, Kulualp AŞ, Güler N, Taşdemir M, Yılmaz Ü, et al. Multiple sclerosis prevalence study: The comparison of 3 coastal cities, located in the black sea and mediterranean regions of Turkey. *Medicine*. 2018; 97 (42).
- Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med*. 2007; 204(8): 1891-1900.
- Broekaert D, Eyckerman S, Lavens D, Verhee A, Waelput W, Vandekerckhove J, Tavernier J. Comparison of leptin- and interleukin-6-regulated expression of the rPAP gene family: evidence for differential co-regulatory signals. *Eur Cytokine Netw*, 2002; 13(1): 78-85.
- Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2018; 18(6): 374-389.
- Burger-van Paassen N, Loonen LM, Witte-Bouma J, Korteland-van Male AM, de Bruijn AC, van der Sluis M, Lu P, Van Goudoever JB, Wells JM, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB. Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3 β , Reg3 γ and angiogenin-4. *PLoS One*, 2012; 7(6): e38798.
- Büyükkiraz ME. Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J Appl Microbiol*. 2022; 132(3): 1573-1596.
- CarnCELL V, LZZ AR, Ponz A, Amcosante G, Bozz A and D Gulo A. Interacton between antmcrobal peptdes (AMPs) and ther primary target, the b-omembranes. In: Mcrobal pathogens and strateges for combatng them: science, technology and educaton. *Formatex*, 2013; 1123-1134.
- Carpenter CF, Chambers HF. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(7): 994-1000.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 2006; 313(5790): 1126-1130.

- Cederlund A, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J*, 2011; 278(20): 3942-3951.
- Chakraborty C, Katsumata N, Myal Y, Schroedter IC, Brazeau P, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG. Age-related changes in peptide-23/pancreatitis-associated protein and pancreatic stone protein/reg gene expression in the rat and regulation by growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology*, 1995; 136(5): 1843-1849.
- Chao CC, Gutiérrez-Vázquez C, Rothhammer V, Mayo L, Wheeler MA, Tjon EC, Zandee SEJ, Blain M, de Lima KA, Takenaka MC, Avila-Pacheco J, Hewson P, Liu L, Sanmarco LM, Borucki DM, Lipof GZ, Trauger SA, Clish CB, Antel JP, Prat A, Quintana FJ. Metabolic control of astrocyte pathogenic activity via cPLA2-MAVS. *Cell*, 2019; 179(7): 1483-1498.e22.
- Chen Z, Downing S, Tzanakakis ES. Four decades after the discovery of regenerating islet-derived (Reg) proteins: Current understanding and challenges. *Front Cell Dev Biol*, 2019; 7: 235.
- Cheng HY, Ning MX, Chen DK, Ma WT. Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens. *Front Immunol* 2019; 10: 607-615.
- Cibrian, D. & Sanchez-Madrid, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*, 2017; 47(6): 946–953.
- Cook SD. Evidence for an infectious etiology of multiple sclerosis. *Handbook of multiple sclerosis*. 2006: 91-120.
- Cruciani RA, Barker JL, Zasloff M, Chen HC, Colamonici O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(9): 3792-3796.
- Cruz J, Ortiz C, Guzmán F, Fernández-Lafuente R, Torres R. Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Curr Med Chem*. 2014; 21(20):2299-2321.
- Danikowski KM, Jayaraman S and Prabhakar BS. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Journal of neuroinflammation*, 2017; 14: 117-125.

- Darnaud M, Dos Santos A, Gonzalez P, Augui S, Lacoste C, Desterke C, De Hertogh G, Valentino E, Braun E, Zheng J, Boisgard R, Neut C, Dubuquoy L, Chiappini F, Samuel D, Lepage P, Guerrieri F, Doré J, Bréchet C, Moniaux N, Faivre J. Enteric delivery of regenerating family member 3 alpha alters the intestinal microbiota and controls inflammation in mice with colitis. *Gastroenterology*, 2018; 154(4): 1009-1023.e14.
- de Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokx W, Dogan A, Hiemstra PS, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 2005; 125(6): 1163-1173.
- de la Monte SM, Ozturk M, Wands JR. Enhanced expression of an exocrine pancreatic protein in Alzheimer's disease and the developing human brain. *J Clin Invest*. 1990; 86(3): 1004-1013.
- De Stefano N, Giorgio A, Battaglini M, Rovaris M, Sormani MP, Barkhof F, Korteweg T, Enzinger C, Fazekas F, Calabrese M, Dinacci D, Tedeschi G, Gass A, Montalban X, Rovira A, Thompson A, Comi G, Miller DH, Filippi M. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology*. 2010; 74(23): 1868-1876.
- Dessein R, Gironella M, Vignal C, Peyrin-Biroulet L, Sokol H, Secher T, Lacas-Gervais S, Gratadoux JJ, Lafont F, Dagorn JC, Ryffel B, Akira S, Langella P, Núñez G, Sirard JC, Iovanna J, Simonet M, Chamaillard M. Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 beta expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Gut*. 2009; 58(6): 771-776.
- Dhar DK, Udagawa J, Ishihara S. Expression of regenerating gene I in gastric adenocarcinomas: correlation with tumor differentiation status and patient survival. *Cancer* 2004; 100: 1130-1136.
- Diab A, Zhu J, Xiao BG, Mustafa M, Link H. High IL-6 and low IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(6): 641-650.

- Dieckgraefe BK, Crimmins DL, Landt V, Houchen C, Anant S, Porche-Sorbet R, Ladenson JH. Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *J Investig Med*, 2002; 50(6): 421-434.
- Dusetti NJ, Frigerio JM, Fox MF. Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the human pancreatitis-associated protein (PAP) gene. *Genomics* 1994; 19: 108-114.
- Edwards JA, Tan N, Toussaint N. Role of regenerating islet-derived proteins in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2020; 26(21): 2702-2714.
- Eken A, Erdem S, Haliloglu Y, Zehra Okus F, Cakir M, Fatih Yetkin M, Akcakoyunlu M, Karayigit MO, Azizoglu ZB, Bicer A, Gur TN, Aslan K, Hora M, Oukka M, Altuntas HD, Ufuk Nalbantoglu O, Gundogdu A, Mirza M, Canatan H. Temporal overexpression of IL-22 and Reg3 γ differentially impacts the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*. 2021; 164(1): 73-89.
- Eken A, Ortiz V, Wands JR. Ethanol inhibits antigen presentation by dendritic cells. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18(7): 1157-1166.
- Eken A, Singh AK, Treuting PM, Oukka M. IL-23R⁺ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal Immunol*, 2014; 7(1): 143-154.
- Fehlbaum P, Bulet P, Chemysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3): 1221-1225.
- Filippi M, Rocca MA. MRI evidence for multiple sclerosis as a diffuse disease of the central nervous system. *J Neurol*. 2005; 252 Suppl 5: v16-24.
- Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*, 2011; 11(1): 37-51.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003; 4(4): 330-336.

- Fox JL. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nat Biotechnol*, 2013; 31(5): 379-382.
- Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*, 2012; 12(7): 503-516.
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3(9): 710-720.
- Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, Li T, Yin Y. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018; 8: 13.
- Giovannoni F, Quintana FJ. The role of astrocytes in CNS inflammation. *Trends Immunol*, 2020; 41(9): 805-819.
- Gironella M, Calvo C, Fernández A, Closa D, Iovanna JL, Rosello-Catafau J, Folch-Puy E. Reg3 β deficiency impairs pancreatic tumor growth by skewing macrophage polarization. *Cancer Res*, 2013; 73(18): 5682-5694.
- Gironella M, Iovanna JL, Sans M, Gil F, Peñalva M, Closa D, Miquel R, Piqué JM, Panés J. Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2005; 54(9): 1244-1253.
- Giuliani A, Pirri G, Bozzi A, Di Giulio A, Aschi M, Rinaldi AC. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 65(16): 2450-2460.
- Giuliani F, Goodyer CG, Antel JP, Yong VW. Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*, 2003; 171(1): 368-379.
- Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res*, 2005; 30(7): 505-515.
- Grigoriadis N, van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol* 2015; 22: 3-13.
- Gross J, Carlson RI, Brauer AW, Margolies MN, Warshaw AL, Wands JR. Isolation, characterization, and distribution of an unusual pancreatic human secretory protein. *J Clin Invest*, 1985; 76(6): 2115-2126.
- Guangshun Wang Human antimicrobial peptides and proteins.. *Pharmaceuticals* 2014, 7, 545-594; doi:10.3390/ph705054.

- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*, 2011; 7(7): e1002158.
- Guo Q, Lan T, Chen Y; Xu Y, Peng J, Tao L, Shen X. Enhanced of antibacterial activity of antibiotic-functionalized silver nanocomposites with good biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 2019, 30 (3).
- Hancock RE, Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett*, 2002; 206(2): 143-149.
- Hancock RE. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol*. 1997; 5(1): 37-42.
- Harada K, Zen Y, Kanemori Y, Chen TC, Chen MF, Yeh TS, Jan YY, Masuda S, Nimura Y, Takasawa S, Okamoto H, Nakanuma Y. Human REG I gene is up-regulated in intrahepatic cholangiocarcinoma and its precursor lesions. *Hepatology*, 2001; 33(5): 1036-1042.
- Hartupée JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1518(3): 287-293.
- Hauser SL, Cree BAC. Treatment of multiple sclerosis: A review. *Am J Med*, 2020; 133(12): 1380-1390.e2.
- Held K, Beltrán E, Moser M, Hohlfeld R, Dornmair K. T-cell receptor repertoire of human peripheral CD161hiTRAV1-2⁺ MAIT cells revealed by next generation sequencing and single cell analysis. *Hum Immunol*, 2015; 76(9): 607-614.
- Hendriks T, Schnabl B. Antimicrobial proteins: intestinal guards to protect against liver disease. *J Gastroenterol*, 2019; 54(3): 209-217.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999; 284(5418): 1313-318.
- <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000012232-EXTL3/blood>. Erişim Tarihi: 7.09.2020.

- Hu D, Notarbartolo S, Croonenborghs T, Patel B, Cialic R, Yang T, Aschenbrenner D, Andersson KM, Gattorno M, Pham M, Kivisakk P, Pierre IV, Lee Y, Kiani K, Bokarewa M, Tjon E, Pochet N, Sallusto F, Kuchroo VK, Weiner HL. Transcriptional signature of human pro-inflammatory Th17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis. *Nat Commun*, 2017; 8(1): 1600.
- Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol*, 2020; 11: 582779.
- Iacob S, Iacob DG, Luminos LM. Intestinal microbiota as a host defense mechanism to infectious threats. *Front Microbiol*, 2019; 9: 3328.
- Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*, 2005; 52: 381-90; quiz 391-382.
- İliçin GBK, Süleymanler G, Ünal S. Multipl skleroz ve demiyelinizan hastalıklar. Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul 3. Baskı, 2012.
- Johansson M, Phillipson M, Petersson J, Gunnar CH. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci US*, 2008;105: 15064-15069.
- Kamysz W, Okrój M, Łukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol*. 2003; 50(2): 461-469.
- Katakura K, Watanabe H, Ohira H. Innate immunity and inflammatory bowel disease: a review of clinical evidence and future application. *Clin J Gastroenterol*, 2013; 6(6): 415-409.
- Katsumata N, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP, Friesen HG. Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. *Endocrinology*, 1995; 136(4): 1332-1339.
- Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol*, 1992; 149 (7): 2496-2505.

- Kieffer AE, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, Gasnier C, Aunis D, Metz-Boutigue MH. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J*, 2003; 17(6): 776-778.
- Kleinkauf H, von Döhren H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem*, 1990; 192(1): 1-15.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol*, 2011; 12(3): 231-238.
- Krieger SC, Sumowski J. New insights into multiple sclerosis clinical course from the topographical model and functional reserve. *Neurol Clin*, 2018; 36(1): 13-25.
- Krishnan S, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan GV, Sherr DH, Yarmush ML, Alaniz RC, Jayaraman A, Lee K. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages. *Cell Rep*, 2018; 23(4): 1099-1111.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 2002; 125(10): 2202-2212.
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 2009; 30(3): 131-141.
- Lai Y, Li D, Li C, Muehleisen B, Radek KA, Park HJ, Jiang Z, Li Z, Lei H, Quan Y, Zhang T, Wu Y, Kotol P, Morizane S, Hata TR, Iwatsuki K, Tang C, Gallo RL. The antimicrobial protein REG3A regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity*. 2012; 37(1): 74-84.
- Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, Koren O, Nookaew I, Fricker A, Nielsen J, Ley RE, Bäckhed F. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut*, 2012; 61(8): 1124-1131.
- Lasserre C, Christa L, Simon MT, Vernier P, Bréchet C. A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. *Cancer Res*, 1992; 52(18): 5089-5095.

- Lasserre C, Simon MT, Ishikawa H, Diriong S, Nguyen VC, Christa L, Vernier P, Brechot C. Structural organization and chromosomal localization of a human gene (HIP/PAP) encoding a C-type lectin overexpressed in primary liver cancer. *Eur J Biochem*, 1994; 224(1): 29-38.
- Lee JS, Cella M, McDonald KG, Garlanda C, Kennedy GD, Nukaya M, Mantovani A, Kopan R, Bradfield CA, Newberry RD, Colonna M. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch *Nat Immunol*, 2011; 13(2): 144-151.
- Lehotzky RE, Partch CL, Mukherjee S, Cash HL, Goldman WE, Gardner KH, Hooper LV. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107(17): 7722-7772.
- Li Q, Wang H, Zogopoulos G, Shao Q, Dong K, Lv F, Nwilati K, Gui XY, Cuggia A, Liu JL, Gao ZH. Reg proteins promote acinar-to-ductal metaplasia and act as novel diagnostic and prognostic markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(47): 77838-77853.
- Lieu HT, Batteux F, Simon MT, Cortes A, Nicco C, Zavala F, Pauloin A, Tralhao JG, Soubrane O, Weill B, Br  chot C, Christa L. HIP/PAP accelerates liver regeneration and protects against acetaminophen injury in mice. *Hepatology*, 2005; 42(3): 618-626.
- Lindholm P, G  ransson U, Johansson S, Claeson P, Gullbo J, Larsson R, Bohlin L, Backlund A. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. *Mol Cancer Ther*, 2002; 1(6): 365-369.
- Liu X, Wang J, Wang H, Yin G, Liu Y, Lei X, Xiang M. REG3A accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition: Involvement of a REG3A-JAK2/STAT3 positive feedback loop. *Cancer Lett*, 2015; 362(1): 45-60.
- Liu X, Zhou Z, Cheng Q, Wang H, Cao H, Xu Q, Tuo Y, Jiang L, Zou Y, Ren H, Xiang M. Acceleration of pancreatic tumorigenesis under immunosuppressive microenvironment induced by Reg3g overexpression. *Cell Death Dis*, 2017; 8(9): e3033.

- Livesey FJ, O'Brien JA, Li M, Smith AG, Murphy LJ, Hunt SP. A Schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. *Nature*, 1997; 390(6660): 614-8.
- Mabuchi T, Takekoshi T, Hwang ST. Epidermal CCR6⁺ $\gamma\delta$ T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasiform dermatitis. *J Immunol*, 2011; 187(10): 5026-5031.
- Macadam RC, Sarela AI, Farmery SM. Death from early colorectal cancer is predicted by the presence of transcripts of the REG gene family. *Br J Cancer* 2000; 83: 188-195.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Biology of microorganisms*. 8. Ed. Prentice Hall International Inc USA 1997: 52-108.
- Mahlapu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6: 194.
- Malhotra N, Yoon J, Leyva-Castillo JM, Galand C, Archer N, Miller LS, Geha RS. IL-22 derived from $\gamma\delta$ T cells restricts *Staphylococcus aureus* infection of mechanically injured skin. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138(4): 1098-1107.e93.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*, 2013; 229(2): 176-185.
- Martin R, Sospedra M, Rosito M, Engelhardt B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur J Immunol*, 2016; 46(9): 2078-2090.
- März-Weiss P, Kunz D, Bimmler D, Berkemeier C, Özbek S, Dimitriadis-Schmutz B, Haybaeck J, Otten U, Graf R. Expression of pancreatitis-associated protein after traumatic brain injury: a mechanism potentially contributing to neuroprotection in human brain. *Cell Mol Neurobiol*, 2011; 31(8): 1141-1149.

- Mastorodemos V, Ioannou M, Verginis P. Cell-based modulation of autoimmune responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications. *Neuroimmunomodulation*. 2015; 22(3): 181-195.
- Mayo L, Trauger SA, Blain M, Nadeau M, Patel B, Alvarez IJ, Mascanfroni DI, Yeste A, Kivisäkk P, Kallas K, Ellezam B, Bakshi R, Prat A, Antel JP, Weiner HL, Quintana FJ. B4GALT6 regulates astrocyte activation during CNS inflammation. *Nat.Med*, 2014; 20(10): 1147-1156.
- McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of cytokines in health and disease. *Immunity*. 2019; 50(4): 892-906.
- Medana IM, Gallimore A, Oxenius A, Martinic MM, Wekerle H, Neumann H. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol*, 2000; 30(12): 3623-3633.
- Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*, 2010; 9(5): A387-394.
- Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*, 2014; 13: 518-524.
- Milo, R. Therapies for multiple sclerosis targeting B cells *Med J*. 2019; 60(2): 87-98.
- Minamiya Y, Kawai H, Saito H, Ito M, Hosono Y, Motoyama S, Katayose Y, Takahashi N, Ogawa JI. REG1A expression is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008; 60(1): 98-104.
- Moretta A, Scieuzo C, Petrone AM, Salvia R, Manniello MD, Franco A, Lucchetti D, Vassallo A, Vogel H, Sgambato A, Falabella P. Antimicrobial peptides: a new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021; 11: 668632.
- Morhardt TL, Hayashi A, Ochi T, Quirós M, Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Kuffa P, Atarashi K, Honda K, Kao JY, Nusrat A, Kamada N. IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Sci Rep*, 2019; 9, 1223.

- Motoyama S, Sugiyama T, Ueno Y, Okamoto H, Takasawa S, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Okuyama M, Ogawa J. REG I expression predicts long-term survival among locally advanced thoracic squamous cell esophageal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by esophagectomy. *Ann Surg Oncol*, 2006; 13(12): 1724-1731.
- Mueller CM, Zhang H, Zenilman ME. Pancreatic reg I binds MKP-1 and regulates cyclin D in pancreatic-derived cells. *J Surg Res*, 2008; 150(1): 137-143.
- Mukherjee S, Hooper LV. Antimicrobial defense of the intestine. *Immunity*, 2015; 42: 28-39.
- Mukherjee S, Zheng H, Derebe MG, Callenberg KM, Partch CL, Rollins D, Prohete DC, Rizo J, Grabe M, Jiang QX, Hooper LV. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature*, 2014; 505: 103-107.
- Muniz LR, Knosp C, Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front Immunol*. 2012; 3: 310.
- Murray IA, Perdew GH. Ligand activation of the Ah receptor contributes to gastrointestinal homeostasis. *Curr Opin Toxicol*, 2017; 2: 15-23.
- Murray TJ. Robert Carswell: the first illustrator of MS. *Int MS J*, 2009; 16(3): 98-101.
- Muzaki ARBM, Soncin I, Setiagani YA, Sheng J, Tetlak P, Karjalainen K, Ruedl C. Long-lived innate IL-17-producing γ/δ T cells modulate antimicrobial epithelial host defense in the colon. *J Immunol*, 2017; 199(10): 3691-3699.
- Mwangi J, Yin Y, Wang G, Yang M, Li Y, Zhang Z, Lai R. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019; 116(52): 26516-26522.
- Narayana, JL, Chen, JY. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents, *Peptides*, 2015; 72, 88-94.
- Nicolas P, Vanhoye D, Amiche M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides*. 2003; 24(11): 1669-1680.

- Nissen-Meyer J, Nes IF. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, 1997; 167(2): 67-77.
- Ogawa H, Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Unno M, Takahashi K, Kitayama T, Matsuno S, Ohtani H, Takasawa S, Okamoto H, Sasaki I. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflamm Bowel Dis*, 2003; 9(3): 162-170.
- Okamoto H, Takasawa S. Recent advances in the Okamoto model: the CD38-cyclic ADP-ribose signal system and the regenerating gene protein (Reg)-Reg receptor system in beta-cells. *Diabetes*, 2002; 5: S462-473.
- Okamoto H. The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 1999; 6(3): 254-262.
- Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med*, 2017; 49: e338.
- Oral HB. Transplantasyonda regülatör T hücrelerinin Rolü. *Uludağ Üniversitesi İmmünoloji ABD*, 2018.
- Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, Otani H, Takasawa S, Okamoto H, Kinoshita Y. Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. *Oncogene*, 2007; 26(3): 349-359.
- Otte JM, Zdebik AE, Brand S, Chromik AM, Strauss S, Schmitz F, Steinstraesser L, Schmidt WE. Effects of the cathelicidin LL-37 on intestinal epithelial barrier integrity. *Regul Pept*, 2009; 156: 104-117.
- Oud MM, Tuijnburg P, Hempel M, van Vlies N, Ren Z, Ferdinandusse S, Jansen MH, Santer R, Johannsen J, Bacchelli C, Alders M, Li R, Davies R, Dupuis L, Cale CM, Wanders RJA, Pals ST, Ocaña L, James C, Müller I, Lehmberg K, Strom T, Engels H, Williams HJ, Beales P, Roepman R, Dias P, Brunner HG, Cobben JM, Hall C, Hartley T, Le Quesne Stabej P, Mendoza-Londono R, Davies EG, de Sousa SB, Lessel D, Arts HH, Kuijpers TW. Mutations in

- EXTL3 cause neuro-immuno-skeletal dysplasia syndrome. *Am J Hum Genet*, 2017; 100(2): 281-296.
- Ozturk M, de la Monte SM, Gross J, Wands JR. Elevated levels of an exocrine pancreatic secretory protein in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86(2): 419-423.
- Parikh A, Stephan AF, Tzanakakis ES. Regenerating proteins and their expression, regulation and signaling. *Biomol Concepts*, 2012; 3(1): 57-70.
- Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2006; 4(7): 529-536.
- Planas R, Pujol-Autonell I, Ruiz E, Montraveta M, Cabre E, Lucas-Martin A, Pujol-Borrell R, Martinez-Caceres E, Vives-Pi M. Regenerating gene Ia is a biomarker for diagnosis and monitoring of celiac disease: a preliminary study. *Transl Res*, 2011; 158(3): 140-145.
- Porterfield M, Zhao P, Han H, Cunningham J, Aoki K, Von Hoff DD, Demeure MJ, Pierce JM, Tiemeyer M, Wells L. Discrimination between adenocarcinoma and normal pancreatic ductal fluid by proteomic and glycomic analysis. *J Proteome Res*, 2014; 13(2): 395-407.
- Qiu YS, Liao GJ, Jiang NN. REG3A overexpression suppresses gastric cancer cell invasion, proliferation and promotes apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2018; 41(6): 3167-3174.
- Quintana FJ, Especial A, Pérez-Sánchez S, Farez MF. Inmunopatología de la esclerosis múltiple. *Medicina* 2014;74(1): 404-410.
- Raivich G, Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004; 46(3): 261-281.
- Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 2004; 24(6): 536-547.
- Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol*, 2021; 21(4): 221-232.

- Robinson WE Jr, McDougall B, Tran D, Selsted ME. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J Leukoc Biol*, 1998; 63(1): 94-100.
- Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The immune response in multiple sclerosis. *Annu Rev Pathol* 2022; 17: 121-139.
- Rott O, Fleischer B, Cash E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol*, 1994; 24(6): 1434-40.
- Sarles J, Barthelémy S, Férec C, Iovanna J, Roussey M, Farriaux JP, Toutain A, Berthelot J, Maurin N, Codet JP, Berthézène P, Dagorn JC. Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1999; 80(2): F118-22.
- Sarles J, Berthézène P, Le Louarn C, Somma C, Perini JM, Catheline M, Mirallié S, Luzet K, Roussey M, Farriaux JP, Berthelot J, Dagorn JC. Combining immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein assays, a method of newborn screening for cystic fibrosis that avoids DNA analysis. *J Pediatr*, 2005; 147(3): 302-305.
- Sbardella E, Tona F, Petsas N, Pantano P. DTI Measurements in multiple sclerosis: Evaluation of brain damage and clinical implications. *Mult Scler Int*. 2013; 2013: 671730.
- Schuijt TJ, van der Poll T, de Vos WM, Wiersinga WJ. The intestinal microbiota and host immune interactions in the critically ill. *Trends Microbiol*, 2013; 21(5): 221-229.
- Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. REG Ialpha protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008; 29(1): 76-83.
- Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Kusaka T, Ueno S, Nakase H, Seno H, Fujimori T, Chiba T. Possible role of REG Ialpha protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut*, 2005; 54(10): 1437-1444.

- Shah T, Baloch Z, Shah Z, Cui X, Xia X. The intestinal microbiota: Impacts of antibiotics therapy, colonization resistance, and diseases. *Int J Mol Sci*, 2021; 22(12): 6597.
- Shin JH, Seeley RJ. REG3 proteins as gut hormones? *Endocrinology* 2019; 160(6): 1506-1514.
- Sommerburg O, Krulisova V, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, Happich M, Kulozik AE, Votava F, Balascakova M, Skalicka V, Stopsack M, Gahr M, Macek M Jr, Mall MA, Hoffmann GF. Comparison of different IRT-PAP protocols to screen newborns for cystic fibrosis in three central European populations. *J Cyst Fibros*, 2014; 13(1): 15-23.
- Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*, 2011; 12(5): 383-390.
- Sotolongo J, Ruiz J, Fukata M. The role of innate immunity in the host defense against intestinal bacterial pathogens. *Curr Infect Dis Rep*, 2012; 14(1): 15-23.
- Steinbach S, Vordermeier HM, Jones GJ. CD4⁺ and gammadelta T cells are the main producers of IL-22 and IL-17A in lymphocytes from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Sci Rep*, 2016; 6: 29990.
- Stephens LA, Malpass KH, Anderton SM. Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3⁺ Treg. *Eur J Immunol*. 2009; 39(4): 1108-1117.
- Stuart BAR, Frantza AL, E L. Regulatory roles of antimicrobial peptides in the nervous system: implications for neuronal aging. *Front Cell Neurosci*, 2022; 16: 843790.
- Syder AJ, Oh JD, Guruge JL, O'Donnell D, Karlsson M, Mills JC, Björkholm BM, Gordon JI. The impact of parietal cells on *Helicobacter pylori* tropism and host pathology: an analysis using gnotobiotic normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100(6): 3467-3472.
- Takasawa S, Ikeda T, Akiyama T, Nata K, Nakagawa K, Shervani NJ, Noguchi N, Murakami-Kawaguchi S, Yamauchi A, Takahashi I, Tomioka-Kumagai T,

- Okamoto H. Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic beta-cell regeneration. *FEBS Lett*, 2006; 580(2): 585-591.
- Takasawa S, Okamoto H. Pancreatic beta-cell death, regeneration and insulin secretion: roles of poly(ADP-ribose) polymerase and cyclic ADP-ribose. *Int J Exp Diabetes Res*, 2002; 3(2): 79-96.
- Takasawa S. Regenerating gene (REG) product and its potential clinical usage. *Expert Opin Ther Targets*, 2016; 20: 541-550.
- Tamamura H, Waki M, Imai M, Otaka A, Ibuka T, Waki K, Miyamoto K, Matsumoto A, Murakami T, Nakashima H, Yamamoto N, Fujii N. Downsizing of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 (Tyr5,12, Lys7-polyphemusin II), with the maintenance of anti-HIV activity and solution structure. *Bioorg Med Chem*, 1998; 6(4): 473-479.
- Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H. A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem*, 1988; 263(5): 2111-2114.
- Thaiss CA, Levy M, Suez J, Elinav E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Curr Opin Immunol*, 2014; 26:41-48.
- Thomas M, Pierson M, Uprety T, Zhu L, Ran Z, Sreenivasan CC, Wang D, Hause B, Francis DH, Li F, Kaushik RS. Comparison of porcine airway and intestinal epithelial cell lines for the susceptibility and expression of pattern recognition receptors upon influenza virus infection. *Viruses*. 2018; 10(6): 312.
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018; 17(2): 162-173.
- Toubal A, Nel I, Lotersztajn S, Lehuen A. 2019. Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nat.Rev. Immunol*, 19: 643–657.
- Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2009; 8(3): 280-291.

- Triebel F, Hercend T. Subpopulations of human peripheral T gamma delta lymphocytes. *Immunol Today*. 1989; 10(6): 186-188.
- Tsuchida C, Sakuramoto-Tsuchida S, Taked M, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Misu M, Shobatake R, Uchiyama T, Makino M, Pujol-Autonell I, Vives-Pi M, Ohbayashi C, Takasawa S. Expression of REG family genes in human inflammatory bowel diseases and its regulation. *Biochem Biophys Rep*, 2017; 12: 198-205.
- Türk Börü Ü, Duman A, Kulualp AŞ, Güler N, Taşdemir M, Yılmaz Ü, Alp R, Bölük C. Multiple sclerosis prevalence study: The comparison of 3 coastal cities, located in the black sea and mediterranean regions of Turkey. *Medicine*. 2018; 97(42): e12856.
- Tyler CJ, McCarthy NE, Lindsay JO, Stagg AJ, Moser B, Eberl M. Antigen-presenting human $\gamma\delta$ T cells promote intestinal CD4⁺ T cell expression of IL-22 and mucosal release of calprotectin. *J Immunol*, 2017; 198(9): 3417-3425.
- Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(52): 20858-20863.
- Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, 2011; 334(6053): 255-258.
- Valentini M, Piermattei A, Di Sante G, Migliara G, Delogu G, Ria F. Immunomodulation by gut microbiota: role of Toll-like receptor expressed by T cells. *J Immunol Res*, 2014; 2014: 586939.
- Valeri M, Raffatellu M. Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection. *Pathog Dis*. 2016; 74(9): ftw111.
- van Ba IAT, Marchal S, François F. Regenerating islet-derived 1 α (Reg-1 α) protein is new neuronal secreted factor that stimulates neurite outgrowth via exostosin tumor-like 3 (EXTL3) receptor. *J Biol Chem* 2012; 287: 4726-4739.

- van Beelen Granlund A, Ostvik AE, Brenna O, Torp SH, Gustafsson BI, Sandvik AK. REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation. *Cell Tissue Res*, 2013; 352(3): 639-646.
- van den Berg, L. M. et al. Langerhans cell-dendritic cell cross-talk via langerin and hyaluronic acid mediates antigen transfer and cross-presentation of HIV-1. *J Immunol*, 2015; 195: 1763-1773.
- van der Touw W, Kang K, Luan Y, Ma G, Mai S, Qin L, Bian G, Zhang R, Mungamuri SK, Hu HM, Zhang CC, Aaronson SA, Feldmann M, Yang WC, Chen SH, Pan PY. Glatiramer acetate enhances myeloid-derived suppressor cell function via recognition of paired ig-like receptor B. *J Immunol*, 2018; 201(6): 1727-1734.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008; 9(5): 503-510.
- Vollmer T, Preiningerova J, Waxman S. Multiple sclerosis. *eLS*. 2002.
- Volpi S, Yamazaki Y, Brauer PM. EXTL3 mutations cause skeletal dysplasia, immune deficiency, and developmental delay. *J Exp Med*, 2017; 214(3): 623-637.
- Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2014; 7(5): 545-594.
- Watanabe T, Yonekura H, Terazono K, Yamamoto H, Okamoto H. Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissues. The reg protein, pancreatic stone protein, and pancreatic thread protein are one and the same product of the gene. *J Biol Chem*, 1990; 265: 7432-7439.
- Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 1995; 13(1): 119-46.
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev*. 1998; 163: 19-34.

- Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, Li Z, Zandee SEJ, Couturier CP, Watson BR, Scalisi G, Alkwai S, Rothhammer V, Rotem A, Heyman JA, Thaploo S, Sanmarco LM, Ragoussis J, Weitz DA, Petrecca K, Moffitt JR, Becher B, Antel JP, Prat A, Quintana FJ. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*. 2020; 578(7796): 593-599.
- Wheeler MA, Jaronen M, Covacu R, Zandee SEJ, Scalisi G, Rothhammer V, Tjon EC, Chao CC, Kenison JE, Blain M, Rao VTS, Hewson P, Barroso A, Gutiérrez-Vázquez C, Prat A, Antel JP, Hauser R, Quintana FJ. Environmental control of astrocyte pathogenic activities in CNS inflammation. *Cell*, 2019; 176(3): 581-596.e18.
- Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 2010; 1(5): 440-464.
- Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest*. 2001; 81(3): 263-281.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*, 2006; 36(5): 1309-1323.
- Wu Y, Quan Y, Liu Y. Hyperglycaemia inhibits REG3A expression to exacerbate TLR3- mediated skin inflammation in diabetes. *Nat Commun*, 2016; 7(1): 13393.
- Xu Q, Fu R, Yin G. Microarray-based gene expression profiling reveals genes and pathways involved in the oncogenic function of REG3A on pancreatic cancer cells. *Gene* 2016; 578(2): 263-273.
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*, 2014; 211(8): 1533-1549.
- Yang J, Li L, Raptis D. Pancreatic stone protein/regenerating protein (PSP/reg): a novel secreted protein up-regulated in type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*, 2015; 48: 856-862.

- Ye Y, Xiao L, Wang SJ. Up-regulation of REG3A in colorectal cancer cells confers proliferation and correlates with colorectal cancer risk. *Oncotarget* 2016; 7(4): 3921.
- Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003; 55(1): 27-55.
- Yitbarek A, Taha-Abdelaziz K, Hodgins DC, Read L, Nagy É, Weese JS, Caswell JL, Parkinson J, Sharif S. Author Correction: Gut microbiota-mediated protection against influenza virus subtype H9N2 in chickens is associated with modulation of the innate responses. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 16367.
- Yonemura Y, Sakurai S, Yamamoto H. REG gene expression is associated with the infiltrating growth of gastric carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 1394-400.
- Yonemura Y, Takashima T, Miwa K. Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors: Evidence of islet b-cell regeneration. *Diabetes*, 1984; 33: 401-404.
- You G, Cao H, Yan L, He P, Wang Y, Liu B, Shao F. MicroRNA-10a-3p mediates Th17/Treg cell balance and improves renal injury by inhibiting REG3A in lupus nephritis. *Int Immunopharmacol*, 2020; 88: 106891.
- Zarobkiewicz MK, Kowalska W, Roliński J, Bojarska-Junak A A. $\gamma\delta$ T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 2019; 330: 67-73.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; 415(6870): 389-395.
- Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 2013; 39(2): 372-385.
- Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*, 2005; 272(24): 6179-6217.
- Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol*. 2016; 26(1): R14-19.
- Zhang YW, Ding LS, Lai MD. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12): 2635-2641.

- Zhao D, Kim YH, Jeong S. Survival signal REG3 α prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 2018; 128: 4970-4979.
- Zhao J, Wang J, Wang H, Lai M. Reg proteins and their roles in inflammation and cancer of the human digestive system. *Adv Clin Chem*, 2013; 61: 153-73.
- Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 209-226.
- Zong X, Fu J, Xu B, Wang Y, Jin M. Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Anim Nutr*, 2020; 6(4): 389-396.



EKLER



Tarih: 03.02.2021

Toplantı Sayısı: 02

Karar No:21/40

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 03.02.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
İzzet Burçin SATICIOĞLU	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.'dan Doç.Dr.Ahmet EKER tarafından sunulan "Regenerating Islet-Derived Protein Ailesi Üyelerinin Fare CD4+ T Hücre Biyolojisine Etkilerinin Karakterizasyonu ve Farede Geliştirilen Deneysel Otoimmün Eşefalit (EAE) Modellerinde Terapötik Değerinin Belirlenmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 03.02.2021

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza :

REG AİLESİNE AİT REG1A, REG3A VE REG3G' NİN JURKAT HÜCRELERİNİN BİYOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 11	% 2	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 3
3	"T hücre immunitesi", 'Galenos Yayınevi' İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.science.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	Ahmet Eken, Serife Erdem, Yesim Haliloglu, Fatma Zehra Okus et al. "Temporal Overexpression of IL-22 and Reg3γ differentially Impacts the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", Immunology, 2021 Yayın	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

ZEHRA BÜŞRA AZİZOĞLU

Öğrenim Bilgisi

Doktora: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Tıbbi Biyoloji

Tez adı: REG ailesine ait REG1A, REG3A ve REG3G' nın Jurkat hücrelerinin biyolojisi üzerine etkilerinin incelenmesi

Yüksek Lisans: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Mikrobiyoloji

Tez adı: Pseudomonas aeruginosa suşlarında virülans faktörlerinin fenotipik yöntemlerle araştırılması (2016)

Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Pr. (İÖ)

Tez adı: Bacillus cinsine ait yerel bakteri izolatlarında kitinaz genlerinin taranması ve bu izolatların antifungal aktivitelerinin araştırılması (2017)

Lisans: Erciyes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji (2013)

Görev Aldığı Projeler

1. **Erciyes BAP-** 2HGın Teröpatik Etkisinin MOG3555 Peptidi ile İndüklenen Fare Multiple Skleroz Modelinde İncelenmesi, (2022-)
2. **Erciyes BAP-** Akut ve kronik immüntrombositopeni hastalarında mukoza ilişkili değişmez T hücrelerinin'MAIT CELLS' incelenmesi (2021-2023)
3. **Erciyes BAP 8751.** Umbilikal kord kanında Hematopoetik Kök Hücre ve MAIT(Mucosal Associated Invariant T Cell) hücreleri miktarı ile İntrauterin Gelişim Geriliğine yol açan Morbidly Adherat Placenta (MAP), Gebelik Hipertansiyonu ve Gestasyonel Diyabet arasındaki ilişkinin araştırılması, (2019-2020)
4. **Tübitak 3501-Proje no:** 215S725. Grup 3 doğal lenfoid hücreler'in (ILC3), CD4⁺ düzenleyici T hücrelerinin (Treg) gelişim ve immüno-supresif fonksiyonlarına etkisinin incelenmesi, (2016- 2020)

5. **Tübitak-1003-** Proje no:315S315-Multiple Skleroz (Ms) Fare Modelinde Interleukin-22 (IL-22) Sitokini Modülasyonunun Terapötik Potansiyelinin Araştırılması, (2017- 2019)
6. **BİDEB-2232-**Geri Dönüş-IL-15 Sitokininin İnsan Dendritik Hücreleri Tarafından IL-23 Üretimine Etkisinin İncelenmesi, (2016-2018)

Ödüller

1. YÖK 100/2000 Doktora bursu
2. TÜBA GEBİP Ödülü bursu (Danışman: Doç. Dr. Ahmet EKEN, Doktora Öğrencisi: Zehra BÜŞRA AZİZOĞLU
3. Tübitak 1001 Bursiyeri

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Haliloglu, Y, Ozcan A, Erdem S, **Azizoglu ZB**, et al. (2022). Characterization of cord blood CD3⁺ TCRV α 7. 2⁺ CD161high T and innate lymphoid cells in the pregnancies with gestational diabetes, morbidly adherent placenta, and pregnancy hypertension diseases. American Journal of Reproductive Immunology 88: e13555.
2. Alsawaf Mb, Verboon Jm, Doğan Me, **Azizoglu ZB**, Okus F Z, Özcan A, et al. (2022). A novel missense mutation outside the DNAJ domain of DNAJC21 is associated with Shwachman-Diamond syndrom. British Journal Of Haematology, 197, 6.
3. Okus Zf, **Azizoglu ZB**, Canatan H, Eken A. S1P analogues SEW2871, BAF312 and FTY720 affect human Th17 and Treg generation ex vivo, (2022) Int Immunopharmacol. 107:108665. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108665>.
4. Yılmaz E, **Azizoglu ZB** et al. (2021) Therapeutic effects of Vitamin D and IL-22 on methotrexate-induced mucositis in mice,. Anti-Cancer Drugs.doi: 10.1097/cad.0000000000001128.
5. **Azizoglu ZB**, Yılmaz S, Azizoglu U, Karabörklü S, Temizgul R, Ayvaz A, (2021). Molecular characterization of the chitinase genes of native Bacillus thuringiensis isolates and their antagonistic activity against three important phytopathogenic fungi. Biologia. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00802-0>.

6. Eken A, Erdem S, Haliloglu Y, Okus Fz, Cakır M, Yetkin Mf, Akcakkoyunlu M, Karayığıt Mo, **Azizoglu ZB**, et al. (2021). Temporal Overexpression of IL-22 and Reg3 γ Differentially Impacts the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Immunology doi: 10.1111/imm.13340.
7. Goktas S, **Azizoglu ZB**, Petersheim D, Erdogan M, Gungor He, Bısgın A, et al. (2021). A novel intronic mutation reduces HAX1 level and is associated with severe congenital neutropenia. J Pediatr Hematol Oncol.;44(1):e62–7.
8. Türkoğlu Em, Erdem Ş, Bıçer A, Okus Fz, Özcan A, **Azizoglu ZB** et al. (2020). Impact of Intrauterine Growth Restriction Diseases on The Umbilical Cord Blood CD34⁺ Cell Counts: Morbidly Adherent Placenta and umbilical cord blood CD34⁺ cells. The Journal of Pediatric Academy, 1(2), 56-61.
9. Eken A, Cansever M, Okus Fz, Erdem S, Nam E, **Azizoglu ZB**, et al. (2020). ILC3 deficiency and generalized ILC abnormalities in DOCK8-deficient patients. Allergy 75(4):921–32. doi: 10.1111/all.14081
10. Eken A, Yetkin Mf, Okus Fz, Erdem S, Cakır M, Haliloglu Y, **Azizoglu ZB** et al. (2019) Comparison of Peripheral Blood Th17 Cells and Associated Cytokines in Fingolimod-Receiving and Untreated Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients. Turkish Journal of Immunology 7, (29), 69 -75.
11. Eken A, Yetkin Mf, Vural A, Okus Fz, Erdem S, **Azizoglu ZB** et al. (2019) Fingolimod alters tissue distribution and cytokine production of human and murine innate lymphoid cells. Front. Immunol. 10, 217.
12. Eken A, Okus Fz, Erdem S, **Azizoglu ZB** et al. (2019). IL-15 negatively regulates curdlan-induced IL-23 production by human monocyte derived dendritic cells and subsequent Th17 response. Northern Clinics of Istanbul 38802, 379 – 387
13. Karaborklu S., Azizoğlu U, **Azizoglu ZB**, (2018). Recombinant entomopathogenic agents: a review of biotechnological approaches to pest insect control. World Journal Of Microbiology & Biotechnology, Cilt.34.
14. Azizoglu U., Yılmaz S., Ayvaz A., **Atciyurt Z.B.**, Karaborklu S., (2017). Mosquitocidal Potential of Native Bacillus thuringiensis Strain SY49-1 against Disease Vector, Culex pipiens (Diptera: Culicidae). Tropical Biomedicine, vol.34, pp.256-262.
15. Yılmaz S., Azizoglu U., Ayvaz A., Temizgül R., **Atciyurt Z.B.**, Karaborklu S., (2017). Cloning and Expression of cry2Aa from Native Bacillus thuringiensis Strain SY49.1 and Its Insecticidal Activity against Culex pipiens (Diptera: Culicidae). Microbial Pathogenesis, vol.105, pp.81-85.

Kitap Bölüm Yazarlığı

1. Demir BŞ, **Azizoğlu ZB**, Eken A. Nöroimmünolojik ve nörodejeneratif hastalıklarda immün sistem ve inflamatuvar mekanizmalar. Canpolat m, editör. Nöroimmünoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023. p.1-20.

Dergi/ Kongre / Sempozyumların Bildirim Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1. Haliloğlu Y, Özcan A, Erdem Ş, **Azizoğlu ZB** ve ark. Intrauterin Gelişim Geriliğine Yol Açan Morbid Adherent Plasenta, Gebelik Hipertansiyonu Ve Gestasyonel Diyabetli Gebelerin Umbilikal Kord Kanında Mait (Mucosal Associated Invariant T) Ve Tfh (Foliküler Helper T) Hücre İncelenmesi. PS-014, 25. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, 20 - 22 Kasım 2020, DİJİTAL KONGRE
2. **Azizoğlu ZB**, Okus FZ, et al. A nonsense mutation in DIAPH1 gene presents with major T cell defects. EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 51, 296-296, 2021.
3. Okus Fz, Eken A, Erdem Ş, Haliloğlu Y, Çakır M, Yetkin Mf, Akçakoyunlu M, Karayığıt Mö, **Azizoğlu ZB** ve ark. IL-22 ve REG3Γ Overekspresyonunun Multiple Skleroz Fare Modelinde Terapötik Değerinin İncelenmesi. PS-06125. ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, 20 - 22 Kasım 2020, DİJİTAL KONGRE
4. **Azizoğlu ZB** ve ark. HAX1 mRNA Seviyelerini Azaltan Ve Ağır Konjenital Nötropeni İle Sonuçlanan Yeni İntronik Bir Mutasyonun Karakterizasyonu, PS-073 ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, 20 - 22 Kasım 2020, DİJİTAL KONGRE
5. Yılmaz E, **Azizoğlu ZB** ve ark. Metotreksatla İndüklenen Mukozit Modelinde IL-22 Overekspresyonu veya Vitamin D'nin Farelerdeki Terapotik Etkileri. PS-054, ULUSAL İMMÜNOLOJİ KONGRESİ, 20 - 22 Kasım 2020, DİJİTAL KONGRE
6. Okus Fz, Erdem S, **Azizoğlu ZB** et al. IL-15 Exposure Reduces Th17-Associated Cytokine Production by Human Monocyte Derived Dendritic Cells (2019).
7. Eken A, Okus Fz, Erdem S, **Azizoğlu ZB** ve ark. DOCK8 Defektif HIES Hastalarında Grup 3 İnate Lenfoid Hücrelerin Sayı ve Fonksiyonları Azalmıştır (2019).
8. Eken A., Yetkin M. F., Okus F. Z., Erdem S., Çakır M., Haliloğlu Y., **Azizoğlu ZB** et al. Comparison of peripheral blood Th17 cells and associated cytokines in fingolimod receiving and untreated multiple sclerosis patients,,Turkish Journal of Immunology, cilt.7, ss.69-75, 2019
9. Erdem Ş, Okuş Fz, **Azizoğlu ZB**, et al. Characterization Of Treg Generated In The Presence Of Group 3 Innate Lymphoid Cells Ex Vivo, MIMIV IV. BURSA 2019

10. Eken A, Okuş Fz, Erdem Ş, **Azizoğlu ZB**, et al., Modulation of IL-22 and Reg3g Affects Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Severity MIMIV IV. BURSA 2019
11. **Atciyurt Z.B.**, Azizoğlu U., Ayvaz A., Yılmaz S., Karaborklu S., "The Antagonistic Activity of Native *Bacillus thuringiensis* Strains against Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*, Ecology 2017 International Symposium, KAYSERİ, TÜRKİYE, 11-13 Mayıs 2017, pp.336-33
12. Karabörklü S. , Ayvaz A., Yılmaz S., Azizoğlu U., **Atciyurt Z.B.** "Ecological Importance of Free-Living Soil Nematodes", Ecology 2017 International Symposium, KAYSERİ, TÜRKİYE, 11-13 Mayıs 2017, pp.529-529
13. Yılmaz S., **Atciyurt Z.B.**, Ayvaz A., Azizoğlu U., Karaborklu S., Temizgül R., et al., "Chitinase gene screening for native *Bacillus* spp., isolates", 5th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Congress, ANKARA, TÜRKİYE, 9-11 Eylül 2015, pp.70-70.
14. Ayvaz A., Çömlekçi E., Yılmaz S., Azizoğlu U., Ünalımsı S., **Atciyurt Z.B.**, et al., "Evaluating molasses broth for producing *Bacillus thuringiensis* strains", 5th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Congress, ANKARA, TÜRKİYE, 9-11 Eylül 2015, pp.63-63.
15. Azizoğlu U., Ayvaz A., Yılmaz S., Karaborklu S., Temizgül R., **Atciyurt Z.B.**, et al., "Biocontrol potential of native *Bacillus thuringiensis* strains against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)", 5th International Participated Entomopathogens and Microbial Control Congress, ANKARA, TÜRKİYE, 9-11 Eylül 2015, pp.64-64
16. Yılmaz S., Azizoğlu U., Ayvaz A., **Atciyurt Z.B.**, Çömlekçi E., Karabörklü S., Temizgül R., Akbulut M., "Controlling *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) With Recombinant Cry1Ab Protein", 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İZMİR, TURKEY, 10-12 September 2014, pp.211-211.
17. Ayvaz A, Azizoğlu U, **Atciyurt ZB**, Çömlekçi E., Yılmaz S., Karabörklü S., Akbulut M., Temizgül R., "Cloning And Expression Of Cry2A Gene from *Bacillus thuringiensis* Sy49-1 Strain And Its Toxicity On *Culex Pipiens* (Diptera) Larvae", 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İZMİR, TURKEY, 10-12 September 2014, pp.209-209.