

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PYRİN PROTEİNİNİN HÜCRE GÖÇÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Arda ÇETİNKAYA

Tıbbi Biyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2011

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PYRİN PROTEİNİNİN HÜCRE GÖÇÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Arda ÇETİNKAYA

Tıbbi Biyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Engin YILMAZ

ANKARA

2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Engin YILMAZ
(Danışman) Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mehmet Alikashifoğlu
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Çetin KOCAEFE
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararlarıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinin gerçekleştirilmesi sürecinde Tıp Doktoru - Bilim Doktoru Bütünleşik Programı'nı hayata geçirerek bana doktora yapmanın kapısını açan Prof. Dr. İskender Sayek başta olmak üzere tüm program yöneticilerine; tez çalışmalarımı gerçekleştirmekte bana her zaman yol gösteren ve yorulmadan yakından benimle ilgilenen tez danışmanım Prof. Dr. Engin Yılmaz'a; Tıbbi Biyoloji doktora programına başladığım günden beri bana destek olan ve her konuda yol gösterip yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Meral Özgüç'e; doktora eğitimime destek veren Tıbbi Genetik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Mehmet Alikışıfoğlu'na; bilgisiyle ve fikirleriyle bana yol gösteren ve mikroskopi konusunda yardım etmek için içtenlikle zamanını ayıran Prof. Dr. Nuhan Puralı'ya; önerileri ve yardımları ile desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Çetin Kocaefe'ye; her konuda desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Banu Balcı-Peynircioğlu'na; çalışma sürecinde yardımlarına ve yeteneklerine her zaman başvurduğum çalışma arkadaşım Yeliz Akkaya'ya; çalışmanın her aşamasında gerek teorik gerek pratik düzeyde yaptığımız tartışmalarla bana destek olan bilgi, yardım, deneyim ve yeteneklerini her zaman benimle paylaşan Ekim Taşkiran'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, bu tezin gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki tüm değerli öğretim üyelerine ve çalışanlarına teşekkür ederim. Çalışmada kullanılan fiberglas kalıpları hazırlamada bana yol gösteren ve neşesini benden esirgemeyen Prof. Dr. Emin Rüştü Onur ve Dr. Onur Çil ile çalışmada kullanılan vektörler ve hücre hatlarını sağlayan Dr. Deborah Gumucio'ya teşekkür ederim. Son olarak, bu süreçte beni hep destekleyen ve bu tezin gerçekleşmesindeki gizli kahramanlar olan anne ve babam başta olmak üzere tüm aileme ve tezim sürecinde kaybettiğim, yaşamdaki duruşu ve hayata bakışı ile bana hep örnek olacak dedem Yrd. Doç. Dr. Ali Sedat Törel'e teşekkür ederim.

Son olarak, bu doktora tez çalışmasının gerçekleşmesi için TUBİTAK-109S297 projesi kapsamında alınan destek ve doktora tez dönemi boyunca aldığım doğrudan yurtiçi doktora destek programı bursu için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

ÖZET

Çetinkaya A. Pyrin proteininin hücre göçü üzerine etkisinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2011.

Ailesel Akdeniz Ateşi inflamatuvar epizotlarla belirgin otoinflamatuvar otozomal resesif olarak kalıtılan bir hastalıktır. Hastalığın ülkemizdeki prevalansı 1:1000'dir. Hastalık için ilk tercih ilaç, hem epizotlara iyi gelen hem hastalığın amiloidoz gibi uzun dönem komplikasyonlarını engelleyen kolşisinidir. Hastalıktan sorumlu olan ve yanlış çalışan protein, inflamasyon kontrolünde, apoptozda ve sitokin salınımında pek çok rolü olduğu gösterilmiş *pyrin*dir. Bunun yanında *pyrin*in iyi bilinen hücre göçü düzenleyicileri olan PSTPIP1 ve aktin ile etkileşime girerek hücre göçünün kontrolünde de bazı rolleri olduğu ileri sürülmüştür. Bugüne kadar *pyrin*in hücre göçü üzerindeki doğrudan etkileri gösterilmemiştir. Mikrotübül iskeletinin genel yapısını bozmayan en yüksek kolşisin derişimi, hücre ölümünün ölçülmesi ve hücre iskeleti ile organel boyamaları yapılarak saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan uygun kolşisin derişimleri, COS-7 ve HeLa hücreleri için sırasıyla 10ng/ml ve 7,5ng/ml olarak bulunmuştur. Yara iyileşmesi deneylerinde, yara sınırında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artmış sayıda aşırı *pyrin* ifade eden hücre saptanmıştır ($p<0.01$). Doğal *pyrin*, mutant *pyrin* (M694V, M680I ve V726A mutasyonlarını taşıyan) ve kolşisinin geçici transfekte insüline karşı göç eden COS-7 hücrelerindeki rolünü belirlemek için filtre deneyleri kullanılmıştır. Filtre deneylerinde, kontrol grubunda veya *pyrin* mutantlarında görülmemesine karşın, doğal *pyrin* ile artmış hücre göçü arasında anlamlı bir ilişki kurulmuştur ($p<0,01$). Buna ek olarak, kolşisin uygulaması *pyrin* veya mutant *pyrin* ifade eden hücrelerde hücre göçünü negatif yönde etkilerken ($p<0,05$) kontrol grubunda anlamlı bir diapedez artışına neden olmuştur ($p<0,05$). Burada sunulan veriler, *pyrin*in hücre göçünün kontrolünde doğrudan görevleri olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, *pyrin* proteininin PSTPIP1, aktin veya henüz bilinmeyen; ancak büyük olasılıkla MAPK sinyal yolağındaki proteinlerle etkileşimleri aracılığıyla olabilir. Kolşisinin hücre göçünü baskılayan etkilerinin sadece doğal veya mutant *pyrin* varlığında ortaya çıkması da dikkat çekilmesi gereken önemli bir noktadır. Bu konudaki ilerleyen araştırmalar inflamatuvar hücrelerde hücre göçünün yeni kontrol mekanizmalarının keşfine yol açıp genel olarak tüm inflamatuvar hastalıklar için yeni tedavi olasılıklarının kapılarını açabilir.

Anahtar kelimeler: *pyrin*, kolşisin, ailesel Akdeniz ateşi, hücre göçü

Bu çalışma, TUBITAK-109S297 tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Çetinkaya A. Investigating the effect of pyrin protein on cell migration. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2011. Familial Mediterranean Fever is an autosomal recessively inherited, autoinflammatory disease characterized by inflammatory episodes. The prevalence of disease is 1:1000 in Turkey. The drug of choice for the disease is colchicine which both relieves the patient from episodes and prevents late complications like amyloidosis. The aberrantly acting protein responsible for the disease is pyrin, shown to have several roles in inflammation control, apoptosis and cytokine secretion. Furthermore, pyrin was suggested to have several roles in the control of cell migration through its interaction with well-known regulators of cell migration, PSTPIP1 and actin. Until today direct effects of pyrin on cell migration have not been shown. Appropriate concentration of colchicine that would not disturb general microtubule skeleton was determined through cell death measurement, cytoskeleton and organelle staining. The appropriate concentration that was used in this study for COS-7 cells and HeLa cells were determined respectively as 10ng/ml and 7.5ng/ml. In wound healing assays, we noted an increased number of pyrin overexpressing HeLa cells neighboring the wound border compared to control group ($p < 0.01$). Boyden chamber assays were used to determine the role of pyrin, its mutants, namely M694V, M680I, V726A, and colchicine in transiently transfected COS-7 cells migrating against an insulin gradient. In Boyden chamber assays, a positive significant relationship between wild type pyrin overexpression and increased cell migration was shown ($p < 0.01$), which was not observed in either control group or mutants of pyrin. In addition, colchicine treatment would negatively affect cell migration in either wild or mutant pyrin overexpressing COS-7 cells ($p < 0.05$) while colchicine caused a significant increase in diapedesis in control group ($p < 0.05$). The data presented here shows direct involvement of pyrin in control of cell migration. This maybe either through pyrin protein's interaction with PSTPIP1 or actin, or a different yet unknown mechanism possibly involving MAPK signaling pathway. Colchicine's cell migration abolating effects appearing only in the presence of wild type or mutant pyrin is also another interesting point to note. Further research in this subject may lead to discovery of novel mechanisms controlling cell migration in inflammatory cells and would result in novel treatment options for inflammatory diseases in general.

Key words: pyrin, colchicine, familial mediterranean fever, cell migration

This study was supported by TUBITAK-109S297.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı ve Genetiği	3
2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı Patogenezi	4
2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı'nın Tedavisi ve Kolşisin	7
2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı'nda Hücre Göçünün Önemi	8
2.5. Hücre Göçü Mekanizmaları	12
2.6. Hücre Göçü Çalışma Teknikleri	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Çözeltiler	19
3.2. Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi	21
3.3. Vektör Kasetlerinin Çoğaltılması	24
3.4. İki Boyutlu Deney Sistemleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	25
3.5. Agaroz Altı Hücre Göçü Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	27
3.6. Yara İyileşmesi Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	28
3.7. Filtre Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	31
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	34

	Sayfa
4. BULGULAR	35
4.1. Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi	35
4.2. İki Boyutlu Deney Sistemleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	50
4.3. AgaroZ-Altı Hücre Göçü Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	51
4.4. Yara İyileşmesi Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	52
4.5. Filtre Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi	56
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80
EKLER	89
Ek-1. Hücre Göçü Videoları	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

3T3	<i>3-day Transfer - 3x10⁵ cells</i> (3 günde transfer - 3x10 ⁵ hücre)
AA	Amiloid A
AAA	Ailesel Akdeniz Ateşi
AF488	<i>Alexa Flour 488</i>
AF568	<i>Alexa Flour 568</i>
ANOVA	<i>Analysis Of VAriance</i>
Arp3	<i>Actin related protein 3</i> (Aktin ilişkili protein 3)
ASC	<i>Apoptosis associated Speck like with a Caspase-recruitment domain</i>
bZIP	<i>basic leucine ZIPper</i> (Bazik lösin fermuarı)
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
COS-7	<i>CV-1 in Origin, carrying the SV40</i>
DAPI	<i>4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole</i> (4',6-DiAmidino-2-Fenilindol)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Etilen-Diamit-Tetra-Asetik asit
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Epidermal Büyüme Faktörü)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötal Sığır Serum)
fMLP	<i>N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine</i> (N-formil-Metionin-Lösin-Prolin)
GFP	<i>Green Florescent Protein</i> (Yeşil Florasan Protein)
GOLPH4	<i>GOLgi Phosphoprotein 4</i> (Golgi fosfoprotein 4)
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HL-60	<i>Human Leucemia 60</i> (İnsan Lösemisi 60)
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Epithelial Cells</i> (İnsan göbek kordonu toplardamar epitel hücreleri)
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i> (İnhibitör Derişim 50)
IL-1 β	İnterlökin 1 β

Kalsein AM	AsetoMetoksi Kalsein
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration 50</i> (Ölümcül Derişim 50)
LDH	Laktat DeHidrogenaz
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> , Mitojen Aktive Protein Kinaz
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> (Madin-Darby Köpek Böbreği)
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i> (Çoklu ilaç direnci)
MEFV	<i>MEditerranean FeVer</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MS	<i>Multiple Sclerosis</i> (Çoklu skleroz)
MTOC	<i>MicroTubule Organizing Center</i> (Mikrotübül organize edici merkez)
NAD	Nikotinamit Adenin Dinükleotid
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i> (Çekirdek Faktörü- κ B)
NHK	<i>Normal Human Keratinocytes</i> (Normal İnsan Keratinositleri)
NOMID	<i>Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease</i> (Yenidoğanın multisistem inflamatuvar hastalığı)
PAPA	Piyojenik Athrit, Piyoderma gangrenozum, Akne
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDI	<i>Protein Disulfide Isomerase</i> (Protein Disülfit İzomراز)
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol phosphate 3 Kinase</i> (Fosfatidil inositol 3 fosfat kinaz)
PIP ₃	<i>Phosphatidyl Inositol tris-phosphate</i> (Fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfat)
PSTPIP1	<i>Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1</i> (Prolin-serin-treonin fosfataz ilişkili protein 1)
PYD	<i>Pyrin Domain</i> (<i>Pyrin Domaini</i>)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Tümör nekroz faktörü)
VASP	<i>Vasodilator Stimulated Phosphoprotein</i> (Vazodilatörle uyarılan fosfoprotein)

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. <i>Pyrin</i> proteininin yapısı.	6
2.2. fMLP ile uyarıldıktan sonra göç etmekte iken fikse edilerek aktin <i>pyrin</i> , ASC ve çekirdek için DAPI ile florasan olarak boyanmış bir insan monosit hücresi.	9
2.3. ASC spek yapısı oluşturmuş hücrelerde <i>pyrin</i> , Arp3 ve VASP proteinlerinin immünflorasan olarak boyanması.	10
2.4. Hücre içi hareketlerini hücrenin aktin polimerizasyonunu kendi için düzenleyerek sağlayan <i>Listeria monocytogenes</i> ile enfekte edilmiş ve aktin, <i>pyrin</i> ve ASC ile florasan olarak boyanmış bir hücre.	11
2.5. Aşırı <i>pyrin</i> ve PSTPIP1 ifadesi sağlanan bir hücrede <i>pyrin</i> ve PSTPIP1 proteinlerinin üst üste çakışan birbirine paralel ve dallanan fibriler yapılar oluşturması (retiküler fibriller).	12
2.6. Bir nötrofil hücresinin inflamasyon bölgesine ulaşmak için endotel ile girdiği etkileşimin aşamaları.	13
2.7. Hücre göçünü kontrol eden hücre içi sinyal yolları.	15
3.1. LDH enziminin aktivitesi.	22
3.2. Transfeksiyon deneylerinde kullanılan pcDNA3.1 vektörünü gösteren şekil.	25
3.3. 2 boyutlu deney sistemi.	26
3.4. 35mm'lik kültür kabı içerisinde jelleşmekte olan ve içerisine 2 adet kuyucuk açılmış agaroz jel kalıp.	27
3.5. Agaroz altı hücre göçü deney sistemi.	28
3.6. Yara iyileşmesi deney sistemi.	29
3.7. Kalsein-AM'nin canlı hücreleri boyama ilkesi.	31
4.1. HeLa hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde besi yerindeki LDH aktivitesi.	36
4.2. COS-7 hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde besi yerindeki LDH aktivitesi.	37
4.3. COS-7 hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde besi yerindeki LDH aktivitesi.	38
4.4. Faz-kontrast mikroskopisinde ve DAPI çekirdek boyamasında gözlenen hücre ve çekirdek morfolojileri.	39

	Sayfa
4.5. HeLa hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde faz-kontrast hücre morfolojisi ve DAPI ile boyanmış çekirdek morfolojisi (10X).	40
4.6. COS-7 hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde faz-kontrast hücre morfolojisi ve DAPI ile boyanmış çekirdek morfolojisi (10X).	42
4.7. HeLa hücrelerinin, değişen kolşisin derişimlerinde, florasana mikroskopta gözlenen aktin ve mikrotübül hücre iskeletinin yapısı (20X).	44
4.8. COS-7 hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde konfokal mikroskopta aktin ve mikrotübül hücre iskeletlerinin yapısı (20X).	46
4.9. HeLa hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde florasana mikroskopta endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı organellerinin yapısı ve yerleşimi (10X).	49
4.10. COS-7 hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde florasana mikroskopta endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı organellerinin yapısı ve yerleşimi (10X).	50
4.11. COS-7 hücrelerinin, 24 saat sonunda insülin olan tarafa doğru kuyucuk içerisinde yönelimi.	51
4.12. COS-7 ve HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sisteminde göç hareketleri.	53
4.13. Solda HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sisteminde florasana mikroskopta <i>pyrin</i> -GFP proteininin yerleşimi. Sağda aynı hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri (10X).	54
4.14. Yara iyileşmesi deneyinde GFP ve <i>pyrin</i> -GFP vektörü ile transfekte hücrelerin sayılması.	55
4.15. Yara iyileşmesi deneyinde GFP ve <i>pyrin</i> -GFP ifade eden gruplar için yara sınırında veya içerisinde bulunan hücrelerin karşılaştırılması.	56
4.16. 24 saat ve 48 saat deney sürelerinde ve insülin varlığında veya yokluğunda filtrelerden göç eden COS-7 hücre sayılarının karşılaştırılması.	57
4.17. Filtre deneylerinde hücre sayılarını belirlemek için çizilen standart eğri.	58
4.18. Filtre deneyi için kullanılan 5 farklı vektör ile transfekte edilmiş deney gruplarının deney süresi sonunda <i>pyrin</i> ile transfeksiyon durumlarının florasana boyama ile gösterilmesi (10X).	59
4.19. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden ve göç etmeyen hücre sayıları.	61

	Sayfa
4.20. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden hücrelerin göç etmeyen hücelere oranları.	62
4.21. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden hücelerin göç etmeyen hücelere oranları (kontrol gruplarına oranla).	64
4.22. Filtre deneyinde her deney grubundaki insülin ve kolşisin alan hüceler için göç eden hücelerin göç etmeyen hücelere oranları (insülin alan deney gruplarına oranla).	65
4.23. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden hücelerin göç etmeyen hücelere oranları (kontrol gruplarına oranla).	66
5.1. <i>Pyrinin</i> hücre göçünün kontrolündeki yerini gösteren ve bu tez çalışmasının bulguları ile oluşturulan şema.	76

1. GİRİŞ

Bir dokuda akut inflamasyonun başlaması o dokudaki hücreler tarafından salınan çeşitli inflamatuvar ajanlarca gerçekleştirilmektedir (1). Bu ajanların dokulardaki hücreler üzerine olan pek çok önemli etkilerinin yanında en önemli etkilerinden biri de dokuda kılcak damar ve postkapiller endotel hücrelerini etkileyerek dolaşımdaki bağışıklık sistemi hücrelerini akut inflamasyonu iletmek üzere bölgeye çağırmasıdır (2).

Belli peryotlarda akut inflamasyon sürecinin kontrolsüz olarak başladığı Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) Hastalığı'nın patogeneğinde bağışıklık sistemi hücrelerinin dokulara göç etmesi önemli bir süreçtir (3). İnflamasyonun her türünde olduğu gibi, AAA ve benzeri otoinflamatuvar hastalıklarda da inflamatuvar hücre göçünün, özellikle doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin dokuya göçünün, hastalığın ataklarının oluşmasında önemli bir yeri vardır. Doğal bağışıklık sistemi hücrelerini otoinflamatuvar hastalıklarda dokulara çağırma ve bunun peryotlar şeklinde olmasını sağlayan inflamatuvar ajanlar ise henüz bilinmemektedir. Buna karşın, AAA'da inflamasyonun başlatılması ve devam ettirilmesinde IL-1 β (İnterlökin 1 β) başta olmak üzere bazı sitokin salınımı yollarının aktive olmasının inflamasyona katkısı detaylı olarak araştırılmıştır (4-7). AAA'da hücre göçünün aktivasyonunun inflamatuvar ajanlara bir yanıt olarak, AAA'da artmış inflamasyonun nedenlerinin bir parçası olabileceğine ilişkin kanıtlar da öne sürülmüştür. Bu aşamada, AAA'dan sorumlu mutant *pyrin* proteininin göç yollarında yer alan proteinlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir (8-10). Bununla birlikte, *pyrin*'in hücre göçünün niceliğine ve niteliğine olan etkileri henüz araştırılmamıştır.

AAA hastalığının tedavisinde ilk tercih edilen ilaç kolşisinidir. Kolşisin, AAA hastalığında hem inflamatuvar atakları baskılamakta hem de uzun dönem komplikasyonları önlemektedir (11). Kolşisin'in asıl etkisinin mikrotübül depolimerizasyonu olduğu bilinmekle beraber bu etki derişim bağımlıdır. Farklı derişimlerde kolşisin'in, pek çok farklı antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir (12). Bu

etkilerden hangisinin AAA tedavisinde öncelikli olarak fayda sağladığı ise bilinmemektedir.

Bu tezin amacı doğal *pyrinin*, mutantlarının ve kolşisinin hücre göçü üzerine olan etkilerinin saptanmasıdır. Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, kullanılacak olan hücre hatlarının kolşisine duyarlılıkları saptanacak ve sonraki deneylerde kullanmak üzere kolşisin mikrotübül iskeletinin genel yapısını bozmayan en yüksek kolşisin derişimi belirlenecektir.

Tez çalışmasının ikinci aşmasında ise, hücre hatları için çeşitli hücre göçü modelleri, uygunlukları açısından test edilecektir. Uygun bulunan modeller kullanılarak, *pyrin* ve mutantlarının kolşisin varlığında veya yokluğunda hücre göçünü nasıl etkilediği değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı ve Genetiği

AAA, doğal bağışıklık sisteminin belli aralıklarla ve nedeni bilinmeyen bir şekilde kontrolsüz olarak uyarıldığı, buna bağlı olarak, vücutta özellikle periton başta olmak üzere plevra, eklem sinoviyası gibi çeşitli dokularda yaygın inflamasyonun olduğu otozomal resesif kalıtılan genetik bir hastalıktır (13). AAA'nın inflamatuvar atakları tipik olarak 1-2 ayda bir ortaya çıkmakta ve 6-72 saat devam etmektedir (14). Ataklar sırasında, altında herhangi bir neden gösterilemeyen peritonit, artrit, plevrit, ateş görülmesi tipiktir (14,15) ve çoğu zaman bu duruma, artmış inflamatuvar cevabı gösteren klinik laboratuvar bulguları da eşlik etmektedir. Klinik laboratuvarlarda sıkça araştırılan inflamatuvar değişiklikler, fibrinojen, eritrosit sedimentasyon hızı (*Erythrocyte Sedimentation Rate*, ESR), C reaktif protein (*C-reactive protein*, CRP) artışı ve lökosit sayısındaki artışlardır (14-16).

AAA hastalarında ataklarla kendini gösteren ya da klinik bulgu vermeden gelişen kronik inflamatuvar süreç, Amiloid A (AA) tipi amiloid gelişimine de neden olmaktadır (17). Sonuçta, hastalığın en ciddi komplikasyonu olan kronik böbrek yetmezliği ortaya çıkmaktadır. AAA özellikle Yahudi, Ermeni, Arap ve Türk toplumlarında sık görülmektedir (18). Hastalığın ülkemizdeki prevalansı 1/1000'dir (19).

16p13.3 bölgesinde bulunan AAA'dan sorumlu *MEFV* (*MEditerranean FeVer*) geninin (20) özellikle doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli görevleri olduğu bilinmektedir. *MEFV* geninin büyüklüğü 15 kb olup bu genden 781 amino asitlik *pyrin* proteini kodlanmaktadır. Bu genin büyüklüğü yaklaşık 15 kilobazdır ve kodladığı 781 amino asit uzunluğundaki proteine *pyrin* adı verilmektedir. Tüm otoinflamatuvar hastalık genlerine ait genlerdeki değişikliklerin toplandığı bir veritabanı olan "*infevers*" veritabanına göre son güncellendiği 06/08/2010 tarihi itibarıyla *MEFV* geninde 205 değişiklik tanımlanmış ve bunların 69 tanesi AAA klinik bulgularından sorumlu olarak bildirilmiştir (21,22). *MEFV* geni 10 ekson içermekte ve mutasyonlarının çoğununun iki eksonda toplandığı dikkati çekmektedir. Gen üzerindeki 205 değişiklikten 56 tanesi ekson 2'de bulunup bunların 19 tanesi ve

ekson 10 üzerindeki 59 değişiklikten 26 tanesi AAA klinik bulguları ile ilişkilendirilmiştir (21,22). Bu iki eksonda yer alan M680I, M694V, M694I, V726A ve E148Q mutasyonları AAA hastalarında en sık görülen mutasyonlar olarak rapor edilmiştir (18).

AAA'dan sorumlu *MEFV* mutasyonları her zaman aynı şiddette klinik bulgulara neden olmamaktadırlar. Sık görülen 5 mutasyon arasından özellikle E148Q mutasyonunun diğerlerine kıyasla daha hafif klinik bulgulara neden olduğunu hatta bazen E148Q mutasyonuna sahip bireylerde AAA'nın klinik bulgularına hiç rastlanmadığını gösteren yayınlar vardır (23,24). Ayrıca, mutasyon tipinden bağımsız olarak AAA'nın klinik bulgularının ortaya çıkışının ve şiddetinin çevresel faktörlerden etkilendiği de bilinmektedir (25,26). Aynı etnik kökene sahip fakat farklı ülkelerde yaşayan Türkler'de hastalığın klinik şiddeti ülkeye göre farklılık göstermekte ve çevresel etkenlerin önemini yansıtmaktadır (26).

MEFV mutasyonları AAA haricinde bağışıklık sisteminin kontrolünün bozulduğu ve bağışıklık sisteminin vücudun kendi belli dokularına saldırdığı pek çok başka hastalıkla da ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıklar arasında Çoklu Skleroz (*Multiple Sclerosis*, MS) (27), Behçet Hastalığı (28), inflamatuvar barsak hastalıkları (29), çeşitli vaskülitler (30) ve çeşitli eklem romatizmaları (31-33) vardır. Ayrıca, ateroskleroz (34) ve Alzheimer Hastalığı (35) gibi bazı inflamatuvar süreçlerin patogenezinde rol oynadığı hastalıklara yatkınlık da *MEFV* mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir.

2.2. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı Patogenezi

İnflamasyonun düzenlenmesinde önemli olduğu bilinen *pyrin* proteini esas olarak doğal bağışıklık sisteminin temel hücreleri olan nötrofiller ve monositlerde ifade edilmektedir (3). *Pyrin* proteini beş bölge (*domain*) içermektedir (36) (Şekil 2.1). Bu *domain*ler aracılığıyla bağışıklık sisteminde önemli işlevleri olduğu bilinen bazı proteinlerle ilişkiye girmektedir. Bu *domain*lerden proteinin N-ucuna en yakın olanı *pyrin* (PYD) domainidir. *Pyrin domaini*, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinden sorumlu pek çok protein üzerinde bulunmakta ve protein-protein etkileşimlerinin kurulmasında rol oynamaktadır (37). *Pyrin* proteinin bu

şekilde ilişkiye girdiği proteinler arasında ASC (*Apoptosis associated Speck like with a Caspase-recruitment domain*) proteini de vardır (38).

ASC doğal bağışıklık sisteminin özellikle monositer hücrelerindeki piroptoz olayının gerçekleşmesinden sorumlu proteinlerin başında gelmektedir (39). ASC aktifleştince kaspaz-1'i de aktifleştirir ve böylece pro-IL-1 β proteini kırılarak aktif hale gelir (39). IL-1 bağışıklık sisteminin temel uyarılarından birisidir. Ayrıca, *pyrin* proteini kendisi de kaspaz-1 enzimi tarafından iki parçaya ayrılmaktadır (40). Bu iki parçadan N-ucunu içeren *pyrin* proteini parçası çekirdeğe taşınmakta ve burada inflamasyonda önemli bir rol oynayan bir sinyal proteini olan NF- κ B'nin (*Nuclear Factor- κ B*) ifadesinin artmasına neden olmaktadır. *Pyrin* proteininin bunu bir DNA bağlanma bölgesi olarak işlev gördüğü bilinen bZIP (*basic leucine ZIPper*, bazik lösin fermuarı) *domaini* aracılığıyla başardığı öne sürülmüştür (40). ASC aynı zamanda *speck* adı verilen perinükleer sitoplazmik yapıyı oluşturmasının ardından bağışıklık sistemi hücrelerini apoptoza da yönlendirmektedir (41).

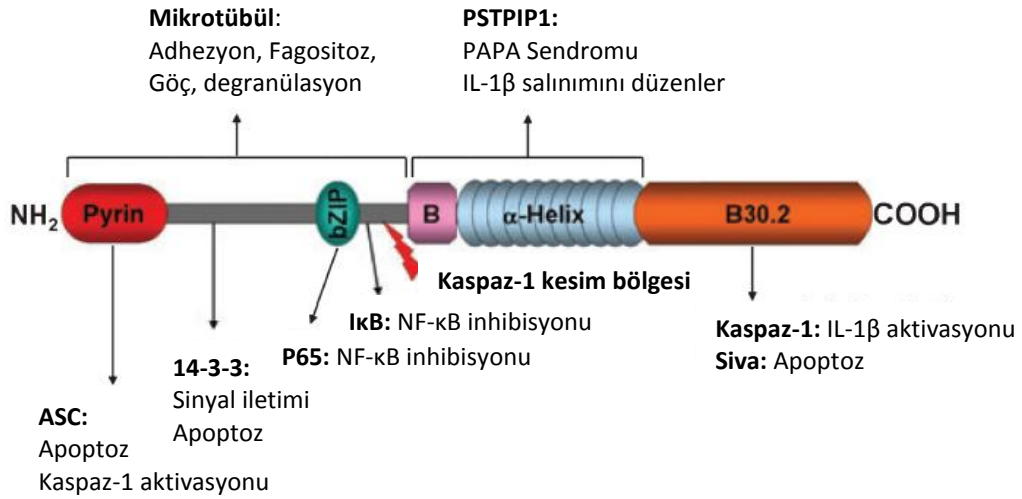
Pyrin proteininin C-ucunda bulunan B30.2 *domaininin* işlevi tam olarak bilinmemekle beraber bu *domainin*, *pyrinin* inflamatuvar süreçte aralarında kaspaz-1'in de bulunduğu çeşitli proteinlerle ilişki kurmakta önemli bir *domain* olduğu düşünülmektedir (36,42). B30.2 *domaininde* yer alan mutasyonlar AAA patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan bir çalışmada B30.2 *domaininin* X-ışını kristalografisi sonucu elde edilen 3 boyutlu yapısı değerlendirildiğinde, bu *domaindeki* peptid bağlanmasından sorumlu olduğu düşünülen amino asitlere denk gelen mutasyonların AAA klinik bulgularına neden olan mutasyonların üçte ikisine neden olduğu belirtilmiştir (43). B30.2 *domaininin* ilişkiye girdiği gösterilen bir başka protein de apoptozda görevleri olduğu bilinen bir protein olan Siva'dır (44).

Pyrin proteininin ayrıca mikrotübüllerle ilişkide olduğunu gösteren kanıtlar da vardır (8). Bu durum mikrotübüllerin adhezyon, hücre göçü, vezikül transportu, fagositoz gibi çeşitli inflamatuvar hücre işlevlerinde kilit görev almaları açısından önemlidir.

Pyrin proteininin ilişkiye girdiği bir diğer protein ise PSTPIP1 (*Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1*) isimli, başka bir otoinflamatuvar

hastalık olan PAPA (Piyojenik Athrit, Piyoderma gangrenozum, Akne) Sendromu'ndan sorumlu bir proteindir (45). PSTPIP1'in hücre göçünde özellikle hücrenin göç etme yönünün tersinde kalan üropod kısmında önemli görevleri olduğu ve yönlü hücre göçünü düzenlediği bilinmektedir (46). PSTPIP1 proteini zarar görmemiş mikrotübül yapısı varlığında mikrotübüller ile paralel bir yapı göstermekte ve *pyrin* proteininin aşırı ifade edildiği hücrelerde *pyrin* ile paralel seyreden "retiküler fibriller"den oluşan bir görünüm vermektedir (9). PSTPIP1'in *pyrin* ile etkileşime girerek ASC'nin aktivasyonunu sağladığı da öne sürülmektedir.

Pyrin proteinin MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase, Mitojen Aktive Protein Kinaz) yolağında bir *scaffold* proteini olarak görev yapan 14-3-3 proteini ile de etkileşime girdiği gösterilmiştir (47).



Şekil 2.1. *Pyrin* proteininin yapısı (36). Protein üzerinde renkli olarak belirtilen bölgeler proteinin farklı *domain*lerini temsil ederken oklar *pyrin*in ilişkiye girdiği diğer proteinleri ve *pyrin*le hangi bölgesi aracılığıyla ilişkiye girdiğini göstermektedir. Kırmızı olarak boyanmış yıldırım işareti ise *pyrin*in kaspaz-1 tarafından kesilme bölgesini göstermektedir.

2.3. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı'nın Tedavisi ve Kolşisin

AAA'nın tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmakta olan en önemli tedavi aracı kolşisindir. Kolşisin, AAA'da hem atak sıklığını azaltmakta hem de hastalığın en önemli komplikasyonu olan böbrek amiloidozunu önlemektedir (48). Kolşisinin AAA tedavisindeki rolü doğrudan ve dolaylı olarak bağışıklık sistemini baskılamasına bağlanmıştır (12). Kolşisinin baskıladığı bağışıklık sistemi işlevleri arasında fagositoz, hücre göçü, proinflamatuvar sitokin salınımı vardır (12). Ayrıca, kolşisinin hücre bölünmesini engellemesi ve apoptozu indüklemesi de kolşisinin bağışıklık sistemini baskılayıcı işlevi açısından önemli olabilir (49).

Kolşisinin hücre içindeki asıl hedefi mikrotübüllerdir. Kolşisin mikrotübüllerin temel yapı taşı olan α -tübülin - β -tübülin dimerlerinde α -tübülin ve β -tübülin arasına bağlanır (50). Bu bağlanma dimerin 3 boyutlu yapısını değiştirir ve mikrotübül uçlarına eklenen bu dimerler mikrotübüllerin uzamasını engeller veya yavaşlatır (50). Ayrıca, kolşisinin mikrotübüllere bağlanmak için mikrotübüllerle ilişkili bazı proteinlerle yarıştığına ve onların bağlanmasını engellediğine ilişkin yayınlar vardır (51). Hücrelerin kolşisine cevabı derişim bağımlı şekilde olmaktadır.

Kolşisin AAA hastalığında özel olarak etkilidir; ancak diğer otoinflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda bu kadar etkili cevap görülmemektedir. Bir çalışmada bu durum, kolşisinin nötrofiller üzerine olan özgül etkisine bağlanmıştır. Bu çalışmaya göre bazı çoklu ilaç direnci proteinlerinin (*Multi Drug Resistance protein*, MDR) nötrofillerde ifadesinin monositlere göre az olması nedeniyle kolşisinin nötrofillerde biriktiği ve özellikle bu hücre grubunun mikrotübül işlevlerini bozduğu öne sürülmektedir (52). Bu durum kolşisinin farklı tipte hücrelerde farklı derişimlerde farklı etkiler göstermesini de açıklayan bir durumdur (53).

Diabetik nefropati patogenezinde, inflamatuvar bir sürecin rol oynadığı bilinmektedir. Diabetik nefropati oluşturulmuş fare modelinde artmış hücre göçü sinyallerine ilişkin gen ifadesindeki artış ve protein düzeyinde kanıtlar saptanmıştır. Kolşisin ile hem bu artmış sinyallerin azaldığı ve böbrek dokusunda daha az inflamatuvar hücre birikimi olduğu hem de diabetik nefropati gelişiminin yavaşladığı gösterilmiştir (54). Bu sonuç, AAA hastalarında hücre göçünün kolşisin gibi bir ajanla

engellenmesi sonucu inflamasyonun baskılanabileceğini göstermektedir ve kolşisinin AAA tedavisindeki olası etki yollarına da ışık tutmaktadır.

Kolşisinin tedavi dozu, günde en yüksek 2 mg olarak önerilmektedir (55). Doz aşımı durumunda ise gastrointestinal rahatsızlıklar, nöromusküler sorunlar, nötropeni, dolaşım yetmezliği gibi yan etkiler ortaya çıkmaktadır (55). Bu yan etkiler sonunda ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Oral kolşisin alımını takip eden 6. Saatte ölçülen plazma kolşisin derişimlerine göre 20 ng/ml plazma düzeylerinde ciddi kolşisin toksisitesi bildirilmiştir (56).

AAA hastalığının tedavisinde son zamanlarda doğal bağışıklık sistemince salınan proinflamatuvar bazı sitokinleri inhibe eden ilaçlar da kullanılmaktadır. Bu ilaçlar arasında *etanersept* gibi TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*, tümör nekroz faktörü) antagonistleri (57) ve *anakinra* gibi IL-1 reseptör antagonistleri (58) vardır. Bu ilaçlarla özellikle kolşisine dirençli hastalarda başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.

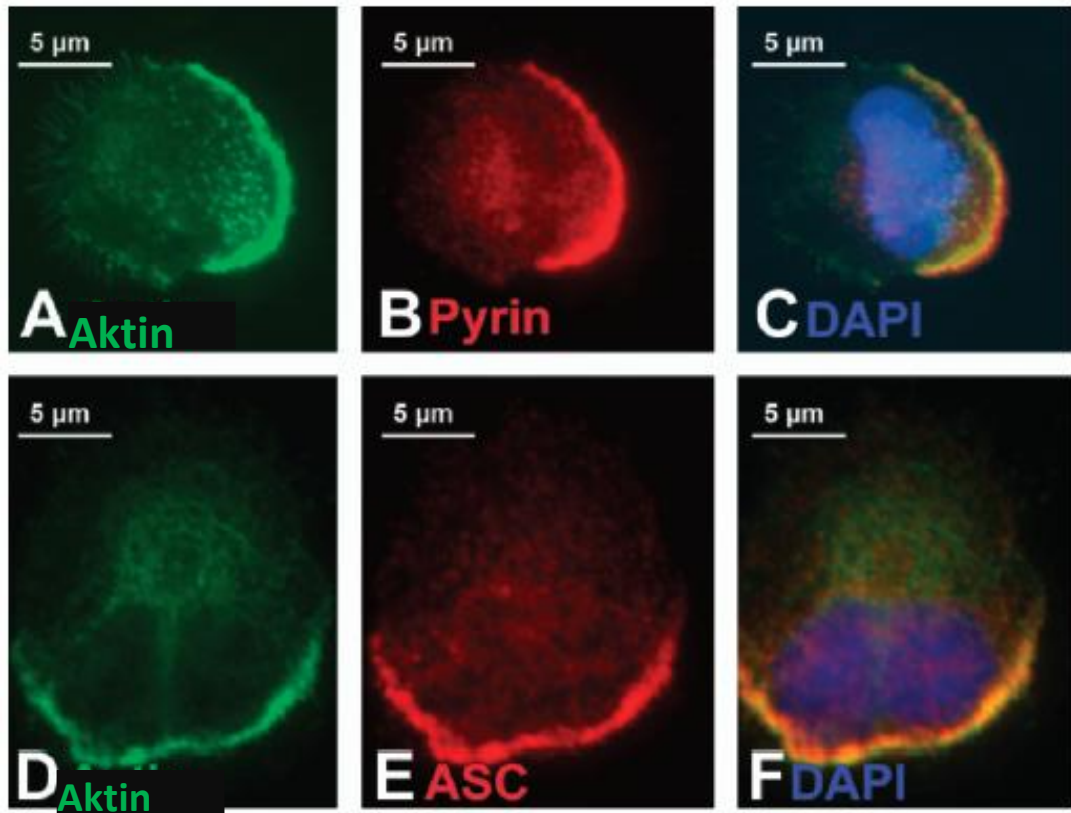
2.4. Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı'nda Hücre Göçünün Önemi

İnflamatuvar süreçlerde hasarlı dokuda oluşan sinyaller ile dokuya inflamatuvar hücre göçü, dokudaki inflamasyon kaynağının ortadan kaldırılması için önemlidir. İnflamatuvar hücrelerden hasarlı dokuya ilk olarak ulaşan hücreler nötrofiller olup daha sonra monositler, lenfositler ve diğer bağışıklık sistemi hücreleri de bu sürece katılmaktadır (59). AAA'da nedeni bilinmeyen bir şekilde inflamatuvar bir sinyal ortaya çıkması ile hücre göçünün uyarılması AAA'nın patogeneğinde önemli olabileceği düşünülen bir durumdur.

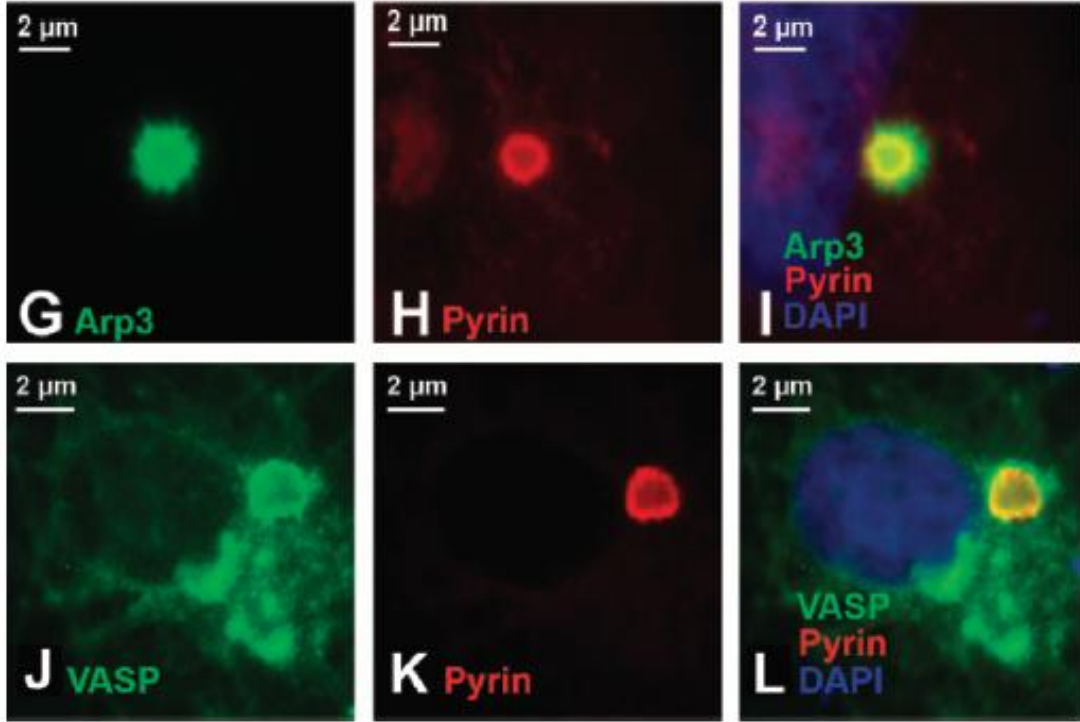
Pyrin proteini ile aktin ve mikrotübül hücre iskeleti elemanları arasında pek çok ilişki kurulmuştur. Bunlardan özellikle *pyrin* proteini ile fibriler aktin arasında kurulan ilişki, *pyrin* proteininin ve mutasyonlarının hücre göçü üzerine etkilerinin olabileceğini göstermesi açısından önemlidir (10). Bu durum göç hareketi gösteren insan monositlerinde polimerize aktin ile *pyrin* proteininin birlikte bulunması ile gösterilmiştir (10) (Şekil 2-2). Ayrıca, *Arp3* (*Actin related protein 3*, Aktin ilişkili protein 3) ve *VASP* (*Vasodilator Stimulated Phosphoprotein*, Vazodilatörle uyarılan fosfoprotein) gibi aktin polimerizasyonu ve hücre içi aktin iskeletinin 3 boyutlu

yapısının düzenlenmesinden sorumlu iki protein de *pyrin*le bir arada bulunmaktadır (10) (Şekil 2-3). Buna ek olarak, hücre içi bir bakteri olan *Listeria monocytogenes* adlı bakterinin hücre içi hareketleri için kullandığı aktin polimerizasyonu bölgelerinde de *pyrin* ile aktinin birlikte yerleşimi gösterilmiştir (10) (Şekil 2-4).

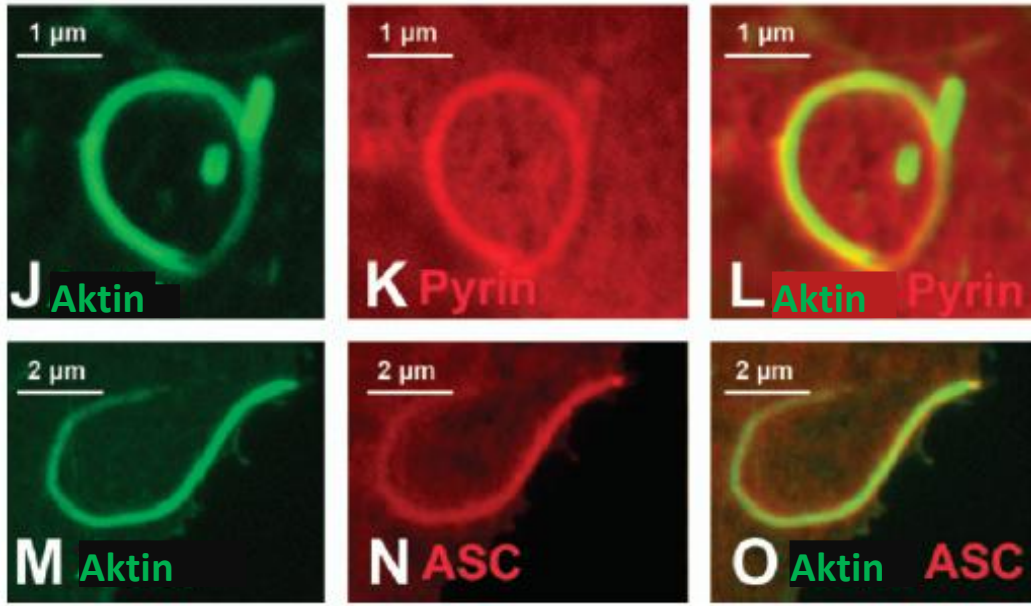
Pyrin ve hücre göçünün kontrolünde önemli görevleri olduğu bilinen PSTPIP1 proteininin ilişkisi ise *pyrin*in dolaylı olarak hücre göçü üzerine etkileri olabileceğini düşündürmektedir (9,45) (Şekil 2-5).



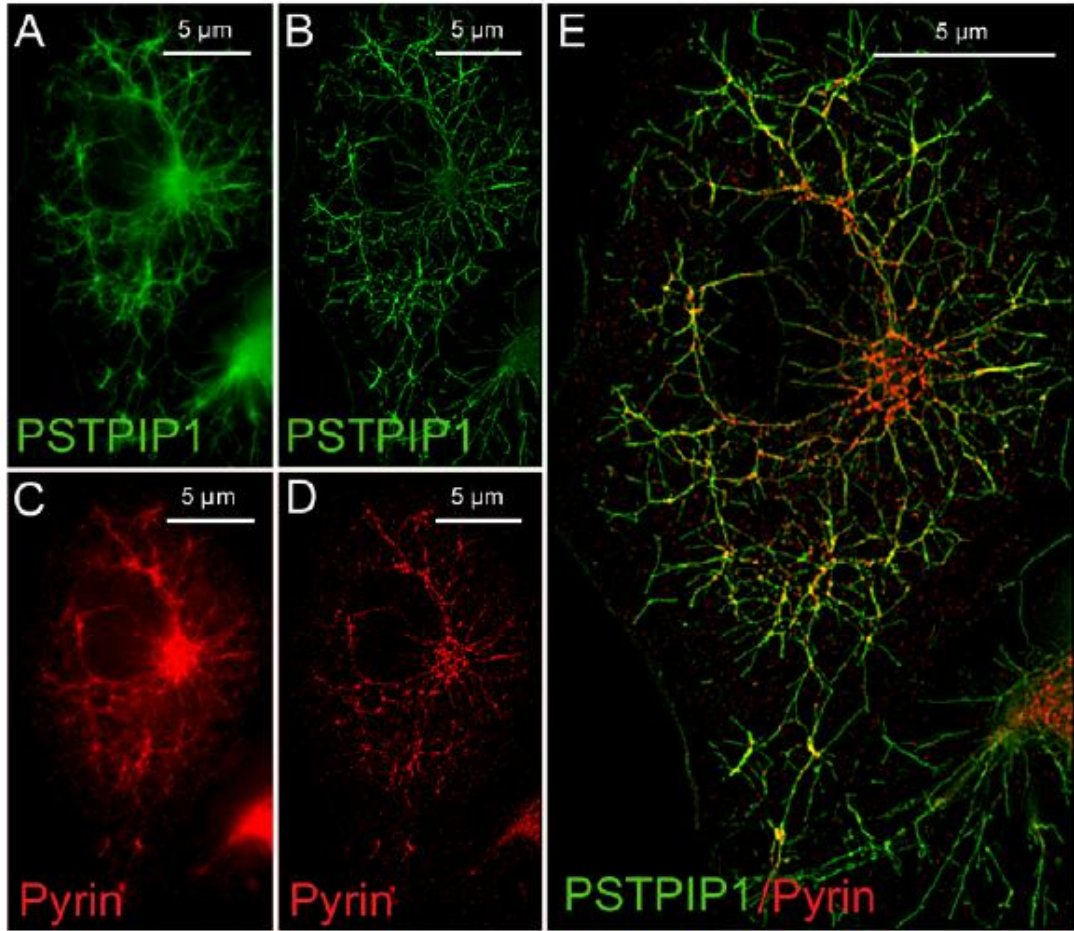
Şekil 2.2. fMLP (*N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine*, N-formil-Metionin-Lösin-Prolin) ile uyarıldıktan sonra göç etmekte iken fikse edilerek aktin (yeşil) (A-C-D-F), *pyrin* (kırmızı) (B-C), ASC (kırmızı) (E-F) ve çekirdek (mavi) (E-F) için DAPI (*4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole*, *4',6-DiAmidino-2-Fenilindol*) ile florasan olarak boyanmış bir insan monosit hücresi (10). Hücrenin göç yönünde *pyrin* ve ASC proteinlerinin aktinle üst üste çakıştığı bu 2 proteinin hücre göçü düzenlenmesinde görev aldığı düşünmektedir.



Şekil 2.3. ASC spek yapısı oluşturmuş hücrelerde *pyrin* (kırmızı) (H-K-I-L), Arp3 (yeşil) (G-I) ve VASP (yeşil) (J-L) proteinlerinin immünflorasan olarak boyanması (10). Mavi ile hücre çekirdeği gösterilmektedir (I-L). *Pyrin* ile hücre göçü düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinen Arp3 ve VASP proteinlerinin birlikte yerleşim göstermesi *pyrinin* hücre göçünde görevleri olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 2.4. Hücre içi hareketlerini hücrenin aktin polimerizasyonunu kendi için düzenleyerek sağlayan *Listeria monocytogenes* ile enfekte edilmiş ve aktin (yeşil) (J-M), *pyrin* (kırmızı) (K) ve ASC (kırmızı) (N) ile florasan olarak boyanmış bir hücre (10). Hücre içi bakterinin aktif aktin polimerizasyonu ile oluşturduğu “aktin roketi” yapısı içinde aktin ile bu 2 proteinin üst üste çakışması hücre göçü düzenlenmesinde görev aldıklarını düşündürmektedir.

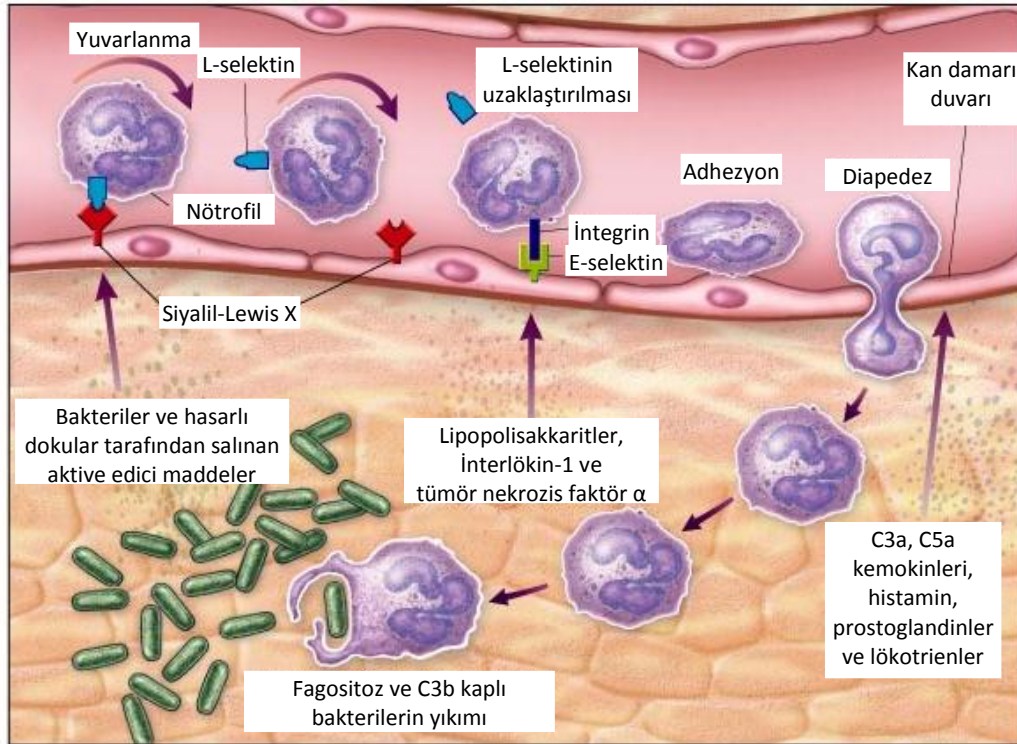


Şekil 2.5. Aşırı *pyrin* ve PSTPIP1 ifadesi sağlanan bir hücrede *pyrin* (kırmızı) (C-D-E) ve PSTPIP1 (A-B-E) proteinlerinin üst üste çakışan birbirine paralel ve dallanan fibriler yapılar oluşturması (9) (retiküler fibriller). Hücre göçünün düzenlenmesinde görev alan PSTPIP1 ve *pyrinin* birlikte düzenli yapılar oluşturması *pyrin* proteininin hücre göçünde görevleri olduğunu düşündürmektedir.

2.5. Hücre Göçü Mekanizmaları

Hücre göçü, özellikle doğal bağışıklık sistemi hücreleri başta olmak üzere tüm bağışıklık sistemi hücrelerinin, inflamatuvar sinyallerin olduğu dokuya ulaşma araçlarıdır. Bağışıklık sistemi hücreleri, özellikle nötrofiller, dolaşımında öncelikle dokuda durabilmek için endotel hücreleri üzerinde bulunan selektinleri tanıyarak dolaşımında yavaşlamaları gerekmektedir (60). Dolaşımında endotel üzerine tutunarak

gerçekleşen bu yavaşlama bağışıklık sistemi hücrelerinin endotel duvarına tutunarak yuvarlanması ve sonra da durması ile sonuçlanır. Bu sürece, yuvarlanma (*rolling*) denir (60). Bu şekilde yavaşlayan hücre dokudan gelen kemoatraktan, diğer bir deyişle hücreyi belli bir yöne hareket etmeyi sağlayacak, sinyalleri tanıyabilir. Kemoatraktan sinyalleri tanıyan hücreler endotele çeşitli integrinler aracılığıyla sıkıca tutunurlar (60). Buna sıkı adezyon denir. Endotel üzerine sıkıca bağlı hücreler daha sonra diapedez adı verilen aktif bir süreçle endotel hücreleri arasından veya içerisinden geçerek dokuya ulaşırlar. Diapedezin gerçekleşebilmesi için endotel altında bulunan bazal membranın bölgesel olarak çeşitli proteazlarla parçalanarak hücre göçüne izin vermesi gerekmektedir (60). Dokuya ulaşan bağışıklık sistemi hücreleri ise doku içerisinde ilerleyerek kemoatraktan sinyalin geldiği yöne doğru ilerlemeye ve inflamatuvar sinyal kaynağını ortadan kaldırmaya çalışırlar (61) (Şekil 2.6).



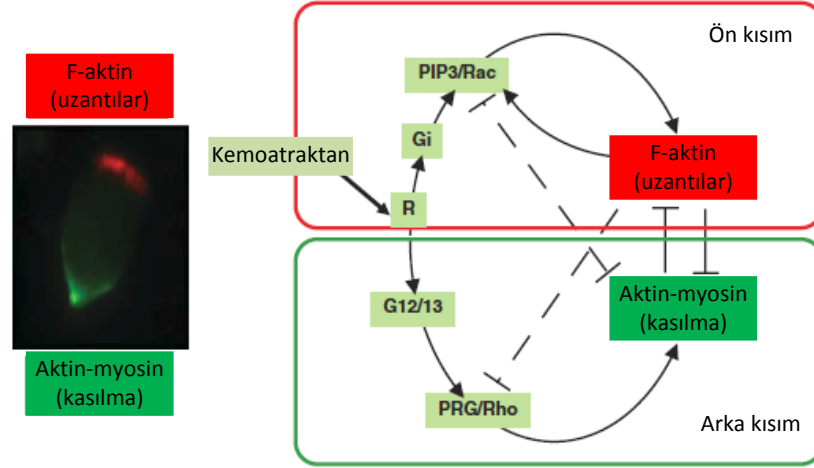
Şekil 2.6. Bir nötrofil hücrenin inflamasyon bölgesine ulaşmak için endotel ile girdiği etkileşimin aşamaları (61).

Hücre göçü kabaca 3 aşamada gerçekleşmektedir (62). İlk aşamada, kemoatraktan sinyalin algılanması ile hücre polarize olur. Bu aşamada hücre içi sinyal sistemi hücrenin hangi yöne doğru göç edeceğine yönelik hücre iskeletini, hücre organellerini ve hücre adezyonlarını düzenler. İkinci aşamada, hücre göç edeceği yönde uzantı veya uzantılar oluşturur ve bu uzantılarla zemine sıkıca tutunur. Üçüncü ve son aşamada ise, hücrenin arkasında yer alan adezyonlar kopartılır ve hücre kasılarak kendini ileri doğru iter. İkinci ve üçüncü aşamaların tekrarı ile hücre kemoatraktan sinyalin geldiği yöne doğru ameboid hareketini sürdürür.

Hücre göçünün gerçekleşmesi için bir kemoatraktan sinyalin varlığının algılanması ilk ve en önemli aşamadır. Pek çok farklı hücre türü için pek çok farklı kemoatraktan madde ve bu kemoatraktan maddeleri algılayan ve genelde G protein aracılı olarak çalışan almaçlar vardır (63). Almaçlarla algılanan sinyaller hücre içinde bazı ikincil mesajcı sinyalleri uyarmaktadır. Bu ikincil mesajcı sinyaller ile hücrenin önü ve arkasında oluşmuş az miktardaki kemoatraktan madde gradyentinin hücre içinde artırılmış ön-arka gradyenti olarak oluşması sağlanır (63). Bu ikincil mesajcılar arasında PI3K (*Phosphatidyl Inositol phosphate 3 Kinase*, fosfatidil inositol 3 fosfat kinaz) tarafından oluşturulmuş PIP₃ (*Phosphatidyl Inositol tris-phosphate*, fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfat) gradyenti önemli bir yer tutmaktadır (63). PIP₃ üretimi ve yıkımının düzenlenmesindeki bozukluklar yönlenmiş hücre göçü hareketlerini ciddi şekilde bozmaktadırlar. Rac ve Rho GTPaz'ların ise, göç etmekte olan bir hücrenin sırasıyla önü ve arkası sinyalini oluşturmaktan sorumlu oldukları düşünülmektedir (63) (Şekil 2.7).

Hücre göçünün gerçekleştirilmesi için ökaryotik hücreler hücre iskeletini kullanmaktadırlar. Hücre iskeleti elemanlarından özellikle aktinin hücre göçünde önemli olduğu bildirilmiştir (64). Aktin proteininin hücre önü ve arkasında farklı işlevler üstlenecek şekillerde polimerize edilmesi hücrenin göç yönünde lamellipodlar uzatarak zemine tutunmasını sağlar (64). Göç yönüne göre hücrenin arkası olarak işlev gören bölgede de aktin polimerleri ile myozin ilişkiye girerek

burada hücrenin zeminden kopmasını ve myozin aracılı kasılma ile hücrenin öne itilmesini sağlamaktadırlar (63). Hücre organellerinin yerleşimi ve veziküler transportun düzenlenmesi de hücre göçünün kontrolü açısından önemlidir. Özellikle Golgi Aparatı'nın hücrenin göç ettiği yönde yerleşmesi ve eksiksiz işlev göstermesi hücre göçünün düzgün bir şekilde gerçekleşebilmesi için gereklidir (65).



Şekil 2.7. Hücre göçünü kontrol eden hücre içi sinyal yolları. Solda göç etmekte olan bir nötrofilin fibriler aktin (F-aktin) (kırmızı) ve myozin II (yeşil) ile florasan boyanması görülmektedir (63). Göç yönündeki lamellipod içinde fibriler aktin organizasyonu göze çarparken hücrenin arkasındaki üropod yapısı içerisinde hücrenin kasılarak ilerlemesinden sorumlu myozin II proteininin yerleşimi görülmektedir. Sağda ise kemoatraktan sinyalin hücre önü ve hücre arkasını belirlemesinden sorumlu hücre içi sinyal iletim yolları görülmektedir. Hücre önü sinyalinin oluşmasında özellikle PIP₃ ve Rac görev alırken hücre arkası sinyalinin oluşmasında Rho proteininin görev aldığı model gösterilmektedir.

2.6. Hücre Göçü Çalışma Teknikleri

Hücre göçünün ölçümü temel olarak iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlardan biri hücre göçünün *in-vitro* ölçümü iken diğeri hücre göçünün *in-vivo* ölçümüdür. *In vitro* çalışmalar daha kolay yapılabilir ve standardize edilebilirken *in vivo* çalışmaların standardizasyonu zordur ve canlı hayvanlar çalışma ortamı olarak kullanıldıkları için karmaşık sistemlerin etkileşimi incelemeyi zorlaştırır. Ancak, *in vivo* çalışmaların kuvvetli yanı tüm bir canlı sistemin içindeki karmaşık bir olay olan hücre göçünü daha gerçekçi ve doğru modellemesidir. Bu nedenle, bir hücre göçü çalışmasına öncelikle daha izole sistemler olan *in vitro* çalışmalarla başlamak gerekmektedir (66,67).

In vitro hücre göçü çalışmalarının temel olarak beş tipi bulunmaktadır. Bunlar, yara iyileşmesi, 2 boyutlu deneyler, 3 boyutlu deneyler, filtre deneyleri ve yönelim deneyleridir (66). Her deney modelinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle hücre göçü çalışmaları için; araştırılan soruya, ekonomik duruma ve alt yapı – laboratuvar koşullarına göre en uygun düzeneği seçmek gerekmektedir. Ayrıca, kemotaksis (hedefli olarak bir kemoatraktan doğru olan hücre göçü hareketi) ya da kemokinezis (bir kemoatraktan yanıt olarak hedefsiz, her yöne olan hücre göçü hareketi) ayrımı da deney sistemi seçimi konusunda önemlidir (66).

2.6.1. Yara İyileşmesi Deney Düzeneği

Yara iyileşmesi deney düzeneği en basit ve en az ekonomik kaynak gerektiren düzenektir. Bu düzenek tek katman haline gelmiş bir hücre grubunda yara açmak, esasına dayanır (68). Tek katman halindeki hücreler bu yarayı bölünerek ve bu alana doğru göç ederek doldururlar. Yaranın dolması için geçen sürenin ölçümü ise, hücre göçü hakkında bilgi sağlar. Bu yöntemin en önemli avantajı kolay yapılabilir ve ucuz oluşudur. Dezavantajları ise, kemoatraktanların kullanılmaması, hücre göçü ile hücre bölünmesinin deneye ortak katkıda bulunması ve çok bilgi verici olmamasıdır. Yara iyileşmesi deneyinin değiştirilmiş bir modelinde GFP (*Green Florescent Protein*, Yeşil Florasan Protein) ifade eden hücrelerin yaranın doldurulmasına katkısı

incelenmektedir (68). Böylece, geçici transfeksiyona uğramış hücreler yara iyileşmesi deney düzeneği içerisinde kullanılabilir.

2.6.2. İki Boyutlu Deney Düzenekleri

İki boyutlu deney düzenekleri, hücre grubundan uzakta bir bölgeye yerleştirilmiş bir kemoatraktan madde kaynağına karşı, hücre hareketinin ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemde kemoatraktan yavaş olarak salan bir ortam, kültür kabının içinde bir kemoatraktan gradyenti oluşturur ve hücreler buna cevap vererek o yöne doğru göç etmeye başlarlar. Bu yöntemin avantajı ucuz olması ve kemotaksisi sayısal olarak ölçebilmesidir. Dezavantajı ise, gradyentin kısa süreli olması nedeniyle az miktarda hücre göçü hareketi saptanması ve kemokinezisin kemotaksisten ayırt edilememesidir. Gerek duyulursa zeminin hücrelerarası matriksi andıran veya hücrelerarası matrikste bulunan maddelerle kaplanması da mümkündür (66).

2.6.3. Üç Boyutlu Deney Düzenekleri

Üç boyutlu deney düzenekleri ise, 2 boyutlu deney düzeneklerine benzemektedir. 2 boyutlu deney düzeneklerinden farkı hücre göçü hareketlerinin 3 boyutlu hücrelerarası matriks benzeri bir matriks içerisinde incelenmesidir. Bu şekilde, özellikle bazı hücre tipleri için hücre göçünün *in vivo* ortama daha çok benzer şekilde modellendiği öne sürülmektedir (66). Bazı hücre tipleri 3 boyutlu deney sistemlerinde 2 boyutlu deney sistemlerinde davrandıklarından farklı davranabilmektedirler (69).

2.6.4. Filtre Deneyleri

Filtre deneyleri, hücrelerin üzerinde belirli büyüklükte delikler olan bir filtreden, filtrenin diğer tarafındaki besiyerine göç hareketlerini gösteren bir sistemdir. Bu deney sisteminde filtre üzerindeki deliklerden ancak aktif göç hareketi yapabilen hücreler geçebilmektedir (66). Filtre deney sistemlerinde test edilen hücre göçü hareketi hücrelerin diapedez hareketleridir. Aktif göç hareketi yapmayan

hücrelerin diğer ortama geçmemesi göç eden hücrelerin sayısının belirlenmesi açısından önemlidir. Bu nedenle, filtre üzerindeki deliklerin çapları hücre büyüklüğüne göre seçilerek aktif göç hareketi yapmayan hücrelerin diğer ortama geçmesi engellenmektedir. Bu deney düzeneklerinde ölçülen, hücresiz ortama geçen hücre sayısıdır. Bu deney düzeneklerinde ayrıca kemotaksis ve kemokinezis farkı da ayırt edilebilmektedir.

2.6.6. Yönelim Deneyleri

Yönelim deneyleri, niceliksel hücre göçü ölçümü konusunda en çok bilgi veren *in vitro* hücre göçü deney sistemleridir (66). Bu deneyler uzun süreli bir kemoatraktan gradyentinin sağlandığı ortamlarda hücrelerin göç etmesi esasına dayanır. Kemoatraktan gradyenti uzun süreli olduğu için hücre göçünün mesafesi hakkında sağlıklı bir ölçüm yapılabilir. Bu yöntemlerin en bilinenlerinden biri "Agaroz Altı" deney sistemidir (70). Bu deney sisteminde, agaroz ile oluşturulmuş bir jel ortama açılan kuyucuklardan faydalanılır. Bu kuyucuklara hücreler ve kemoatraktan maddeler konularak, hücrelerin agar altından hareket etmeleri sağlanır. Bu yöntem hücre göçü açısından en iyi verileri sağlayan *in vitro* yöntemdir. Her türlü niceliksel ölçüm ve kemotaksis – kemokinezis ayrımı yapılabilir. Bu deney sisteminin en büyük dezavantajı standardizasyonunun zor olmasıdır.

Yönelim deneyleri sistemlerini de temel olarak 2 alt başlık altında incelemek mümkündür (67). Bunlardan bir tanesi statik yönelim deneyleridir. Bu deney sistemlerinde hücreler durağandır ve sadece kemoatraktan doğru hareket etmeleri beklenir. Bir diğer tip yönelim deneyi sistemleri ise akım altında çalışan yönelim deneyi sistemleridir. Bu durumda kemoatraktan cevap vermesi beklenen hücreler akım altındadır. Bu ikinci sistem *in vivo* durumu daha iyi taklit etmekle beraber uygulanması zordur.

3. YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Çözeltiler

3.1.1. Klonlama

JM109 *Escherichia coli* kompetan hücreler

Mini-prep DNA izolasyon kiti (Promega)

Sıvı Besi yeri pH 7,5: 10g Tripton (Applichem)

5g Maya özütü (Applichem)

5g NaCl (Sigma)

1L Distile Su

Katı Besi yeri: 10g Tripton (Applichem)

5g Maya özütü (Applichem)

5g NaCl (Sigma)

15g Agaroz

1ml Kanamisin (Gibco) (1:100 seyreltilmiş)

1L Distile Su

Vektörler*: pcDNA3.1 (Clontech) (pcDNA vektörü)

pcDNA3.1 + *pyrin*-GFP (*pyrin*-GFP vektörü)

pcDNA3.1 + GFP (GFP vektörü)

pcDNA3.1 + *myc-pyrin* (doğal *pyrin* vektörü)

pcDNA3.1 + *myc-pyrin*M694V (M694V *pyrin* vektörü)

pcDNA3.1 + *myc-pyrin*M680I (M680I *pyrin* vektörü)

pcDNA3.1 + *myc-pyrin*V726A (V726A *pyrin* vektörü)

* Vektörler Michigan Üniversitesi Hücre ve Gelişimsel Biyoloji Bölümü, Dr. Deborah Gumucio tarafından hediye edilmiştir.

3.1.2. Hücre Kültürü

Cos-7 Hücre Hattı* (LGC promochem ATCC)

HeLa Hücre Hattı* (LGC promochem ATCC)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Biochrom)

FCS (*Fetal Calf Serum*, Fötal Sığır Serum) (Biochrom)

Tripsin EDTA (Etilen-Diamit-Tetra-Asetik asit) (Biochrom)

L-glutamin (Biochrom)

Kolşisin (Biological Industries)

Kollajen tip I (fetal sığır derisinden) (Sigma)

Kollajen tip IV (insan plasentasından) (Sigma)

8µm delikler içeren polikarbonat membran (Greiner Bio-One)

İnsülin (Sigma)

Seakem GTG Agaroz (Lonza)

Lizis Tamponu: 10 mM Tris-Base (pH 7,4)

300 mM NaCl

2 mM EDTA

0,5% Triton-X-100

Proteaz inhibitör kokteyli (Roche) (1 tablet/10ml)

3.1.3. Florasan Boyama

Triton X-100 (Sigma): %0,2 /PBS (v/v)

Keçi serumu (Sigma): %3 /PBS (v/v)

Sığır serum albumini (Sigma): %10 /PBS (w/v)

Tween 20 (Sigma): %0,1 /PBS (v/v)

DAPI (Sigma)

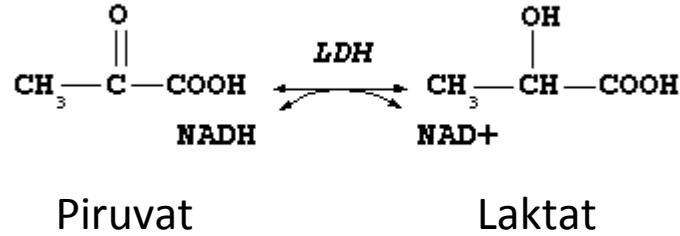
Falloidin-AF488 (Invitrogen)

Asetometoksi Kalsein (Kalsein AM) (Sigma)

ProLong Antifade Kiti (Molecular Probes)

* Hücre hatları Michigan Üniversitesi Hücre ve Gelişimsel Biyoloji Bölümü, Dr. Deborah Gumucio tarafından hediye edilmiştir.

sitoplazmik bir enzimdir (Şekil 3.1). Anaerobik glikolizin devam edebilmesi için gerekli bu enzim pek çok hücrede ifade edilmektedir ve hücre zarının bütünlüğü bozulduğunda hücre dışına çıkmaktadır. Bu nedenle hücre dışındaki LDH aktivitesi hücre ölümünü saptamak için kullanılabilir. Piruvatın laktata dönüşümünü gerçekleştiren LDH enziminin aktivitesi sonucu ortamda bulunan koenzim olan NADH ise NAD^+ molekülüne yükseltgenmektedir (Şekil 3.1). NADH'nin yükseltgenmesi ise 340nm dalga boyundaki absorbansını düşürmektedir. Bunun saptanması ile de LDH aktivitesinin saptanması mümkün olmaktadır (71).



Şekil 3.1. LDH enziminin aktivitesi.

Kolşisin hem hücre döngüsünü mitozun metafaz aşamasında durdurduğu bilinen hem de hücre ölümüne yol açabilen bir maddedir. Bu nedenle hücrenin genel ve çekirdek morfolojisi kolşisinin hücreler üzerine toksik aktivitesinin saptanması açısından gereklidir.

12 kuyucuklu kültür kapları içerisine yaklaşık 2×10^4 hücre olacak şekilde aktarılan COS-7 ve HeLa hücreleri 16-18 saat DMEM, (%10 FCS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin) besi yerinde 37°C %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Zemine yapışan hücrelerin besi yerine 0, 5, 7,5, 10, 20, 50, 100, 1000ng/ml derişimlerinde kolşisin eklendi. 24 saat 37°C %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyonun ardından hücreler üzerindeki besi yerlerinden 500 μl toplanarak 1,5ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Ortamda bulunan maksimum hücre sayısını saptamak için kolşisinsiz besi yerinde inkübe edilen hücrelerin üzerine lizis tamponu eklenerek hücrelerin içerisindeki LDH'nin tüm lizis tamponu içine yayılması sağlandı. Böylece, 24 saat sonrasında kültür kabında bulunan toplam ortalama hücre sayısına yönelik

bilgi elde edildi. Bu besi yerlerindeki LDH enzim aktivitesi daha sonra LDH enzim aktivitesi ölçüm kiti (Cobas) kullanılarak Roche/Hitachi 917 otoanalizöründe ölçüldü. Her örnek üçlü olarak çalışıldı.

Besi yerleri tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edildi. Sonrasında DAPI ile çekirdek boyaması yapılarak epiflorasan mikroskopta incelendi ve hücre ile çekirdek morfolojisi değerlendirildi.

3.2.2. Kolşisine Maruz Kalan Hücrelerde Mikrofilament - Mikrotübül Hücre İskeletinin ve Endoplazmik Retikulum - Golgi Aparatı'nın Durumunun Gösterilmesi

Kolşisin öncelikle hücre iskeleti üyelerinden mikrotübülleri etkilemektedir. Bu nedenle, kolşisin özellikle mikrotübül üzerine olan etkilerinin saptanması toksisitesinin saptanması açısından gereklidir. Ayrıca, Golgi Aparatı'nın hücre göçünün sağlanması ve devamında önemli olduğu bilinmektedir. Kolşisin de hücre mikrotübül iskeletinin yapısını bozarak sitoplazmik organellerin yapısını ve sitoplazma içi yerleşimini bozabilmektedir (65). Bu nedenle kolşisin hücre içi organeller üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Hücre iskeleti üyelerinin hücre içi yerleşiminin gösterilmesi için immünflorasan ve kemiflorasan boyama kullanılmıştır. İmmünflorasan boyama için gösterilmek istenen proteine özgül birincil antikor ile protein işaretlenmiş, ardından florasan işaretli ve birincil antikora özgül ikincil antikor ile proteinin hücre içi yerleşimi belirlenmiştir. Kemiflorasan boyamada ise, bir proteine bağlanmakta özgül olan florasan işaretli küçük bir kimyasal molekülden faydalanılarak proteinin hücre içi yerleşimi belirlenmiştir.

Florasan boyama için 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂ içeren etüvde 0, 5, 7,5, 10, 20, 50, 100ng/ml derişiminde kolşisin içeren besi yerinde lamel üzerinde inkübe edilen hücreler %4 paraformaldehit ile 30 dakika fikse edildikten sonra PBS ile yıkandılar. Bundan sonra %0,2 TritonX-100/PBS çözeltisi ile hücre içi proteinlere erişimi sağlamak için permeabilize edildiler. Sonraki aşamada hücreler, %3 keçi serumu, %10 sığır serum albumin ve %0,1 Tween 20/PBS çözeltisi ile 1 saat bloke edildi. Bahsedilen her derişim için ikişer boyama yapıldı.

Birinci boyamada, hücrelerin aktin-tübülün hücre iskeleti boyandı. Önce, birincil antikor olarak kullanılan 1:1000 seyreltilmiş anti- α -tübülün ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilen hücreler, daha sonra ikincil antikor olarak 1:1000 seyreltilmiş anti-fare AF568, 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildiler. Daha sonra da 1:20 seyreltilmiş falloidin-AF488 ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilen hücrelerin çekirdekleri DAPI ile boyandı.

İkinci boyamada hücreler Golgi Kompleksleri için belirteç olarak kabul edilen GOLPH4 (*GOLgi Phosphoprotein 4*, Golgi fosfoprotein 4) ve Endoplazmik retikulum için belirteç olarak kabul edilen PDI (*Protein Disulfide Isomerase*, Protein Disülfid İzomaz) proteinlerine karşı olan antikorlar ile boyandı. Öncelikle, hücreler 1:1000 seyreltilmiş anti-GOLPH4, 1:1000 seyreltilmiş anti-PDI ile oda sıcaklığında 1'er saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler, ikincil antikor olarak 1:1000 seyreltilmiş anti-fare AF568 ve 1:1000 seyreltilmiş anti-tavşan AF488 ile oda sıcaklığında 40'ar dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre çekirdekleri için DAPI boyaması yapıldı.

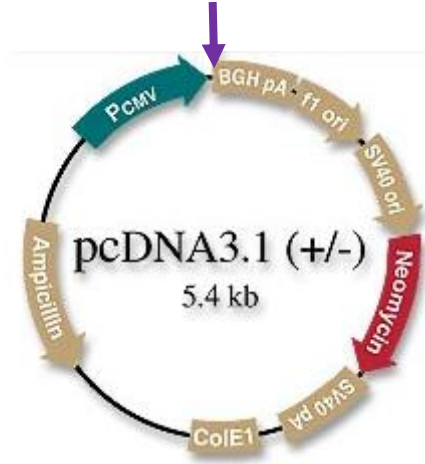
Boyama işleminden sonra lameller üzerine kaplama ortamı damlatılarak kapatıldı. Hazırlanan preparatlar epiflorasan mikroskop altında incelenip hücrelerin durumuna göre toksik kolşisin derişimi belirlendi.

3.3. Vektör Kasetlerinin Çoğaltılması

Hücre göçü deneylerinde *pyrin* ve mutant formlarının etkilerini göstermek üzere *pyrin* proteinini doğal olarak ifade etmeyen hücre hatları istenen proteini ifade etmeleri için çeşitli vektörlerle transfekte edilmiştir. Bu vektörlerin deneyler için yeterli miktarda olabilmelerini sağlamak amacıyla da vektörler önce *E. coli* hücrelerinde çoğaltılarak izole edilmiştir.

Vektör kasetlerinin çoğaltılması için pcDNA3.1, pcDNA3.1+*pyrin*-GFP, pcDNA3.1+myc-*pyrin*, pcDNA3.1+myc-*pyrin*M694V, pcDNA3.1+myc-*pyrin*M680I, pcDNA3.1+myc-*pyrin*V726A ve pcDNA3.1+GFP çembersel vektörleri (Şekil 3.2) ile bakteri hücreleri transforme edildi. Bunun için, 50ng vektör DNA'sı kompetan bakteri hücreleri üzerine ilave edilerek, 30 dakika buzda inkübe edildi. 45 saniye 42⁰C'de ısı ile şok yapılarak 2 dakika buzda inkübe edildi. Kompetan hücreler üzerine

0,5ml sıvı besi yeri eklenerek, 1 saat çalkalamalı etüvde 37⁰C'de inkübe edildi. Önceden ısıtılan LB-kanamisin katı besi yerlerine ekim yapıp, 16-18 saat 37⁰C etüvde inkübe edildi. Antibiyotiğe dirençli kolonilerden tek koloni ekimi yapıldı. Plazmit DNA'sı izolasyonu, Mini-prep DNA izolasyonu kiti ile kit protokolünün önerdiği şekilde yapıldı.



Şekil 3.2. Transfeksiyon deneylerinde kullanılan pcDNA3.1 vektörünü gösteren şekil. İlgili cDNA dizisinin pcDNA3.1 vektörüne takıldığı bölge ok ile gösterilmektedir.

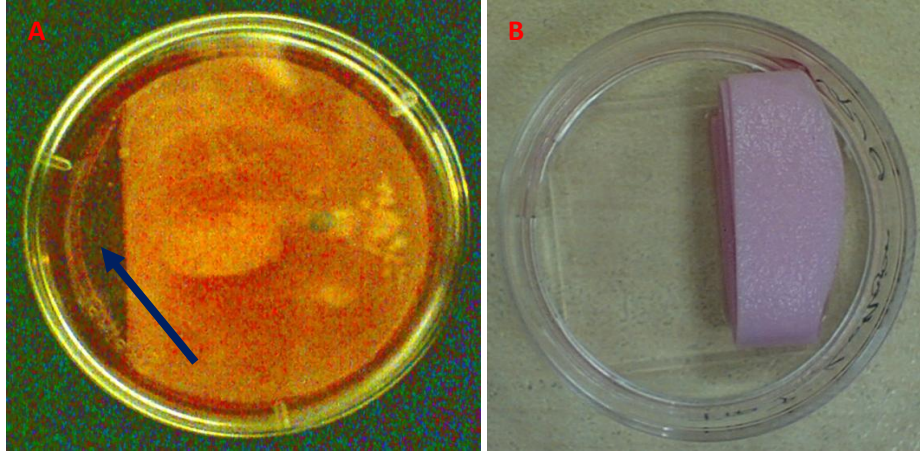
3.4. İki Boyutlu Deney Sistemleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

İki boyutlu deney sistemlerinde kemoatraktan maddeye doğru olan hücre göçünün ölçülmesi amaçlanmaktadır. Bunu sağlayabilmek için bir tarafında kemoatraktan madde olarak insülin, diğer tarafında ise COS-7 hücreleri bulunan bir sistem kullanılmıştır. Hücrelerin göç hareketlerini saptayabilmek için besi kaplarının zemini kollajen tip I ve kollajen tip IV ile kaplandı.

3.4.1. İnsülin Emdirilmiş Whatmann Kağıdı Kullanılarak 2-Boyutlu Deney Sisteminde Hücre Göçünün Modellenmesi

35mm'lik kültür kapları tip I kollajen veya tip IV kollajen ile kaplandı. COS-7 hücrelerinin kültür kabının içerisinde sadece kısıtlı bir alana ekilebilmeleri ve burada zemine tutunabilmeleri için hücre kültürü kabı içerisine yerleştirilebilen bir akrilik

kalıptan faydalanıldı. Akrilik kalıp yerleştirildikten sonra kültür kabı içerisine yaklaşık 2×10^4 hücre ekildi (Şekil 3.3A). 24 saat 37°C %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildikten sonra kalıp uzaklaştırıldı ve kültür kabının hücre içermeyen aksi yönüne katlanmış ve 121°C 'de otoklavlanarak sterilize edilmiş Whatmann kağıdı yerleştirildi (Şekil 3.3B). Whatmann kağıdı üzerine yaklaşık $1000\mu\text{g}$ olacak şekilde insülin emdirildikten sonra hücreler 37°C %5 CO_2 içeren canlı hücre görüntüleme düzeneğinde 24 saat izlendi.



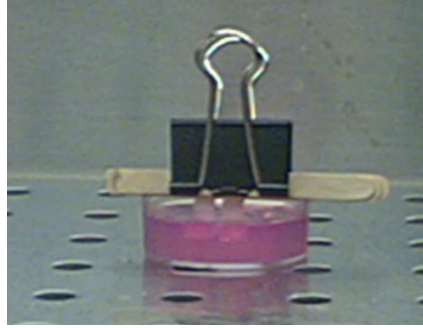
Şekil 3.3. 2 boyutlu deney sistemi. A'da COS-7 hücrelerini 35mm'lik kültür kabının sadece bir noktasına yerleştirmek için kullanılan akrilik kalıp görülmektedir. Mavi ok COS-7 hücrelerini içeren bölgeyi işaret etmektedir. B'de insülin emdirilmiş ve hücrelerin bulunduğu bölgenin karşı tarafına yerleştirilmiş Whatmann kağıdı görülmektedir.

3.4.2. Agaroza İnsülin Diffüzyonu ile 2-Boyutlu Hücre Göçünün Modellenmesi

%2 (w/v) Seakem GTG Agaroza DMEM içerisinde çözünmesi ve 35mm kültür kabına dökülüp, taraklar yardımıyla 2 adet kuyucuk açılması sağlandı (Şekil 3.4). 2 saat oda sıcaklığında katılaştıran jel daha sonra hücre kültürü kabının yarısını kaplayacak şekilde kesildi ve deney gününe kadar 37°C %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.

COS-7 hücreleri, 35mm'lik kültür kabı içerisine Bölüm 3.4.1'de açıklandığı şekilde ekildikten sonra hazırlanan %2'lik jel kalıbı kültür kabının aksi yönüne

yerleştirildi ve kuyucukların içine yaklaşık 1000µg olacak şekilde insülin eklenip hücreler 37⁰C %5 CO₂ içeren canlı hücre görüntüleme düzeneğinde 24 saat izlendi.



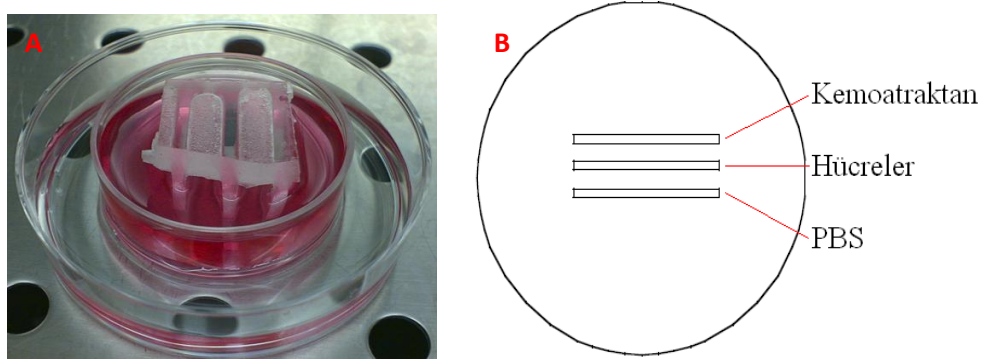
Şekil 3.4. 35mm'lik kültür kabı içerisinde jelleşmekte olan ve içerisine 2 adet kuyucuk açılmış agaroz jel kalıp.

3.5. Agaroz Altı Hücre Göçü Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

Agaroz altı hücre göçü deneyleri, hücre göçü konusunda en iyi bilgi veren deney düzenekleri arasındadır. Bu deney için hücrelerin göç etmesine izin verecek şekilde agaroz içerisine açılmış kuyucuklar yardımıyla hücrelerin agaroz altında kemoatraktan maddeye olan göçü incelenir.

Deney için Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi %2 (w/v) Seakem GTG Agaroz DMEM içerisinde hazırlanarak 35mm kültür kabı içerisinde katılması sağlandı. Katılma sırasında kullanılan tarak yardımıyla birbirine paralel 3 adet yaklaşık 1x20mm boyutlarında ve birbirlerinden 4mm uzaklıkta paralel 3 kuyucuk oluşturuldu. Daha sonra bir gece 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilen jel içerisindeki kuyucuklar bistüri ile keserek ve cam pastör pipeti ile jel parçalarını emerek uzaklaştırma yoluyla tabanları kültür kabı ile temas edecek şekilde derinleştirildi.

Agaroz jelden oluşan kalıp hazırlandıktan sonra ortadaki kuyucuğa yaklaşık 5x10⁴ COS-7 hücresi içeren DMEM, bunun bir yanındaki kuyucuğa 250µg/ml insülin içeren PBS, diğer yanındaki kuyucuğa sadece PBS eklendi (Şekil 3.5). Kültür kabı 24 saat boyunca 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildikten sonra hücreler agaroz altına olan göçleri açısından faz-kontrast mikroskopisiyle gözlemlendi.



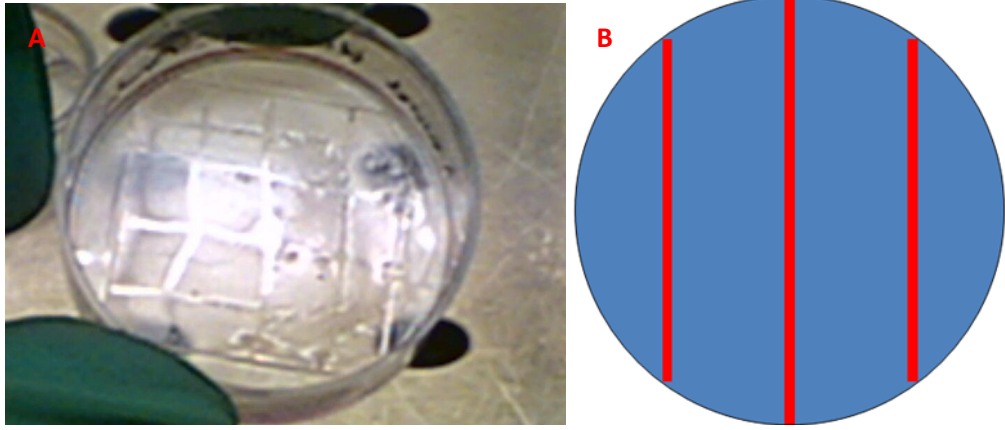
Şekil 3.5. Agaroz altı hücre göçü deney sistemi. A’da birbirine paralel 3 kuyucuk oluşturmak için kullanılan fiberglas kalıp görülmektedir. B’de ise birbirine paralel 3 kuyucuğun şematize edilmiş şekli bulunmaktadır.

3.6. Yara İyileşmesi Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

Yara iyileşmesi deneylerinde %100 olarak zemini kaplamış tek katlı hücre katmanı içeren bir kültür kabında hücre katmanı üzerinde boşluklar oluşturulur. Böylece, yara sınırlarındaki hücrelerin yarayı doldurması gözlemlenir.

3.6.1. COS-7 ve HeLa Hücrelerinde Yara İyileşmesi Deney Sisteminde Hücre Göçü Sırasında Hücre İskeletinin Durumunun Gözlenmesi

Hücreler, kültür kabının zeminini %60-70 kaplayacak yoğunlukta DMEM içerisinde 35mm’lik hücre kültürü kabına ekildi. 24 saat 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilerek hücrelerin zemini %100 kaplamaları sağlandı. Daha sonra steril 100µl’lik mikropipet ucu kullanılarak hücre katmanının üzerinde birbirine paralel 3 adet hücre içermeyen yara açıldı (Şekil 3.6). Besi yeri 2 kez değiştirilerek yara açılması sırasında zeminden kalkan ve besi yerinde yüzmekte olan hücreler uzaklaştırıldı. Yaraların hücre göçü ile kapanması için hücreler 24 saat 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Bölüm 3.2.2’de açıklandığı şekilde hücreler fikse edilip aktin ve mikrotübül hücre iskeletleri için kemiflorasan ve immünflorasan boyama yapıldı ve epiflorasan mikroskop altında incelendi.



Şekil 3.6. Yara iyileşmesi deney sistemi. A’da zemininde lamel bulunan 35mm’lik bir kültür kabının tabanını kaplayan tek katman halindeki HeLa hücreleri üzerinde steril 100µl’lik mikropipet ucu kullanılarak açılmış yaraların makroskopik görünümü bulunmaktadır. B’de ise birbirine paralel 3 yara açılan ve bu araştırmada kullanılan deney sisteminin şematik görüntüsü yer almaktadır.

3.6.2. COS-7 ve HeLa Hücrelerinde Yara İyileşmesi Deney Sisteminde *Pyrin* Transfeksiyonu Sonrası Hücre Göçü Sırasında *Pyrin* Yerleşiminin Gösterilmesi

Hücreler kültür kabının zeminini %35-40 kaplayacak yoğunlukta DMEM içerisinde, zemininde lamel bulunan 35mm’lik hücre kültürü kaplarına ekildi. 24 saat 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilerek hücrelerin zemine yapışması ve zemini %70-80 kaplamaları sağlandı. Bundan sonra hücreler doğal *pyrinin* ökaryotik transkripsiyonu için gerekli DNA elemanlarını içeren pcDNA3.1 vektörleri ile transfekte edildi.

COS-7 ve HeLa hücrelerinin transfeksiyonu için FuGeneHD transfeksiyon kiti kullanıldı. 1000ng vektör DNA’sı, 6µl FuGeneHD transfeksiyon kiti ve son hacim 100µl olacak şekilde MEM eklenerek hazırlanan ön inkübasyon çözeltisi 45 dakika sonra hücreler üzerine eklenerek transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyonun başlamasından yaklaşık 12 saat sonra steril 100µl’lik mikropipet ucu kullanılarak hücre katmanının üzerinde birbirine paralel 3 adet hücre içermeyen yara açıldı. Besi yeri 2 kez değiştirilerek yara açılması sırasında zeminden kalkan ve besi yerinde

yüzmekte olan hücreler uzaklaştırıldı. Yaraların hücre göçü ile kapanması için hücreler 24 saat 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Bölüm 3.2.B'de açıklandığı şekilde hücreler fikse edilip aktin ve mikrotübül hücre iskeletleri için kemiflorasan ve immünflorasan boyama yapıldı ve epiflorasan mikroskop altında incelendi.

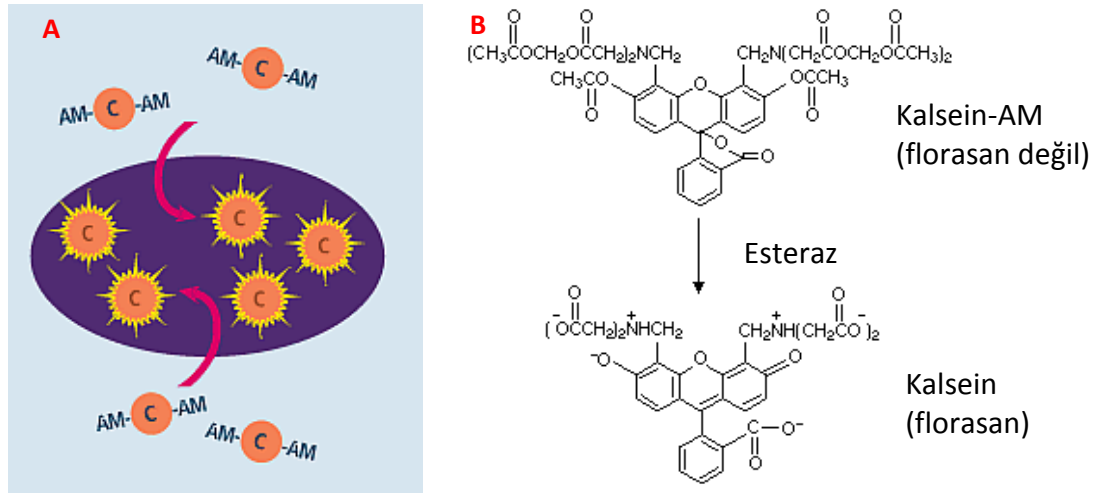
3.6.3. HeLa Hücrelerinde Yara İyileşmesi Deney Sisteminde *Pyrin* Hücre Göçü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

Pyrin hücre göçü üzerine etkisinin kantite edilmesi için boşluksuz ve sıkı bir tek katman oluşturabilen bir epitelyal hücre hattı olan HeLa hücreleri model olarak kullanıldı. Transfeksiyonun ve aşırı protein ifadesinin hücre üzerine olabilecek olumlu veya olumsuz etkilerini sergileyen GFP aşırı ifade eden hücrelerin olduğu kontrol grubu ile *pyrin* proteinin etkisini yansıtması beklenen *pyrin*-GFP füzyon proteinini aşırı ifade eden deney grubundaki hücre göçü miktarı yara sınırına ulaşmış transfekte hücreler sayılarak karşılaştırıldı.

HeLa hücreleri Bölüm 3.6.2'de açıklandığı şekilde; sadece GFP veya *pyrin*-GFP füzyon proteininin ifadesini sağlayan vektörler kullanılarak transfekte edildi. Sonrasında, Bölüm 3.6.2'de açıklandığı şekilde HeLa hücrelerinde yara iyileşmesi deneyi uygulandı. Yara iyileşmesinin başlatılmasından 36 saat sonra kültür kapları hücreler fikse edilmeden ve henüz canlılarken epiflorasan mikroskopta yaklaşık 20 sağlıklı yara alanından fotoğraf çekildi. Fotoğraf çekilecek yara alanları belirlenirken yaranın dışında büyük boşluklar olmamasına ve yara zemini içine yüzerek gelip yapışmış ve çoğalmış hücre kümeleri olmamasına dikkat edildi. Daha sonra yara sınırında yeşil florasan sinyal verme durumlarına göre ayırt edilebilen transfekte olan veya olmayan hücreler sayıldı. Ayrıca, genel transfeksiyon etkinliğinin saptanması amacıyla %100 hücre yoğunluğunun olduğu alanlardan da fotoğraflar çekildi.

3.7. Filtre Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

Filtre deneyleri hücrelerin özellikle bir kemoatraktan maddeye cevap olarak geliştirdikleri diapedez hareketinin miktarının saptanması için kullanılan bir hücre göçü modelleme düzeneğidir. Bu amaçla, COS-7 hücreleri ve fibroblast - fibroblast benzeri olan hücrelerin genel kemoatraktanı olan insülin kullanılarak COS-7 hücrelerinin diapedez şeklindeki hücre göçü hareketlerine çeşitli vektörlerle transfeksiyonun ve kolşisin varlığının etkisi kantite edildi. Bunun için, göç eden hücreler bir canlı hücre boyası olan kalsein-AM ile boyandı. Kalsein-AM canlı hücrelerdeki esterazlar aracılığıyla açıl grupları uzaklaştırılarak yeşil florasans veren kalseine dönüştürülen ve hücre içerisinde hapsolan bir florasans boyadır (Şekil 3.7). Bu şekilde boyanan canlı hücreler, tripsin ve TritonX-100 ile patlatılarak kalseinin homojen olarak dağıldığı çözeltiler elde edildi. Bu çözeltilerin florasansı ölçülerek göç eden veya etmeyen hücre miktarları saptandı.



Şekil 3.7. Kalsein-AM'nin canlı hücreleri boyama ilkesi. A'da kalsein-AM (AM-C-AM) boyasının hücre içerisine girerek hücre içi esterazlarla açıl gruplarının uzaklaştırılması ardından (C) hücre içinde hapsoldüğünü gösteren şematik resim bulunmaktadır (72). B'de ise Kalsein-AM'nin ve kalseinin kimyasal yapısı görülmektedir. Kalsein-AM'de olmayan; ancak kalsein üzerinde bulunan yüklü grupların varlığına dikkat ediniz (73).

3.7.1. COS-7 Hücrelerinde *Pyrin*, *Pyrin* Mutantları ve Kolşisin Hücre Göçü Üzerine Etkisinin Gösterilmesi İçin Filtre Deney Düzeneginin Kullanılması

Öncelikle, 8µm boyutunda delikler içeren polikarbonat membranlı aparat (*ThinCert*) alt yüzü üstte kalacak şekilde 12 kuyucuklu kültür kaplarına ters olarak yerleştirildi. Membranların alt zeminleri membranın üzerini tamamen kaplayacak şekilde 50µl tip I kollajen çözeltisi ile kaplanıp 24 – 36 saat 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Daha sonra aparatlar 24 kuyucuklu kültür kabı içine düz bir şekilde yerleştirildi. Aparatların alt kısmına sadece, 250µg/ml insülin ve %5 FCS içeren DMEM ya da 250µg/ml insülin, 10µg/ml kolşisin %5 FCS içeren DMEM besi yerlerinden 500µl konuldu. Aparatların üst kısımlarına ise, pcDNA3.1, doğal *pyrin* vektörü, M694V *pyrin* vektörü, M680I *pyrin* vektörü veya V726A *pyrin* vektörü ile transfekte edilmiş COS-7 hücrelerini içeren besi yeri konuldu. Bu besi yerleri 300µl olup yaklaşık 2x10⁴ hücre içermekteydi. Kolşisin içeren deney gruplarında üst kısma da 10µg/ml kolşisin içeren besi yeri içerisinde hücreler kondu. Hücreler, bu şekilde 48 saat boyunca 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

48 saat inkübasyonun ardından aparatın üst ve alt kısmındaki besi yerleri pastör pipeti yardımı ile uzaklaştırıldı ve aparatın üst bölmesine 500µl, alt bölmesine 300µl, 6µM kalsein-AM içeren DMEM çözeltisi eklendi ve bu şekilde 1 saat 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Epiflorasan mikroskop altında hücrelerden yeşil florasan sinyal geldiğinin gözlenmesi ardından pastör pipeti yardımı ile besi yerleri uzaklaştırıldı. Daha sonra, aparatın sadece alt kısmına tripsin çözeltisi eklenerek aparatın alt kısmına yapışmış olan hücrelerin kalkması sağlandı. Bu süreçte yaklaşık 15 dakika boyunca 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyonun ardından kültür kapları 5 dakikada bir şiddetli olarak düz zemin üzerinde çalkalanarak zeminle bağları zayıflayan hücrelerin tripsin çözeltisi içerisinde yüzer hale geçmeleri sağlandı. Bu sürecin yaklaşık 5 kez tekrarlanması ve ışık mikroskobu ile bütün hücrelerin yüzer hale geçtiğinin gözlenmesi ardından her kuyucuk içindeki göç etmiş hücreleri içeren tripsin çözeltisi 1,5 ml'lik Ependorf tüpleri içerisine alındı. Tripsin çözeltilerinin içerisine %10 Triton-X100 içeren PBS çözeltisinden 50µl eklendi ve bu şekilde

yaklaşık 18 saat 4⁰C'de inkübe edilerek hücrelerin parçalanması ve içerdikleri kalseinin çözelti içerisinde homojen olarak dağılması sağlandı.

Tripsin çözeltilerinin aparat içerisinde 1,5 ml'lik Ependorf tüpleri içerisine alınmasının hemen ardından üst kesme 500µl, alt kesme 300µl olacak şekilde %1 Triton-X100 içeren PBS çözeltisi eklendi. Aparatlar bu şekilde yaklaşık 18 saat 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilerek aparatın üst kısmında yer alan göç etmemiş hücrelerin parçalanması ve içerindeki kalseinin çözeltiye homojen olarak dağılması sağlandı. Florasan mikroskop altında tüm hücrelerin parçalandığı ve florasan sinyalin homojen olarak çözelti içine yayıldığı gözlenmesi ardından her kuyucuk içerisindeki çözelti 1,5 ml'lik Ependorf tüpleri içerisine alındı.

3.7.2. Filtre Deneyi Ölçümleri İçin Deney Standartlarının Hazırlanması ve Örneklerdeki Kalsein Florasansının Ölçülmesi

Standartların hazırlanması amacıyla transfekte edilmemiş olan COS-7 hücreleri 35mm'lik hücre kültürü kabı içerisinde yaklaşık 48 saat inkübe edilip zeminin %60-70'ini kapladıklarında üzerlerindeki besi yeri bir pastör pipeti yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 2ml 6µM Kalsein-AM içeren DMEM çözeltisi eklenerek 1 saat 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Hücrelerin florasan mikroskop altında yeşil sinyal verdiklerinin gözlenmesi ve 4 alandan 20X büyütmede fotoğraf çekilmesinin ardından hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılıp tripsin çözeltisi eklendi. Hücrelerin bu çözelti içinde 30 dakika boyunca 37⁰C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmesinin ardından kültür kabı düz bir zemin üzerinde sertçe sarsılarak tüm hücrelerin zemin ile bağlarının kopması sağlandı. Daha sonra, çözelti 1,5 ml'lik Ependorf tüpleri içerisine alınarak standart olarak kullanılmak üzere 4⁰C'de saklandı. Bu çözelti 1:1, 1:2, 1:10, 1:20, 1:100 olacak şekilde seri dilüsyonlar hazırlanarak ölçümler sırasında standart olarak kullanıldı.

Ölçümlerin yapılması için örneklerden 200µl'lik PCR tüpleri içerisine 100µl çözelti alındı. Ölçümler *RotorGene 6000* cihazında 470 nm dalgaboyunda eksitasyon ve 510 nm dalgaboyunda emisyon filtreleri ile 5 dakikalık 50⁰C'ye ısıtma ve daha

sonra bu sıcaklıkta ardışık 10 ölçüm olacak şekilde yapıldı. Her kuyucuktan elde edilen örneklerin florasansı üçer kere ölçüldü.

Her bir kuyucuktan elde edilen 3'lü ölçümlerin ortalaması alındı. Her deney sisteminin 3 biyolojik tekrarına ait aparat altı ve aparat üstündeki florasansa göre hesaplanan hücre sayıları kullanılarak aparat altına göç eden hücre oranları deney grupları arasında karşılaştırıldı.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Epiflorasan ve faz-kontrast mikroskop fotoğraflarının çekilmesi için "*Leica Application Suit 3.1*" ve "*Leica Application Suit 3.7*" kullanılırken konfokal mikroskopi görüntülerinin analizi için "*Carl-Zeiss Laser Scanning Microscopy Image Browser 4.2*" kullanılmıştır. Farklı florasan kanallardan alınan görüntülerin birleştirilmesi ve kontrast - renk ile ilgili düzenlemelerin yapılması için "*ACDSee PhotoEditor 2008 Build 291*" kullanılmıştır. Fotoğrafların değerlendirilmesi ve hücre sayımı için "*ImageJ 1.43u*" kullanılmıştır.

RotorGene 6000 ile yapılan ölçümlerin değerlendirilmesi, ayrıca bu ölçümlere ait standart eğrilerin çizilmesi için "*Rotorgene 6000 Series Software 1.7 Build 87*" kullanılmıştır.

Tüm diğer grafiklerin çizimi ve istatistiksel analizler için "*GraphPad Prism 5.01*" kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kolşisin Derişiminin Belirlenmesi

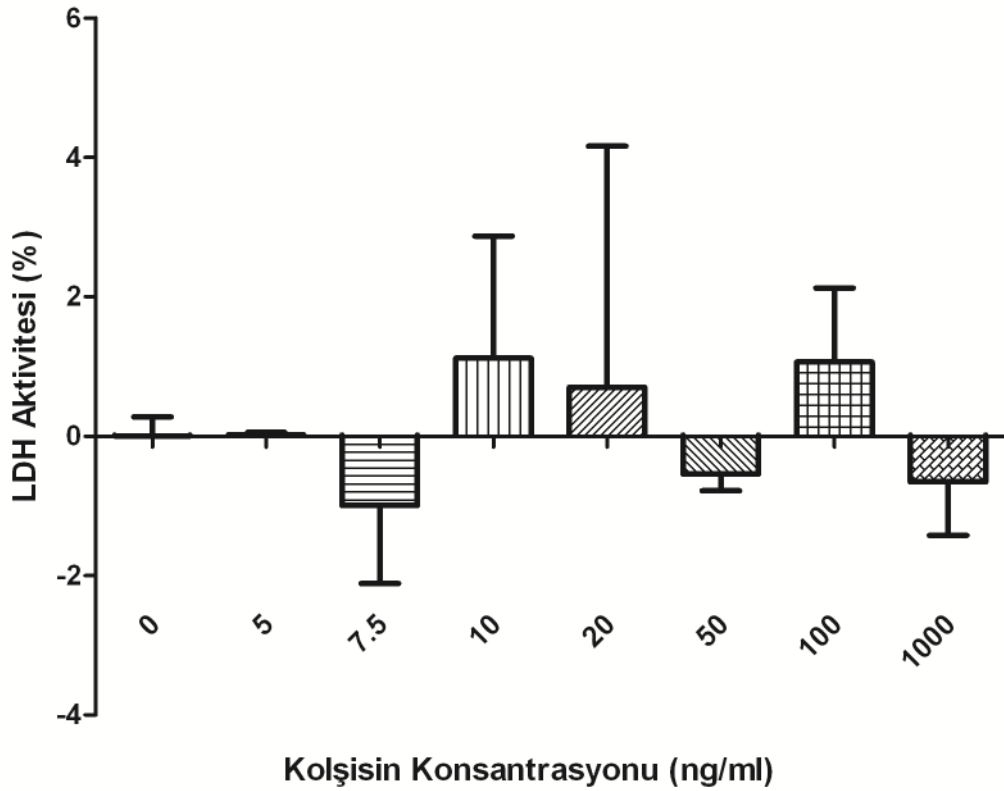
4.1.1. LDH Aktivitesi ile Hücre Ölümünün Saptanması

Kolşisinin HeLa ve COS-7 hücre hatları üzerine olan öldürücü etkileri, besi yerindeki LDH aktivitesinin ölçümü ve hücre, çekirdek morfolojisi gözlemlenerek saptanmıştır.

Besi yerindeki LDH aktivitesi ölçümü, hücre zarı bütünlüğü bozulan hücre sayısını yansıtmaktadır. LDH aktivitesinin gruplar arasında karşılaştırılması için lizis tamponu ile muamele edilen deney grubu olası maksimum LDH aktivitesine sahip E_{max} grubu olarak adlandırıldı. Kolşisinsiz besi yerinde inkübe edilen grup ise, kolşisin etkisinden bağımsız olan besi yerinde olası minimum LDH aktivitesini temsil ettiği için E_{min} olarak adlandırıldı. Buna göre her bir kuyucuk içerisindeki besi yerinde bulunan E olarak adlandırılan enzim aktivitesi diğer gruplarla Formül 4.1'de gösterilen formüle göre yüzde enzim aktivitesi ($E_{yüzde}$) olarak hesaplandı.

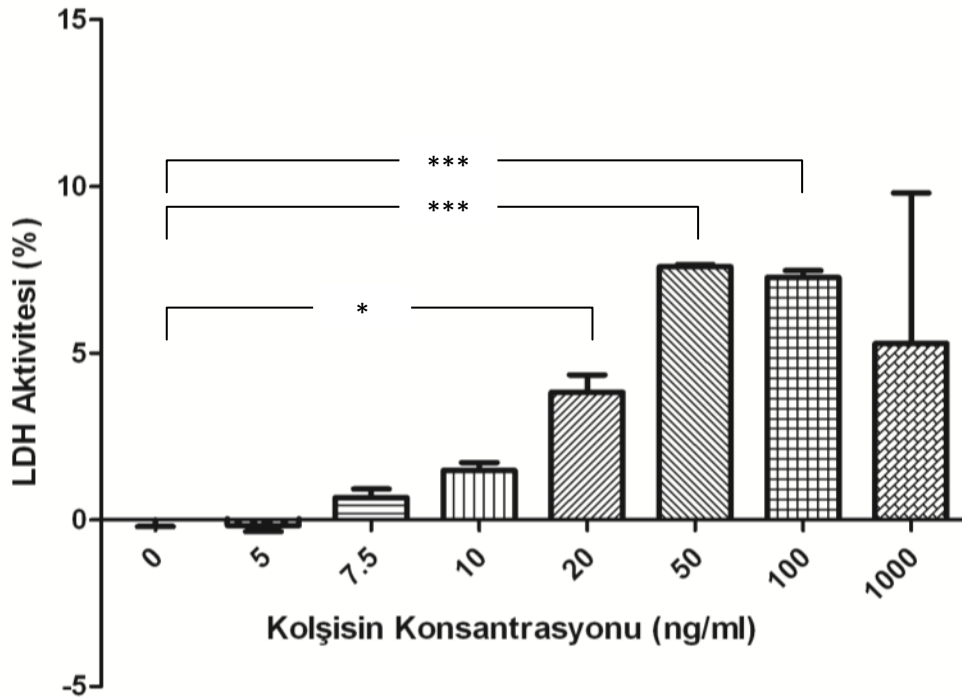
$$E_{yüzde} = \frac{E - E_{min}}{E_{max} - E_{min}} \times 100 \quad (4.1)$$

HeLa hücreleri için $E_{yüzde}$, besi yerinde bulunan kolşisin derişimine bağılı olarak 24 saat içinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ortalama değişim %1'den az olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). Bu anlamlı veya belirgin bir değişiklik değildir. Az miktarda saptanan bu değişimin en olası nedeni HeLa hücreleri için kolşisinin hücre bölünmesini de azaltmasıdır. Bu şekilde daha az hücreden besi yerine LDH karışarak ölen hücrelerin sayısı yaşayan hücrelerin sayısına oranla daha yüksek olabilmekteyse bile ölen hücre sayısı diğer deney gruplarına yakın olabilmektedir. Ayrıca, HeLa hücrelerinin kolşisin toksisitesine bağılı hücre zarı bütünlüklerinin bozulma süreleri deney süresi olan 24 saatten fazla olabilir.



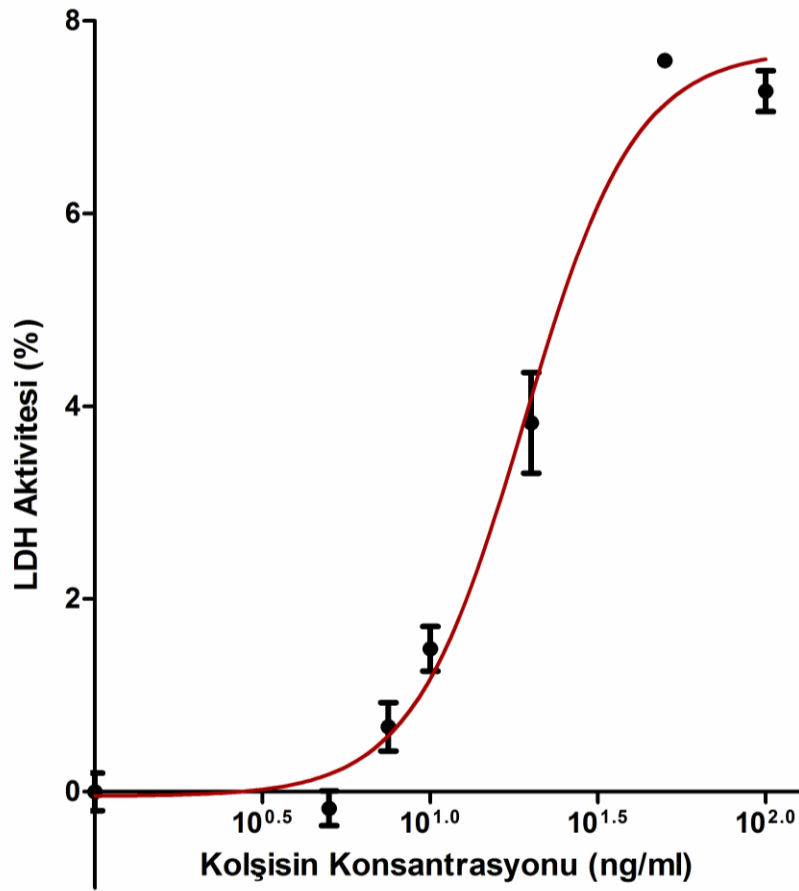
Şekil 4.1. HeLa hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde besi yerindeki LDH aktivitesi. Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. Hiçbir deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

COS-7 hücreleri için $E_{yüzde}$ değerleri, 20ng/ml kolşisin derişiminde, kontrol grubu ve deney grupları arasında tek yönlü ANOVA (*Analysis Of Variance*) ve sonrasında yapılan Tukey testi ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.2). Bu anlamlı fark 50ng/ml kolşisin ve 100ng/ml kolşisin derişimlerinde de gözlenmekle birlikte ($p < 0.001$) 1000ng/ml kolşisin derişiminde aşırı varyasyon nedeniyle kontrol grubu ile anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır.



Şekil 4.2. COS-7 hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde besi yerindeki LDH aktivitesi. Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

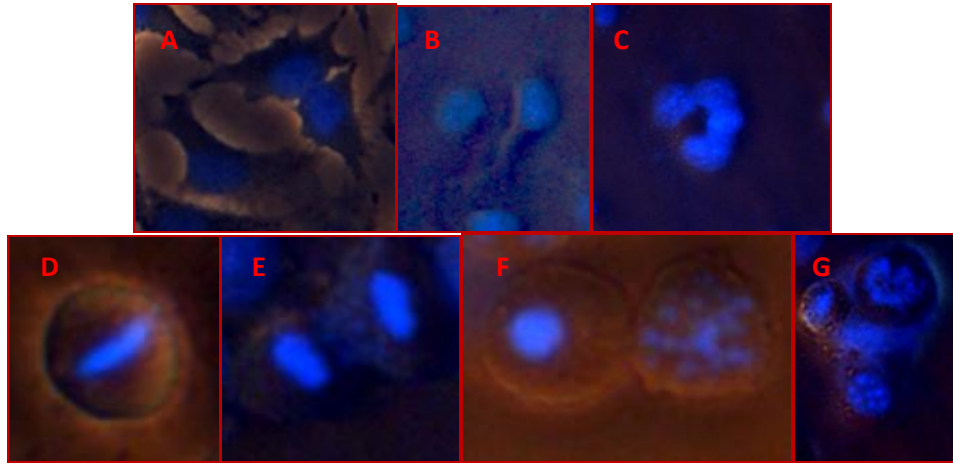
COS-7 hücreleri için 50ng/ml kolşisin derişiminin 24 saatte maksimum öldürücü etkisine ulaşıldığı düşünülmüştür. Bu doğrultuda çizilen derişim – cevap eğrisi, 1000ng/ml kolşisin derişimi analizden dışlandıığında, doğrusal olmayan regresyona uyan bir eğri vermektedir ($r^2 = 0,9866$) (Şekil 4.3). Bu eğriye göre, en yüksek ölüm hızı olan %7,70'e göre kıyaslandıığında en yüksek ölümün yarısına neden olan kolşisin derişimi, LC_{50} (*Lethal Concentration 50*, Ölümcül Derişim 50) 18,99ng/ml (%95 güven aralığı 17,03 ng/ml – 21,18 ng/ml) dir. 10ng/ml kolşisin derişimi bu eğrinin doğrusal kısmının alt sınırına denk gelirken 20ng/ml eğrinin doğrusal kısmının ortasında yer alan LC_{50} değerinin %95 güven aralığı sınırı içindedir.



Şekil 4.3. COS-7 hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde besi yerindeki LDH aktivitesi. Noktalar deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. Kırmızı çizgi en yakın doğrusal olmayan doz cevap eğrisini göstermektedir. $r^2 = 0,9866$.

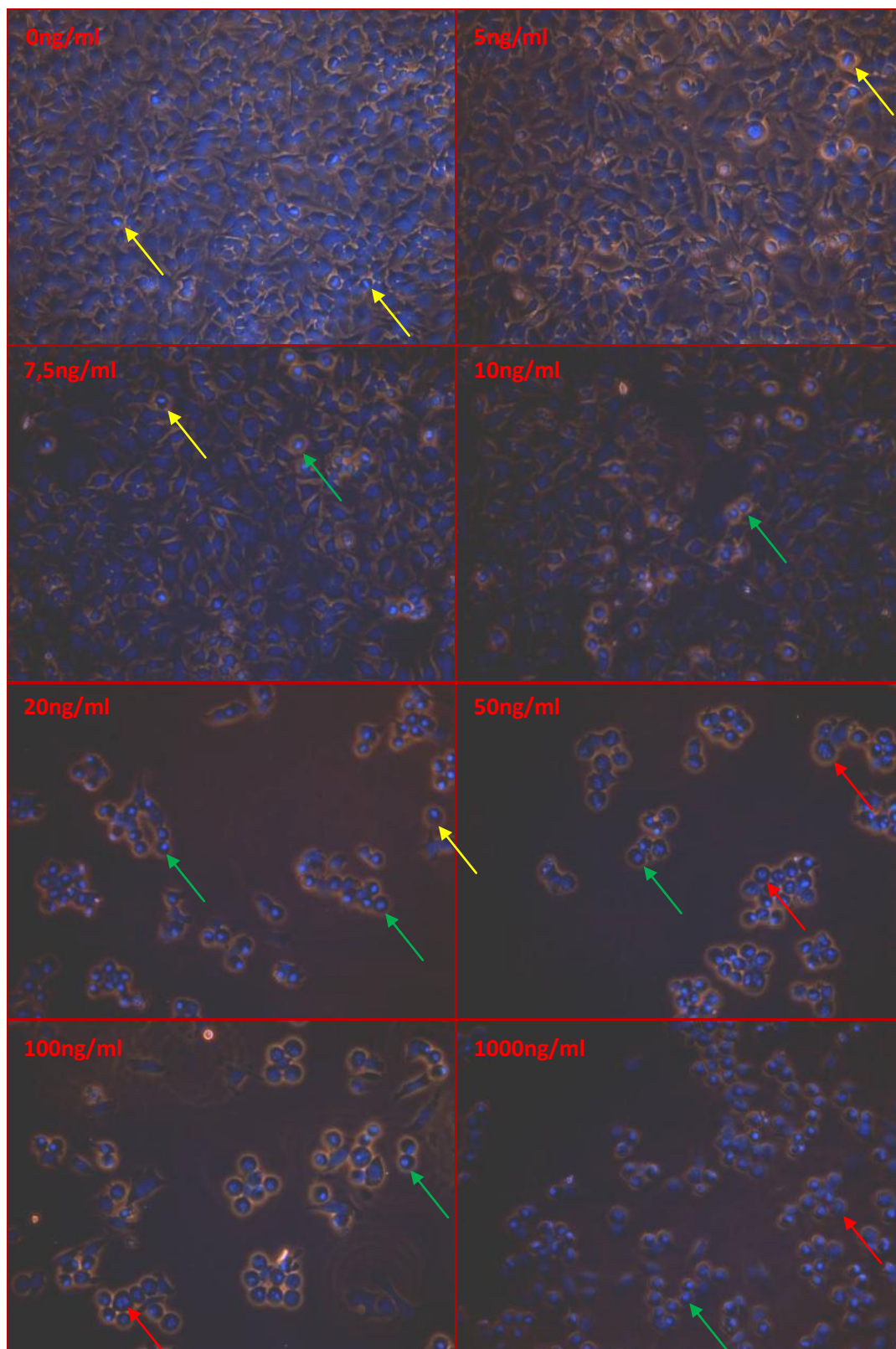
Hücrelerin mikroskopik görünümde ise, hücreleri birkaç farklı sınıf altında toplamak mümkündür. Bu çalışmada hücreler genel olarak 4 farklı morfolojide izlenmiştir (Şekil 4.4). Sağlıklı hücreler; faz-kontrast mikroskopisinde kültür kabı zeminiyle bağlantılarını pek çok noktada koruyan ve iğsi bir şekli olan; DAPI boyamasında çekirdekleri tek, yaygın ve boyanması heterojen olan hücrelerdir (Şekil 4.4.A-B). Çok çekirdekli dev hücreler; çevresindeki hücelere göre en az 2-3 kat büyük olan ve birden fazla çekirdek içeren, diğer morfolojik özellikleri sağlıklı hücelere benzeyen hücelerdir (Şekil 4.4.C). Mitoz geçirmekte olan hücreler; faz-kontrast mikroskopisinde yuvarlaklaşmış ve zeminle bağlantıları kopmuş; DAPI

boyamasında ise DNA'sı hücrenin ekvatorunda yoğunlaşmış olarak yerleşmiş veya DNA'sı ikiye ayrılarak hücrenin iki kutbuna yaklaşmış şekilde görünmektedir (Şekil 4.4.D-E). Ölmekte olan hücreler; faz-kontrast mikroskopisinde genelde yuvarlaklaşmış, bazen hücre sınırları düzensizleşmiş; DAPI boyamasında ise DNA'sı yoğunlaşmış olarak hücrede bir noktada toplanmış (piknotik) veya düzensizce bütün hücre içine dağılmış olarak görülmektedir (Şekil 4.4.F-G).



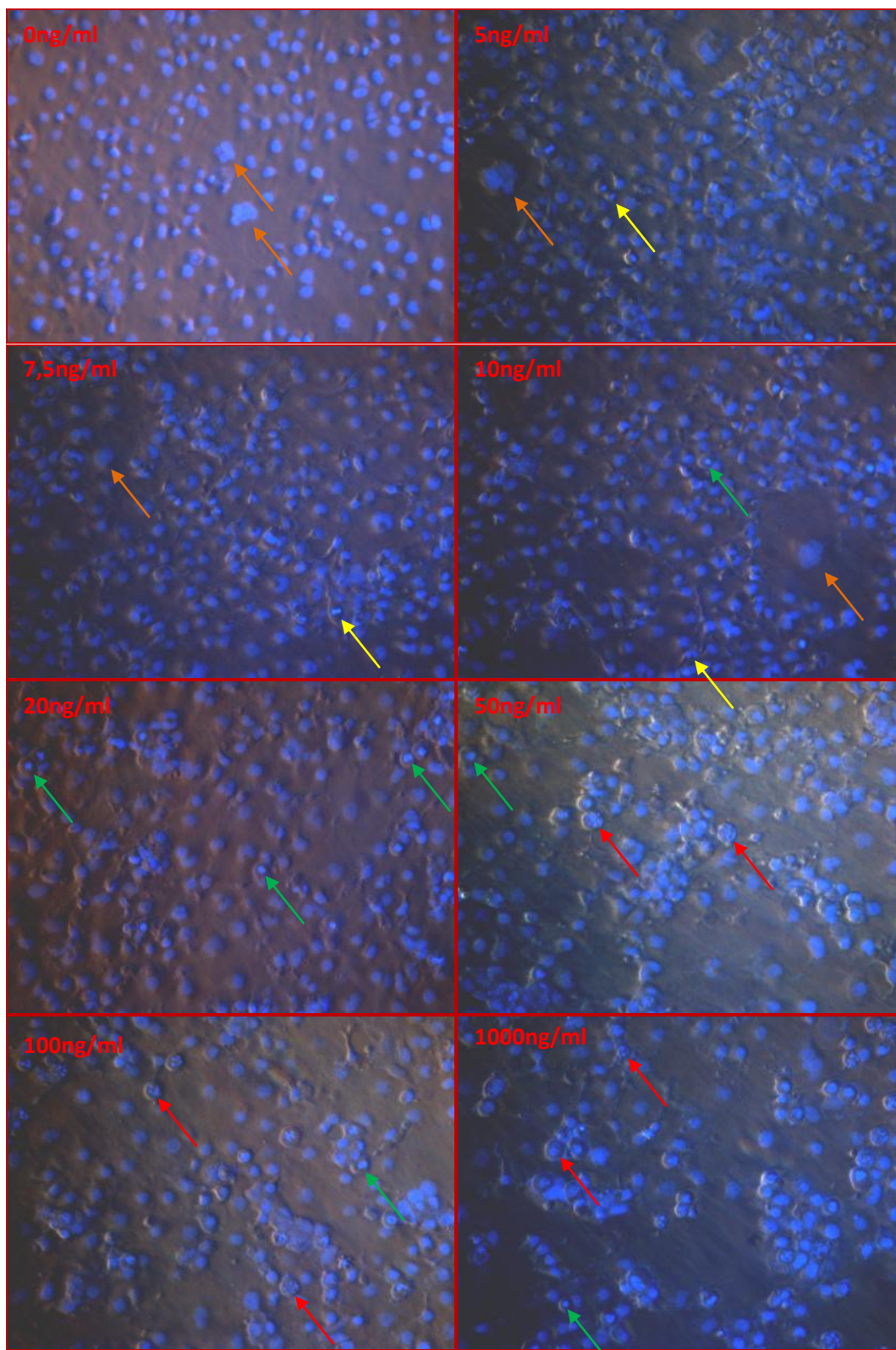
Şekil 4.4. Faz-kontrast mikroskopisinde ve florasan DAPI çekirdek boyamasında gözlenen hücre ve çekirdek morfolojileri. A. Sağlıklı HeLa hücreleri; B. Sağlıklı COS-7 hücreleri; C. Çok çekirdekli dev COS-7 hücresi; D. Metafaz aşamasındaki HeLa hücresi; E. Anafaz aşamasındaki COS-7 hücresi; F. Solda çekirdeği piknotik hale gelmiş, sağda DNA'sı sitoplazma içerisine dağılmış HeLa hücreleri; G. 3 adet apoptoza gitmekte olan COS-7 hücresi.

HeLa hücrelerinin morfolojik incelemeleri göz önüne alındığında 10ng/ml kolşisin derişiminde apoptoza girmiş hücre sayısında artış göze çarpmaktadır. Bununla beraber hücre yoğunluğunun da azaldığı dikkati çekmektedir. Özellikle 20ng/ml kolşisin derişiminden itibaren neredeyse hücrelerin tamamının apoptotik morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. HeLa hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde faz-kontrast hücre morfolojisi ve DAPI ile boyanmış çekirdek morfolojisi (10X). Sarı oklar mitoz aşamasındaki hücreleri; yeşil oklar piknotik çekirdekli apoptoza giden hücreleri; kırmızı oklar ise çekirdek morfolojisi tamamen bozulmuş hücreleri göstermektedir.

COS-7 hücrelerinin morfolojik incelemeleri göz önüne alındığında 10ng/ml'den daha küçük kolşisin derişimlerinde, her 10X büyütme alanında 1-2 tane apoptoza girmekte olan hücre görülmektedir. 20 ng/ml kolşisin derişiminde ise, apoptotik morfolojiye sahip hücrelerin sayısı artmaktadır. 50ng/ml kolşisin derişiminden sonra ise, apoptotik morfolojide hücrelerin sayısı artmaya devam etmekte ve özellikle de çekirdek morfolojisi piknotik olanlar yerine çekirdek morfolojisi tamamen bozulmuş hücreler dikkati çekmektedir. 20ng/ml kolşisin derişiminden sonra COS-7 hücre yoğunluğundaki azalış dikkati çekmekle beraber 1000ng/ml kolşisin derişimde bile HeLa hücrelerindeki kadar belirgin bir azalma görülmemiştir (Şekil 4.6).



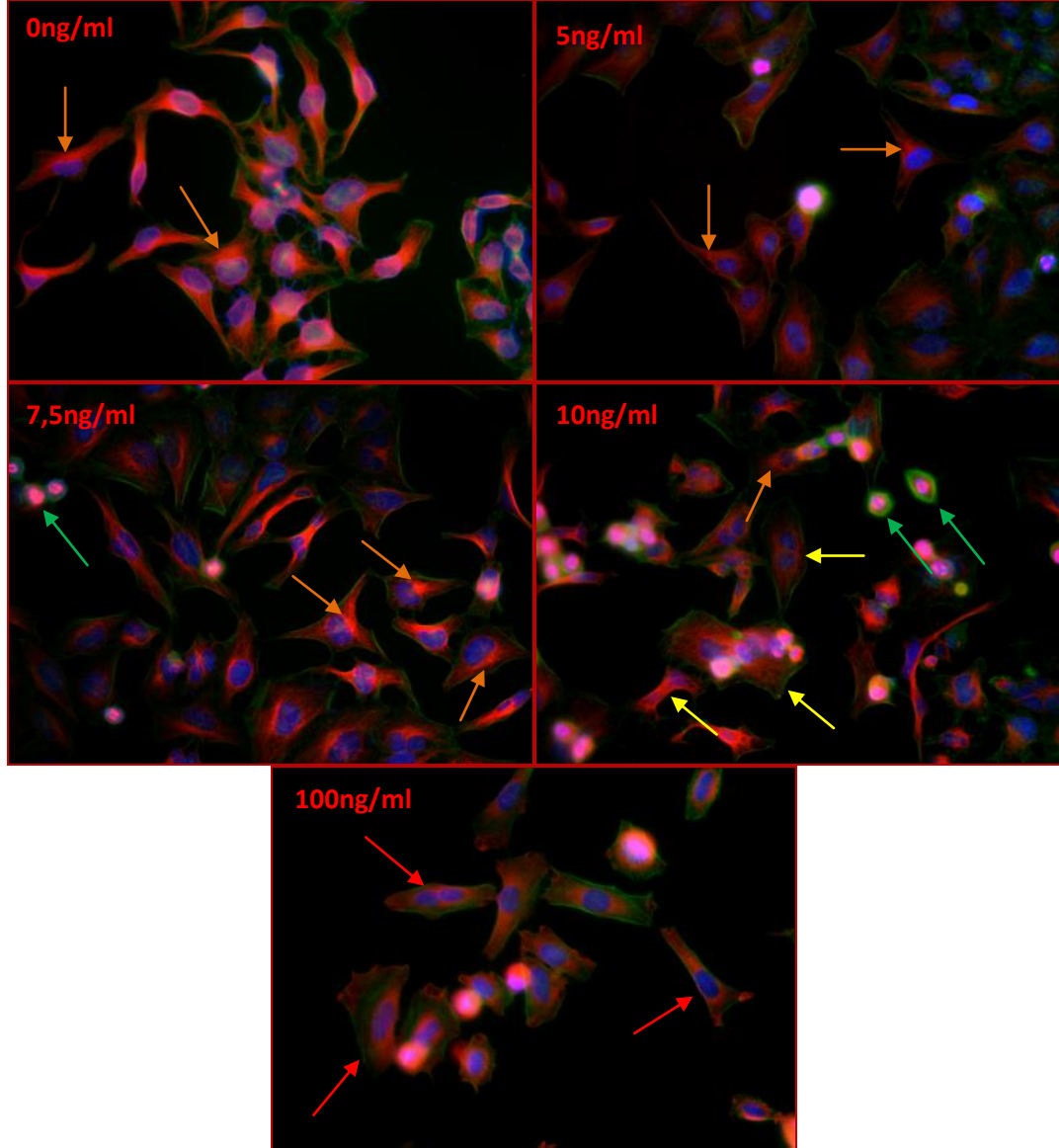
Şekil 4.6. COS-7 hücrelerinde değişen kolşisin derişimlerinde faz-kontrast hücre morfolojisi ve DAPI ile boyanmış çekirdek morfolojisi (10X). Turuncu oklar COS-7 hücrelerinin oluşturduğu çok çekirdekli dev hücreleri; sarı oklar mitoz aşamasındaki hücreleri; yeşil oklar piknotik çekirdekli apoptoza giden hücreleri; kırmızı oklar ise çekirdek morfolojisi tamamen bozulmuş hücreleri göstermektedir.

4.1.2. Kolşisine Maruz Kalan Hücrelerde Mikrofilament ve Mikrotübül Hücre İskeletinin Durmu

Mikrotübüller, interfaz hücrelerinde, çekirdeğe yakın bir MTOC (*MicroTubule Organizing Center*, mikrotübül organize edici merkez) bölgelerinden çıkarak ışınsal olarak tüm sitoplazma içerisine yayılan yapılar olarak bulunmaktadır. Kolşisinin hücre içi hedefleri arasında bu yapı çok önemlidir, bu nedenle HeLa ve COS-7 hücrelerinde özellikle mikrotübül iskeletin yapısı değişen kolşisin derişimlerinde incelenmiştir. Mikrofilament iskeleti oluşturan fibriler aktin ise, daha yoğun olarak hücre zarı altında yerleşen, fiberler veya ağı yapılar şeklinde organize olmuş bir yapıdır. Bu yapının hücre ölüme gitmeden önce kolşisinden etkilenmesi beklenmemektedir.

Kolşisin içermeyen kültür ortamında yetiştirilen HeLa hücrelerinde aktin ve tübülün hücre iskeleti yapısı normaldir. Mikrotübül boyamalarında hücre içinde yer alan, mikrotübül filamanlarının köken aldığı çekirdek yakınında yerleşmiş MTOC açıkça görülebilmektedir. Kolşisin uygulamaları ile boyamalar tekrarlandığında 5ng/ml ve 7,5ng/ml kolşisin derişiminde, kolşisinin olmadığı duruma benzer hücre iskeletleri gözlenmiştir. Buna karşın, 10ng/ml kolşisin derişiminde aktin hücre iskeletinde herhangi bir değişiklik görülmezken mikrotübül iskeletin genel hatları ile korunduğu; ancak MTOC bölgelerinin pek çok hücrede bozulmaya başladığı görülmüştür. Bununla birlikte, bu kolşisin derişiminde çok sayıda çekirdek materyali hücrenin ekvatorunda yerleşmiş, hücre kutuplarında 2 adet MTOC bulunan yuvarlak hücreler saptanmıştır. Bu hücreler mitozun metafaz aşamasında fikse edilmiş hücrelerdir. 100 ng/ml gibi daha yüksek kolşisin derişimlerinde ise, gözlenen hücre

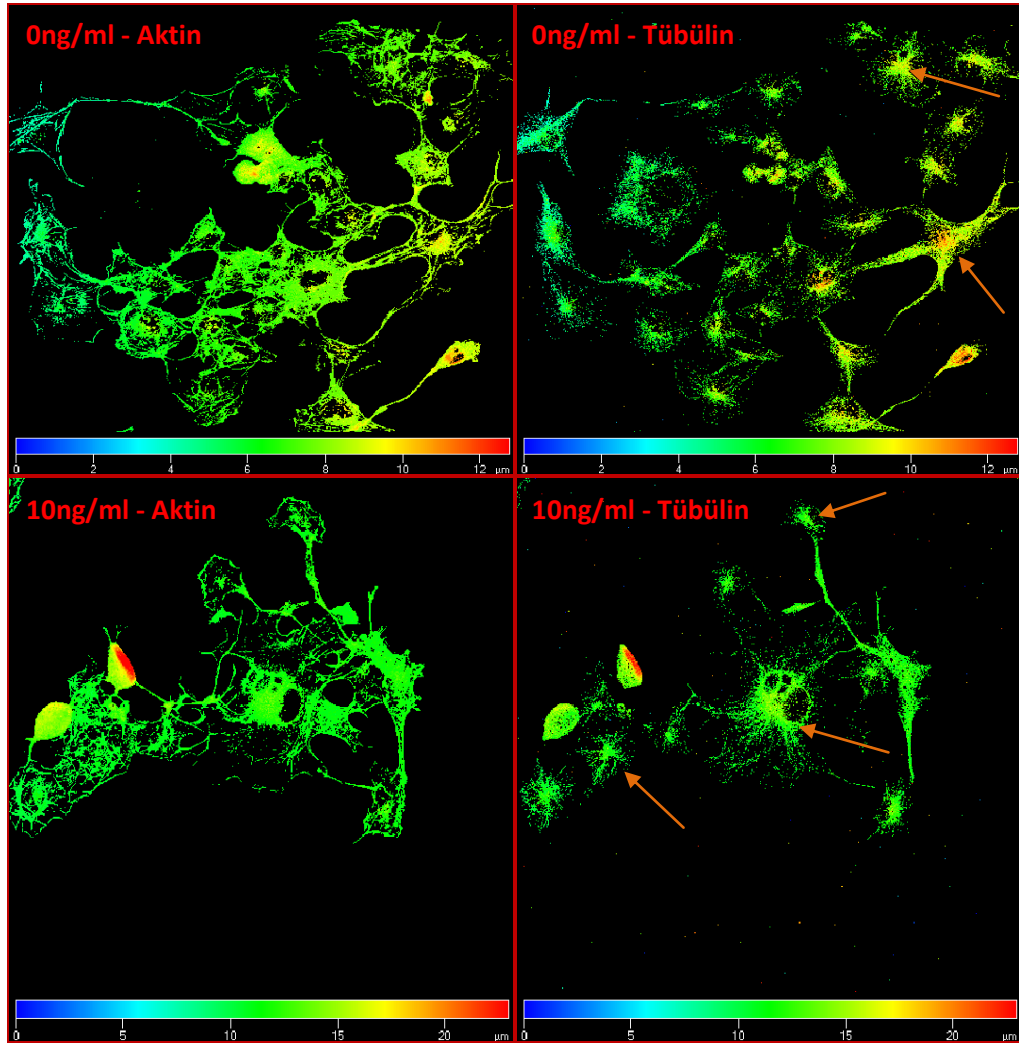
sayısında ciddi bir azalma ile birlikte, gözlenen hücrelerde de fibriler yapısını tamamen kaybetmiş mikrotübül ağı gözlenmiştir (Şekil 4.7).



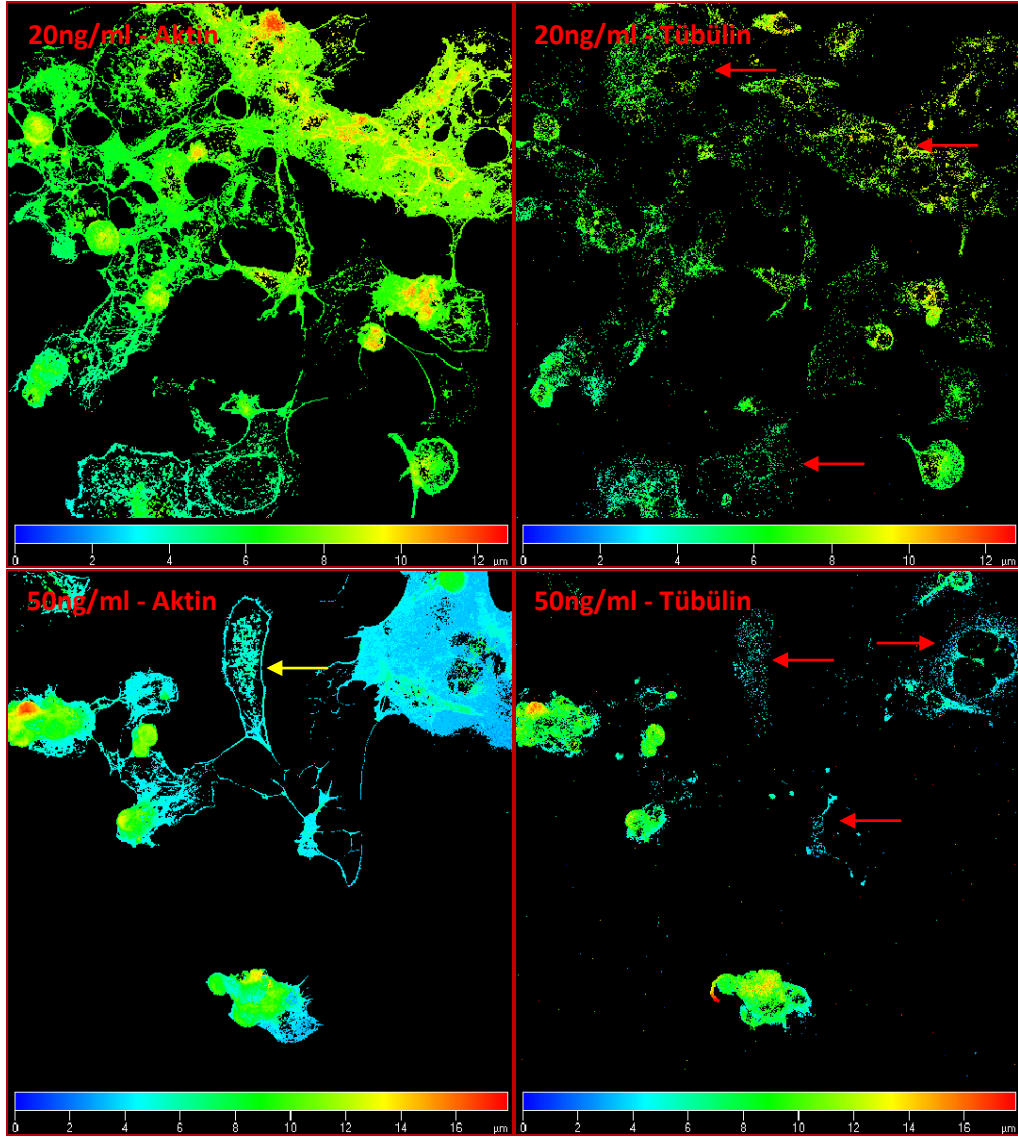
Şekil 4.7. HeLa hücrelerinin, değişen kolşisin derişimlerinde, florasan mikroskopta gözlenen aktin ve mikrotübül hücre iskeletinin yapısı (20X). Her resimde kırmızı renk mikrotübül iskeleti, yeşil renk aktin iskeleti, mavi renk hücre çekirdeğini temsil etmektedir. Turuncu oklar MTOC bölgelerini; sarı oklar mikrotübül iskeleti fibriler yapısını koruyan ancak MTOC bölgelerini kaybetmiş hücreleri; yeşil oklar

mitozda yakalanmış hücreleri; kırmızı oklar ise mikrotübül yapısını tamamen kaybetmiş hücreleri göstermektedir.

Kolşisin içermeyen kültür ortamında yetiştirilen COS-7 hücrelerinde aktin ve tübülün hücre iskeleti yapısı normaldir. Mikrotübül boyamalarında hücre içinde yer alan, mikrotübül filamanlarının köken aldığı MTOC açıkça görülebilmektedir. 10ng/ml kolşisin derişimine maruz kalan hücrelerde, kolşisin olmadığı duruma benzer bir hücre iskeletleri gözlenmiştir. Buna karşın, 20ng/ml kolşisin derişiminde aktin hücre iskeletinde herhangi bir değişiklik görülmezken mikrotübül iskeletin genel hatlarının ve MTOC bölgelerinin tüm hücrelerde bozulmaya başladığı görülmüştür. 50ng/ml gibi daha yüksek kolşisin derişimlerinde ise, gözlenen hücre sayısında ciddi bir azalma ile birlikte, bu hücrelerde fibriler yapısı tamamen bozulmuş mikrotübül ağı dikkati çekmektedir. Ayrıca, bazı hücreler büyük olasılıkla hücre ölümü sonucu mikrofilament iskelet yapılarında da düzensizlikler göstermektedirler (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. COS-7 hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde konfokal mikroskopta aktin ve mikrotübül hücre iskeletlerinin yapısı (20X).

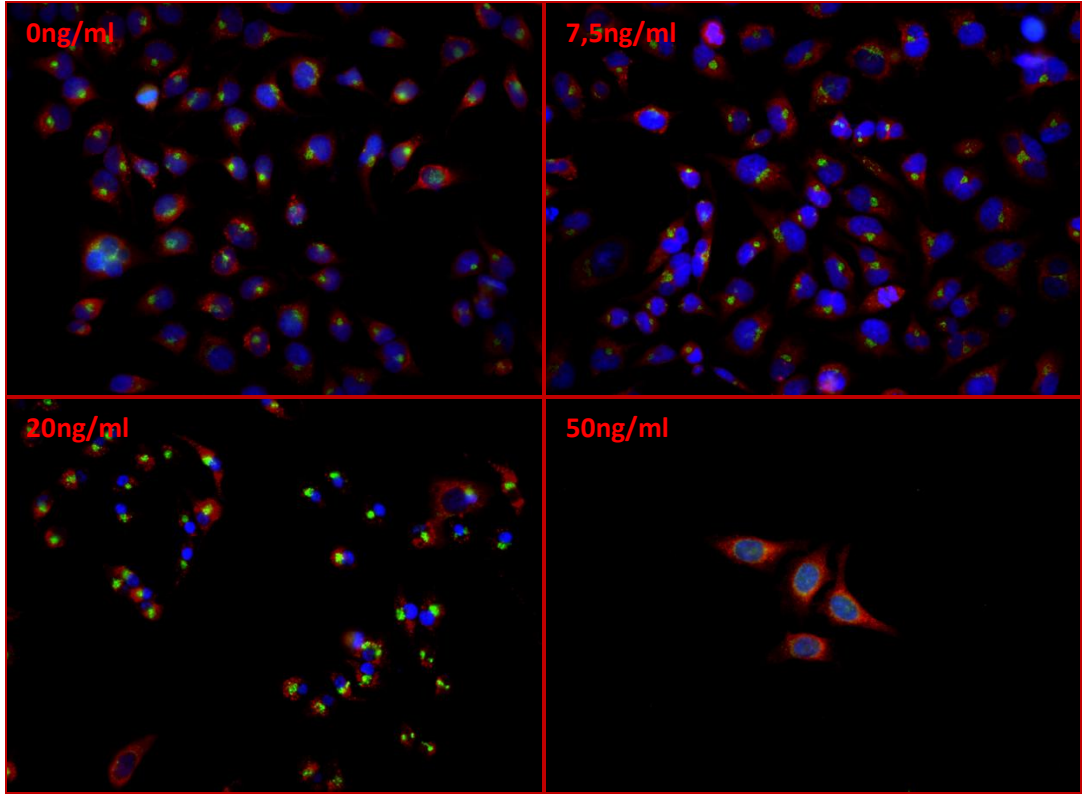


Şekil 4.8. COS-7 hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde konfokal mikroskopta aktin ve mikrotübül hücre iskeletlerinin yapısı (devamı) (20X). Resimler, z-ekseninde lamel zemininden en uzak yapılar öncelikli olarak gösterilecek şekilde iki boyutlu hale dönüştürülmüştür. Her resimde renkler resmin altında yer alan ölçeklere göre lamel zemininden yüksekliği temsil etmektedir. Solda yer alan görüntüler aktin boyamasına ait; sağda yer alan görüntüler ise aynı hücrelerin tübülün boyamalarına aittir. Turuncu oklar MTOC bölgeleri; sarı oklar bozulmuş mikrofilament iskeleti; kırmızı oklar ise, mikrotübül iskelet yapısı bozulmuş hücreleri göstermektedir.

4.1.3. Kolşisine Maruz Kalan Hücrelerde Endoplazmik Retikulum ve Golgi Aparatı'nın Durumu

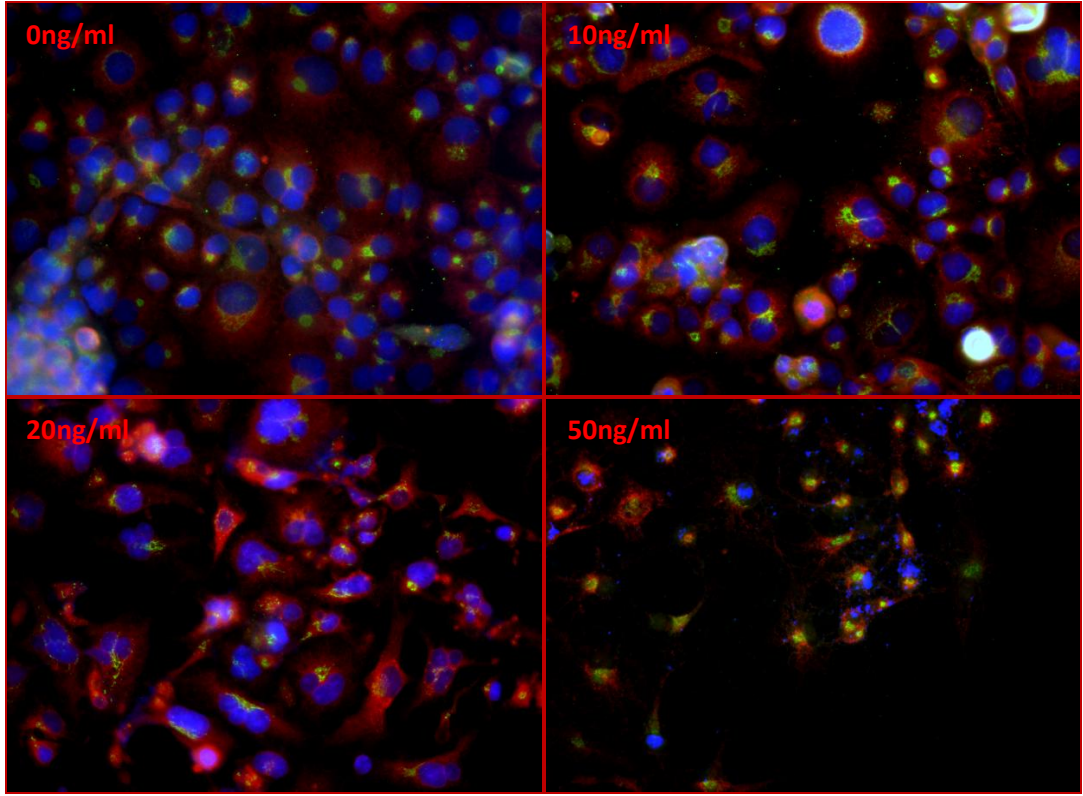
Veziküler taşıma ve organellerin hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesi mikrobüllerin kontrol ettiği önemli hücresel işlevler arasındadır. Hücre göç hareketleri sırasında ise, Golgi aparatının hücre göçü yönüne yakın yerleşmesi hücrenin göç ettiği yöne zar ve proteinlerin taşınması için önemlidir. Golgi aparatının bu yerleşiminin bozulmasının hücre göçünü azalttığı bilinmektedir (65).

HeLa hücreleri kolşisinsiz besi yerinde yetiştirildikleri durumda, özellikle hücre çekirdeğine yakın ve yaygın olarak yerleşmiş endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir. Golgi aparatı ise, çekirdeğin bir kutbunda tek ve yoğunlaşmış bir yapı olarak yer almaktadır. 7,5ng/ml kolşisin derişiminde bu yapının korunduğu gözlenmektedir. Buna karşın, 20ng/ml kolşisin derişiminde bazı hücrelerde Golgi aparatının çekirdeğin her iki yanında da yerleştiği ve kutuplaşmış yapısını kaybettiği görülmektedir. Bu hücrelerin çekirdek boyamalarının da silik olması ölmekte olan hücreler olabileceklerini düşündürmektedir. 50ng/ml kolşisin derişiminde ise, hazırlanan örnekte gözlenebilen çok az sayıdaki morfolojisi korunmuş hücrede Golgi aparatı tamamen çekirdek çevresinde dağılmış, endoplazmik retikulum ise, tüm sitoplazma içerisine dağılmış olarak gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. HeLa hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde florasan mikroskopta endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı organellerinin yapısı ve yerleşimi (10X). Her resimde kırmızı renk endoplazmik retikulumu, yeşil renk Golgi aparatını, mavi renk hücre çekirdeğini temsil etmektedir.

COS-7 hücreleri kolşisinsiz besi yerinde yetiştirildikleri durumda, özellikle hücre çekirdeğine yakın ve yaygın olarak yerleşmiş endoplazmik retikulum yapıları gözlenmektedir. Golgi aparatı ise, çekirdeğin bir kutbunda tek ve ince bir organel olarak yer almaktadır; ancak Golgi aparatı HeLa hücrelerine oranla daha büyüktür. 10ng/ml kolşisin derişiminde bu yapının korunduğu gözlenmektedir. Buna karşın, 20ng/ml kolşisin derişiminde bazı hücrelerde Golgi aparatının hücrelerde genel olarak yoğun olduğu ve daha az yer kapladığı görülmektedir. Ayrıca, bazı hücrelerde endoplazmik retikulumun sitoplazma içine yaygın olarak yayıldığı gözlenmektedir. 50ng/ml kolşisin derişiminde ise, Golgi aparatları şeklini korumakla beraber endoplazmik retikulum yapıları azalmış görünmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. COS-7 hücrelerinin değişen kolşisin derişimlerinde florasan mikroskopta endoplazmik retikulum ve Golgi aparatı organellerinin yapısı ve yerleşimi (10X). Her resimde kırmızı renk endoplazmik retikulumu, yeşil renk Golgi aparatını, mavi renk hücre çekirdeğini temsil etmektedir.

4.2. İki Boyutlu Deney Sistemleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

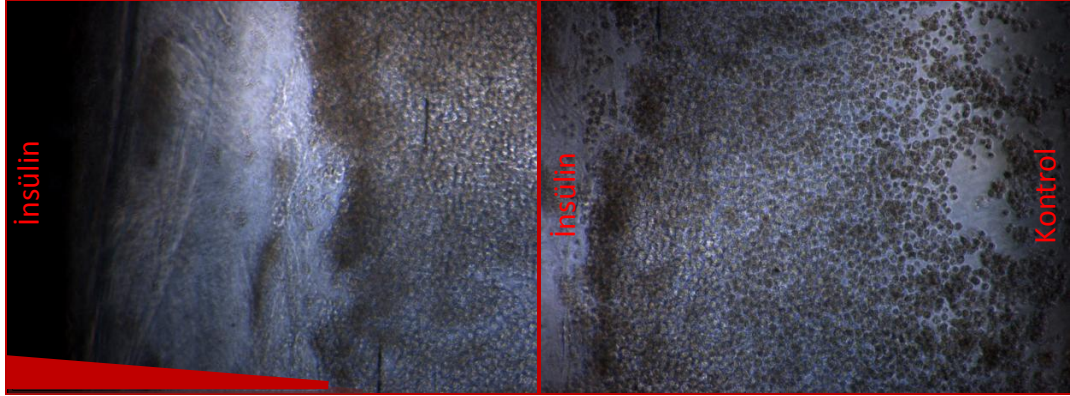
Bu deney sisteminde Whatmann kağıdı ve agaroz jel, insülinin yavaş difüzyonunu sağlayabilmek amaçlı kullanılmıştır. Her iki deney sisteminde de zeminde kollajen kaplaması olmadığı durumda artmış bir hücre hareketliliği göze çarpmaktadır (Bkz. Ek-1.A-B). Ancak bu hareketlilik yeterli bir yer değiştirme hareketi ile sonlanmadığı için hücre göçü ölçülemediğinden uygun bir düzenek olmamıştır.

Tip I kollajen ve tip IV kollajen ile zemin kaplaması yapılmış besi yerlerinde aynı deneyler tekrarlandığında insülin varlığında bile hücre hareketi ortadan kalkmıştır. Bunun en olası nedeni, bu sistemlerde zemine sıkıca yapışan hücrelerin

hareketliliklerinin azalmasıdır (Bkz Ek-1.C). Bu nedenle bu deney düzeneğinde de hücre göçünün ölçülmesi mümkün olmamıştır.

4.3. Agaroz-Altı Hücre Göçü Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

Agaroz altında hücre göçünün modellenmesi için yapılan deneylerde COS-7 hücrelerinin agaroz altına girerek göç edebildikleri gösterilememiştir. Buna karşın COS-7 hücrelerinin içerisinde agaroz bulunmayan kuyucuk içerisinde insülin olan tarafa doğru yoğunlaştıkları gösterilmiştir (Şekil 4.11). Bu COS-7 hücrelerinin insülin cevaplarını göstermektedir; ancak hücre göçünün ölçülmesi için bu deney sistemi yeterli görülmemiştir.



Şekil 4.11. COS-7 hücrelerinin, 24 saat sonunda insülin olan tarafa doğru kuyucuk içerisinde yönelimi. Solda agaroz sınırında agaroz altına giren hücre görülmemektedir (10X). Sağda tüm Kuyucuğu gösteren bir görüntü vardır. Şekilde yer alan üçgen hücrelerin bulunduğu kuyucuğa doğru azalan insülin gradyentini temsil etmektedir. Burada COS-7 hücrelerinin insülin olan kuyucuğa yakın olan tarafta kontrol kuyucuğuna yakın olan tarafa göre belirgin şekilde daha yoğun oldukları görülmektedir.

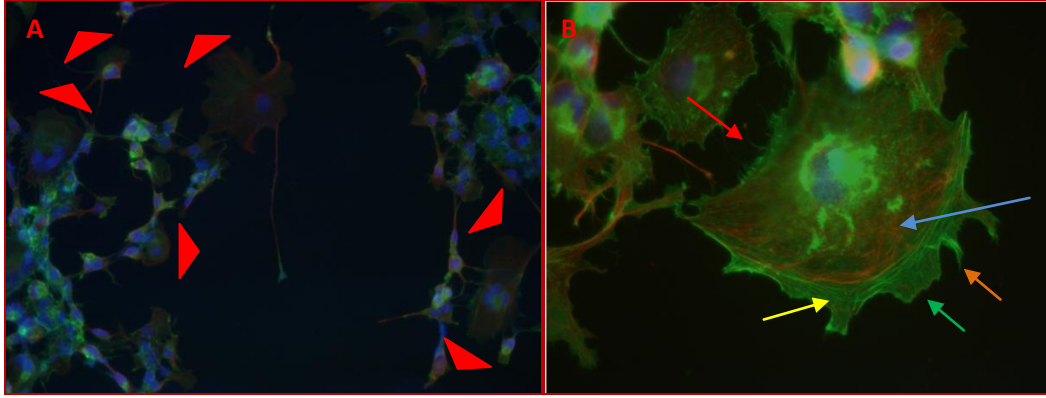
4.4. Yara İyileşmesi Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

4.4.1. Yara İyileşmesi Deney Sisteminin Canlı Hücre Görüntülenmesi ile Gözlenmesi

COS-7 ve HeLa hücreleri için yara iyileşmesi deney sistemi kurulduktan sonra canlı hücre görüntüleme sistemi ile gözlenmiş ve her iki hücre hattının da bu sistemde zamanla göç hareketleri göstererek yara kapanmasına katkıda buldukları saptanmıştır (Bkz Ek-1.D-E).

4.4.2. Yara İyileşmesi Deney Sisteminde Hücre Göçü Sırasında Hücre İskeletinin Durumu

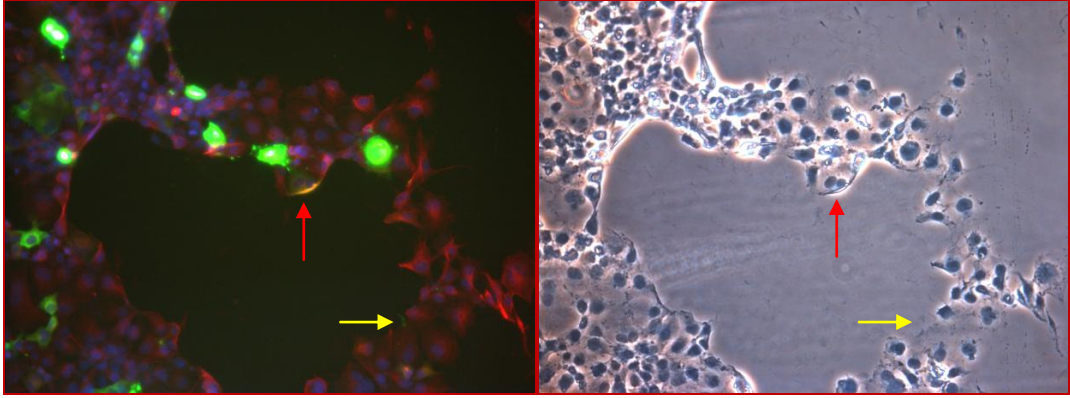
COS-7 ve HeLa hücrelerinin hücre göçü anında mikrofilament ve mikrotübül hücre iskeletleri, hücre göçü anında incelenmiştir. Her iki hücre hattında da MTOC bölgesinin hücre göçü yönünde yerleştiği ve hücre göçü yönünde yer alan fibriler aktinin lamellipod ve filopodları destekleyecek karmaşık ağlar oluşturduğu gözlenmektedir (Şekil 4.12). Özellikle Şekil 4.12.B’de yer alan HeLa hücresinde hücre iskeletinin yapısı, lamellipod, filopod ve üropodlar açıkça seçilmektedir.



Şekil 4.12. COS-7 ve HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sisteminde göç hareketleri. Her resimde kırmızı renk mikrobül iskeleti, yeşil renk aktin iskeleti, mavi renk hücre çekirdeğini temsil etmektedir. A'da COS-7 hücrelerinin yara iyileşmesi deney sisteminde göç hareketleri görülmektedir (10X). Resimdeki hücrelerin hücre iskeletlerine göre hareket yönleri kırmızı oklarla gösterilmiştir. Buna göre okun gösterdiği yönün arkasında yer alan hücre ok yönünde göç etmektedir. B'de ise HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sisteminde göç hareketi görülmektedir (40X). Bu resimde göç etmekte olan bir HeLa hücresinde, göç yönünde filopod (turuncu ok) ve lamellipod (yeşil ok) yapıları görülmekteyken hemen bu yapıların gerisinde büyük lamellipod yapıyı destekleyen aktin organizasyonu (sarı ok) görülmektedir. Çekirdeğin hemen önünde ise mikrotübüllerin köken aldığı MTOC (mavi ok) yer almaktadır. Hücrenin kontraksiyon hareketlerinin gerçekleştiği "arka" kesminde ise üropod yapıları gözlenmektedir (kırmızı ok).

4.4.3. HeLa Hücrelerinde Yara İyileşmesi Deney Sisteminde *Pyrin* Transfeksiyonu Sonrası Hücre Göçü Sırasında *Pyrin* Yerleşimi

HeLa hücrelerine geçici *pyrin*-GFP vektörü ile transfeksiyon yapıldıktan 24 saat sonra alınan görüntülerde, henüz *pyrin* proteini ifadesi düşük olan ve yara sınırında yer alan hücrelerde *pyrin*-GFP füzyon proteini hücrenin göç hareketinin olduğu düşünülen yönde daha yoğun görülmüştür (Şekil 4.13).

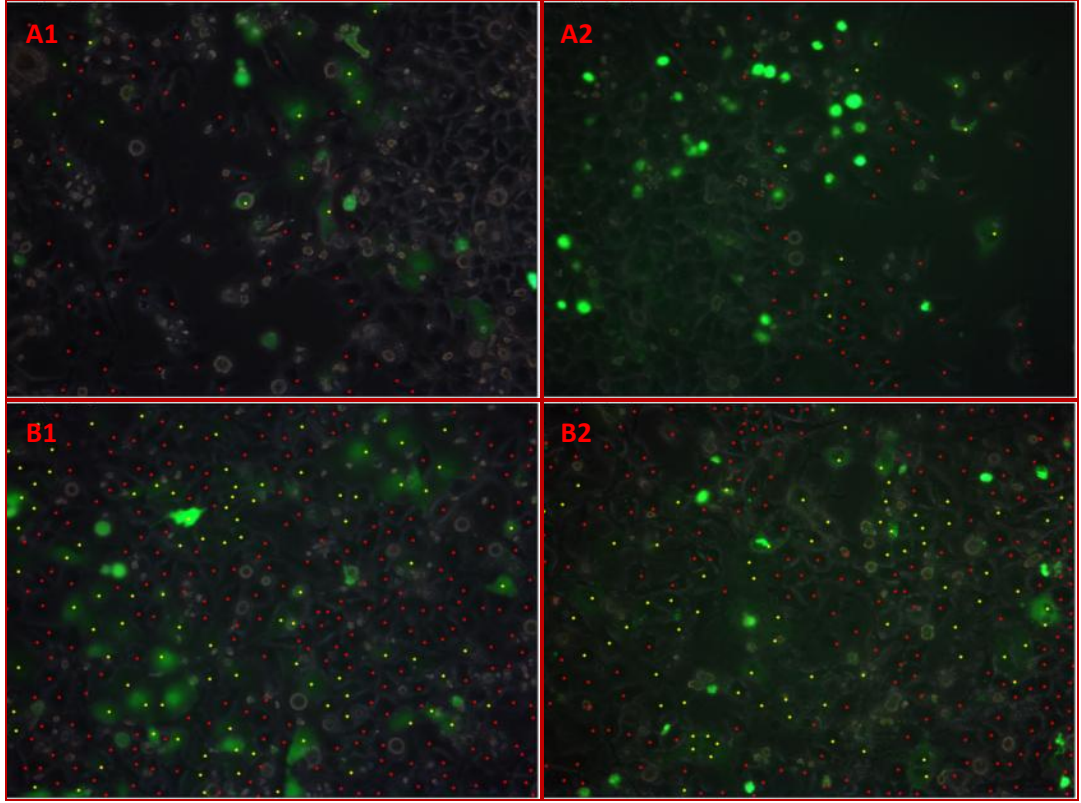


Şekil 4.13. Solda HeLa hücrelerinin yara iyileşmesi deney sisteminde florasana mikroskopta *pyrin*-GFP proteininin yerleşimi. Sağda aynı hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri (10X). Her resimde kırmızı renk mikrotübülleri, yeşil renk *pyrin*-GFP füzyon proteinini, mavi renk hücre çekirdeğini temsil etmektedir. Kırmızı okla gösterilen hücrede yara sınırı yönünde belirgin olarak artmış yoğunlukta *pyrin*-GFP proteini birikimi görülmektedir. Sarı okla gösterilmiş hücrede ise henüz az miktarda ifade edilmiş olan *pyrin*-GFP proteini hücrenin uzatmakta olduğu filopod bölgesinde konumlanmıştır.

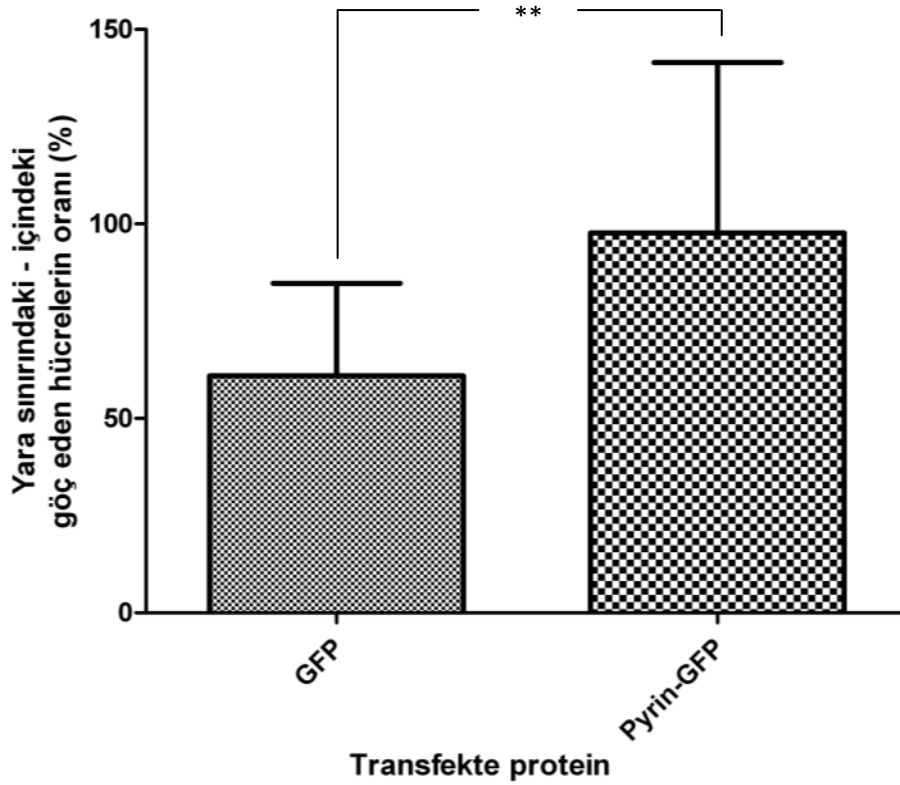
4.4.3. HeLa Hücrelerinde Yara İyileşmesi Deney Sisteminde *Pyrinin* Hücre Göçü Üzerine Etkisi

Pyrin-GFP ve GFP ifade eden hücrelerin yara sınırında yer alanları 20'şer alanda sayılmış ve her alanın yüzdesi genel transfeksiyon etkinliğine bölünerek bu iki grup arasındaki fark araştırılmıştır. Yapılan sayım sırasında sadece canlı ve zemine tutunan hücreler sayıma dahil edilmiş, yuvarlak veya yüzen hücreler ölü olarak kabul edilmiş ve sayım dışı bırakılmışlardır (Şekil 4.14). Transfeksiyon etkinliği GFP grubu için $28,51 \pm 4,54$; *pyrin*-GFP grubu için $19,80 \pm 6,00$ olarak bulunmuştur.

Bu verilere göre yapılan analiz sonucunda *pyrin*-GFP ile transfekte grupta yara sınırında yer alan hücre sayısı GFP ile transfekte gruptakine göre t-testi ile yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir şekilde yüksek çıkmıştır ($p < 0,01$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Yara iyileşmesi deneyinde GFP ve *pyrin*-GFP vektörü ile transfekte hücrelerin sayılması. A1 ve A2'de sırasıyla GFP ve *pyrin*-GFP proteinlerini aşırı ifade eden yara sınırı veya içindeki hücrelerin sayımı görülmektedir (10X). B1 ve B2'de ise sırasıyla GFP ve *pyrin*-GFP proteinlerini aşırı ifade eden %100 yoğunlukta ki alanlarda genel transfeksiyon etkinliğini belirlemek için yapılan sayımlar görülmektedir (10X). Kırmızı ile işaretli hücreler transfekte olmamış hücreler, sarı ile işaretli hücreler ise transfekte hücrelerdir.



Şekil 4.15. Yara iyileşmesi deneyinde GFP ve *pyrin*-GFP ifade eden gruplar için yara sınırında veya içerisinde bulunan hücrelerin karşılaştırılması. Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. ** $p < 0,01$.

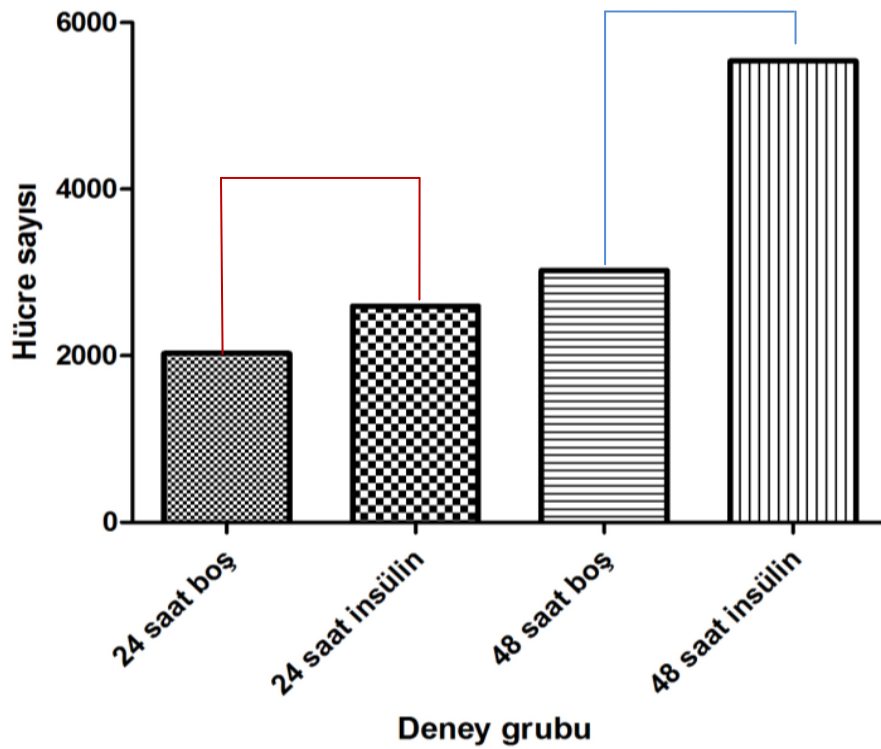
4.5. Filtre Deneyleri ile Hücre Göçünün Modellenmesi

4.5.1. COS-7 Hücrelerinde Filtre Deneylerinin Standardizasyonu

Filtre deneylerinin standardizasyonu için transfekte edilmemiş COS-7 hücreleri öncelikle filtrenin tabanının tip I kollajen ile kaplanarak veya kaplanmayarak kemoatraktanları olan insüline maruz bırakılmışlardır. Bu deneme sırasında kaplanma yapılmayan grupta tripsinizasyon aşamasından sonra hiç hücre görülmemesi nedeniyle bu aşamadan sonra tüm deneylere kaplama yapılarak devam edilmiştir. Tip I kollajen kaplamanın olası yararları arasında bu maddenin kendi kemoatraktan özelliği, filtrenin porlarını kısmen daraltarak insülin

difüzyonunu yavaşlatması ve tripsin ile hücrelerin kaldırılması sırasında hücrelerin zeminle bağlantılarının kopmasını kolaylaştırmak yer alabilir.

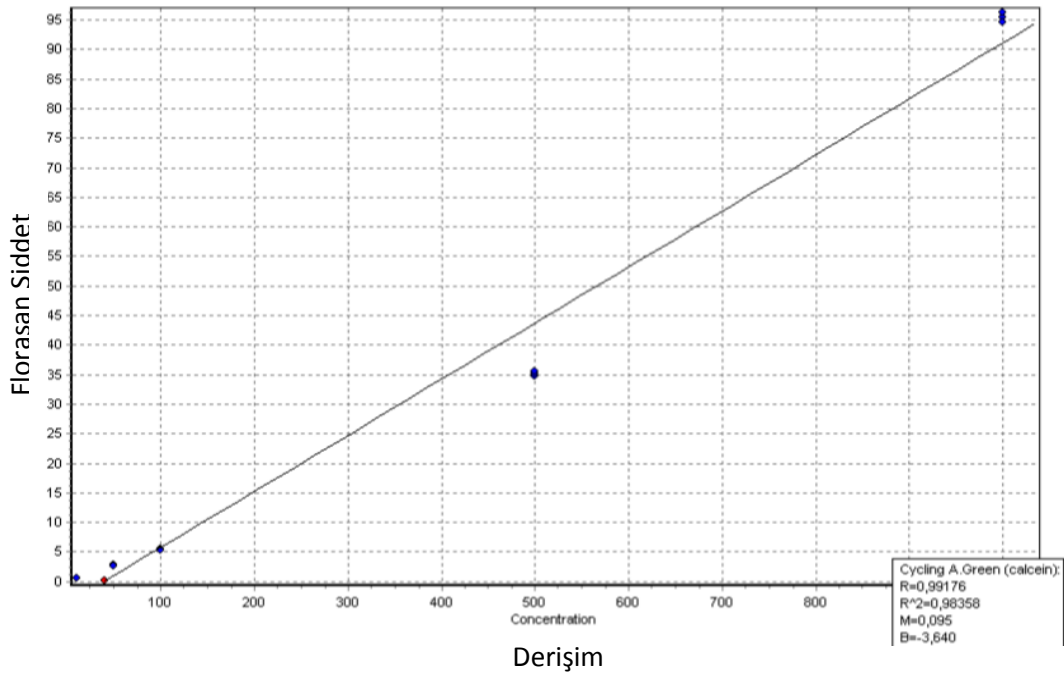
Standardizasyon için ikinci aşamada denenen değişkenler deney zamanı ve insülin varlığıdır. Standardizasyon sırasında her örnek tek bir kez çalışılmış ve sadece göç ederek filtrenin altına geçen hücreler sayılmıştır. Bu sonuçlara göre 24 saatte hücrelerin insüline verdikleri cevap, 48 saatte verilen cevabın altında kaldığı için deney süresinin 48 saat olmasına karar verilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 24 saat ve 48 saat deney sürelerinde ve insülin varlığında veya yokluğunda filtrelerden göç eden COS-7 hücre sayılarının karşılaştırılması.

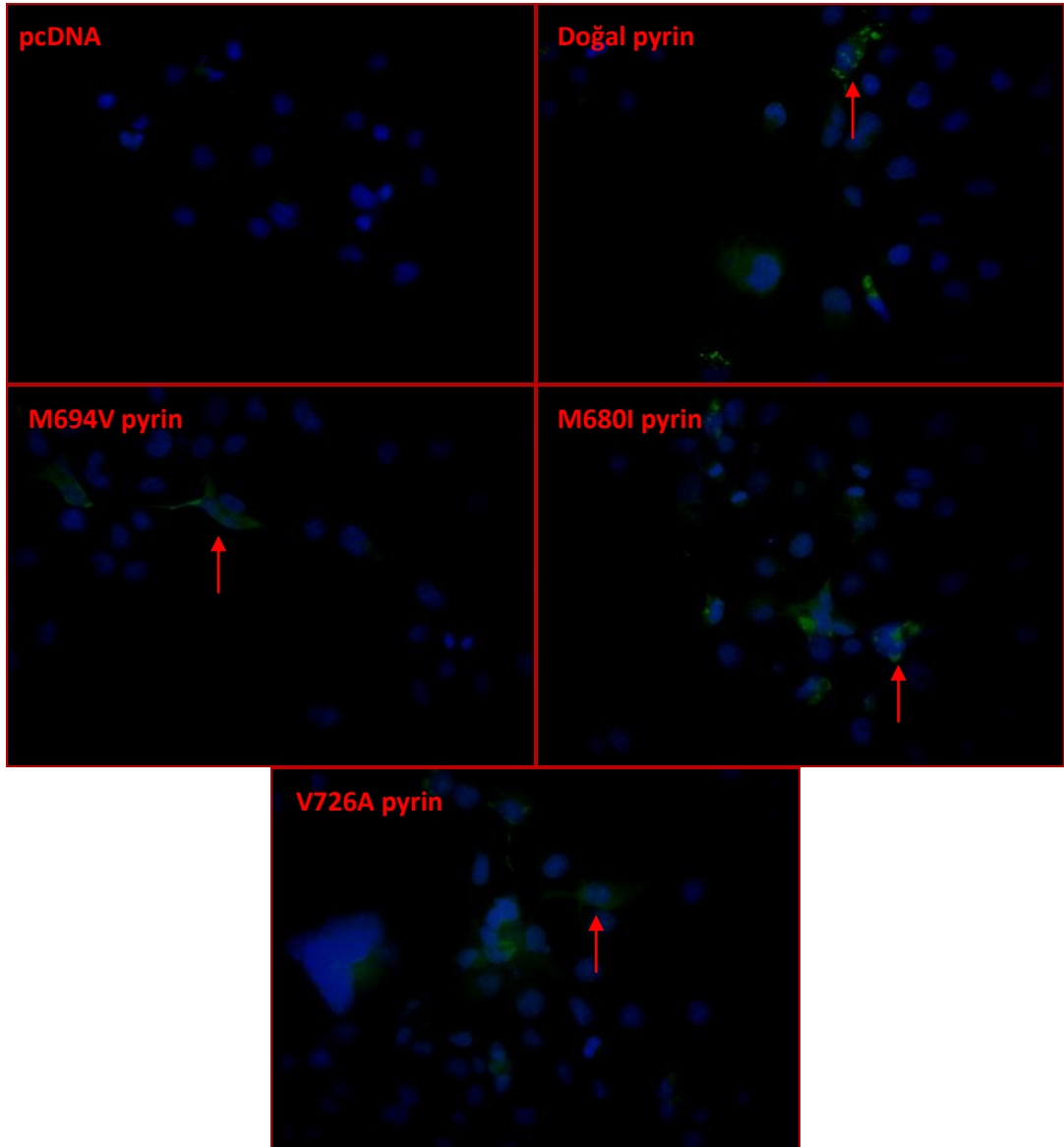
4.5.2. COS-7 Hücrelerinde Filtre Deneyleri ile Pyrin, Mutantları ve Kolşisinin Hücre Göçü Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi

Filtre deneyleri ile hücre göçünün doğru kantite edilmesi için bazı koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu koşullardan ilki standartların hazırlanması ve doğrusal bir standart eğri çizilmesidir. Bu amaçla hazırlanan kalsein-AM ile boyanmış COS-7 hücreleri sayılmış standart eğri oluşturmak için seyreltilmiştir (Şekil 4.17).



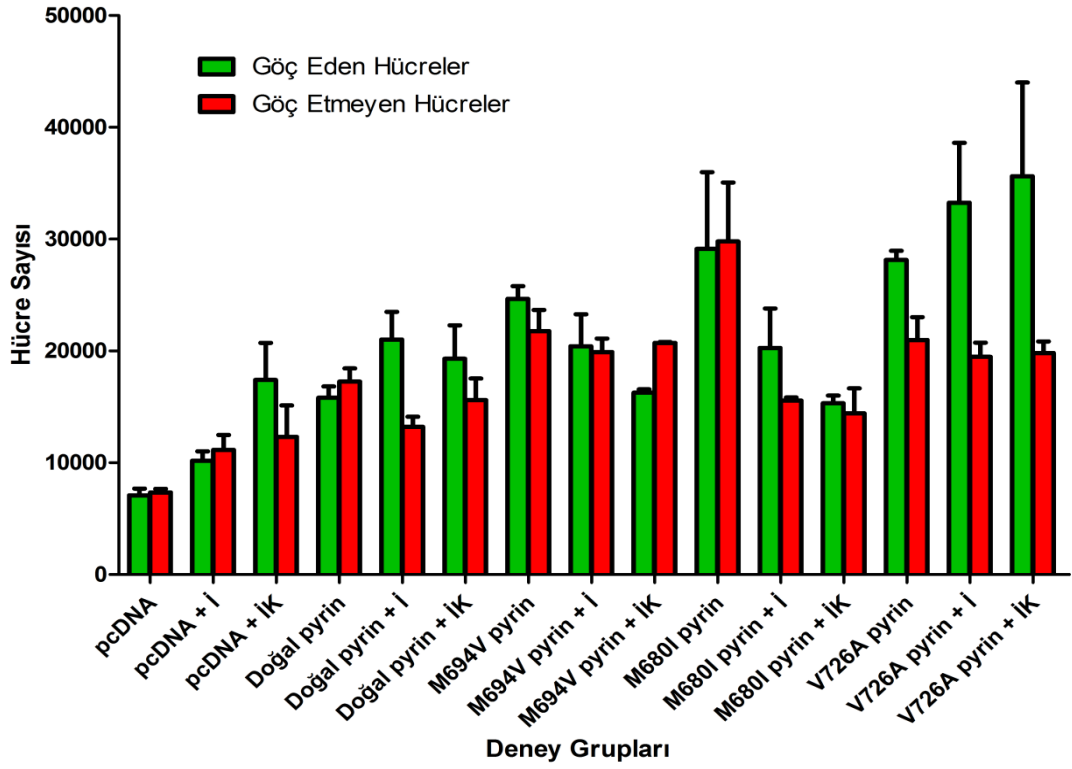
Şekil 4.17. Filtre deneylerinde hücre sayılarını belirlemek için çizilen standart eğri. Mavi noktalar 5 standart örneğin farklı derişimlerinde okunan flouresan şiddetini temsil etmektedir. Kırmızı noktalar ise, hücre olmayan bir çözeltideki flouresan şiddeti göstermektedir. $r^2=0,98352$.

Doğru bir deneyin yapılması için gerekli bir diğer koşul, tüm vektörlerle transfeksiyonun gerçekleşmesi ve deney sonunda da tüm ara aşamalardan sonra bu transfekte hücrelerin kaybolmamasıdır. Bu da her deney grubu için eş zamanlı yapılan ve filtre deneyleri ile birlikte sonlandırılan flouresan boyamalarla gösterilmiştir (Şekil 4.18).

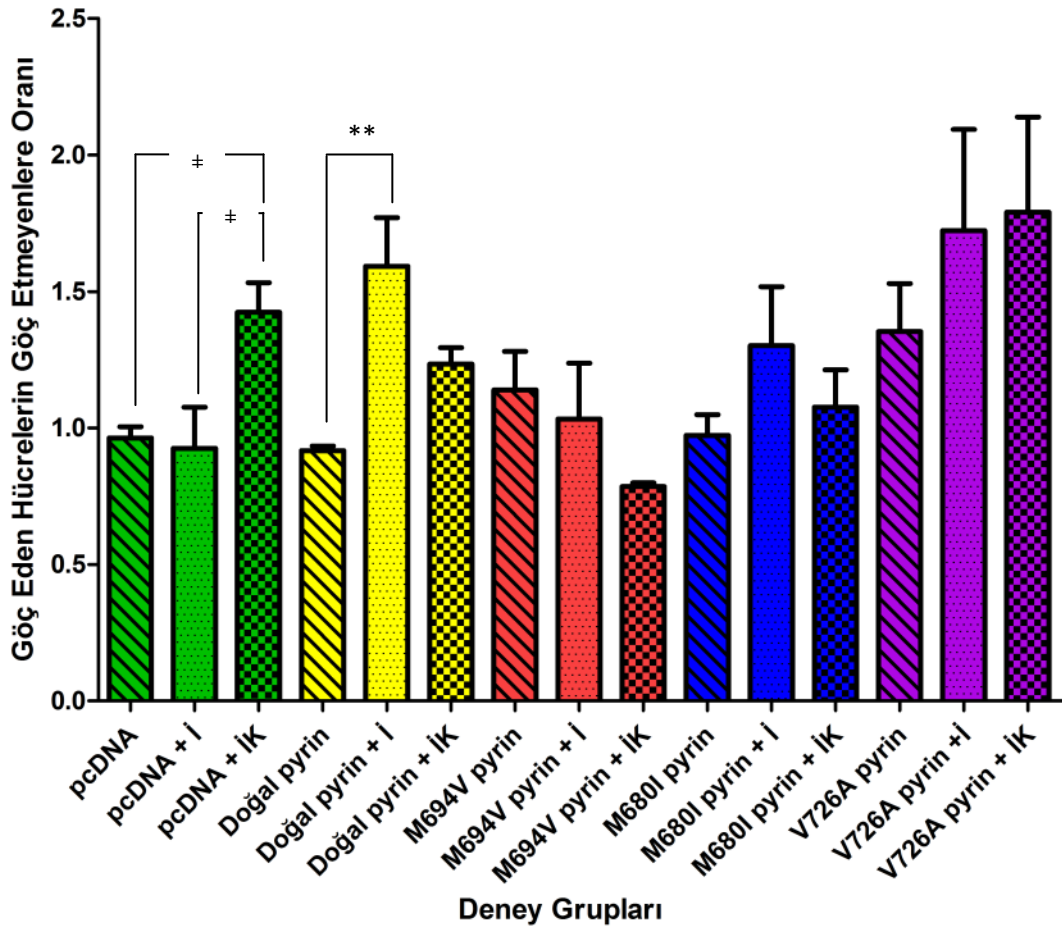


Şekil 4.18. Filtre deneyi için kullanılan 5 farklı vektör ile transfekte edilmiş deney gruplarının deney süresi sonunda pyrin ile transfeksiyon durumlarının florasan boyama ile gösterilmesi (10X). Her resimde yeşil renk *pyrin* proteinini, mavi renk ise hücre çekirdeğini temsil etmektedir. Kırmızı oklar her grupta transfekte hücrelerden örnekler göstermektedir.

Deney sonucunda göç eden ve etmeyen hücre sayıları Şekil 4.19'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre farklı sayıda göç etmeyen hücreler ile deneylerin sonuçlandığı görülmektedir. Bu nedenle, her deney grubu kendi içerisinde göç eden hücre sayısı göç etmeyen hücre sayısına bölünerek iç standardizasyon yapılmıştır (Şekil 4.20). Buna göre her transfeksiyon grubu kendi içerisinde işlem uygulanmayan, insülin uygulanan ve insülin + kolşisin uygulanan deney grupları birbiriyle karşılaştırıldığında sadece doğal pürin ile transfekte grupta kontrole göre insülinin hücre göçünü artırdığı sonucu tek yönlü ANOVA ve sonrasında yapılan Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($p < 0,01$). pcDNA grubunun kendi içerisindeki standart sapmalar tüm deney gruplarına kıyasla daha düşüktür. Bu nedenle, insülin uygulanmayan ve insülin uygulanan pcDNA transfeksiyon grupları ile insülin ve kolşisin uygulanan pcDNA transfeksiyon grubu arasında Tukey testi ile gösterilemeyen fark t-testi ile gösterilmiştir ($p < 0,05$).



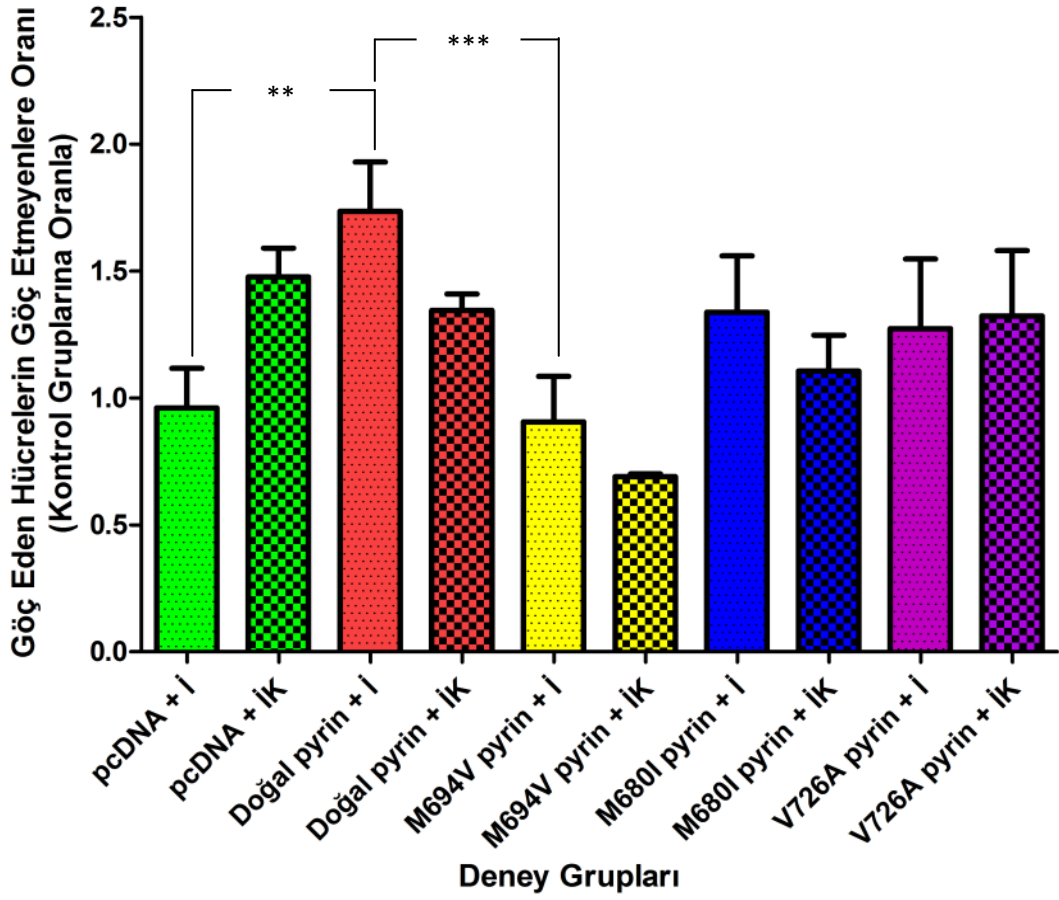
Şekil 4.19. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden ve göç etmeyen hücre sayıları. Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. “+ I” insülin uygulanan deney gruplarını göstermekteyken “+ İK” hem insülin hem kolşisin uygulanan deney gruplarını göstermektedir.



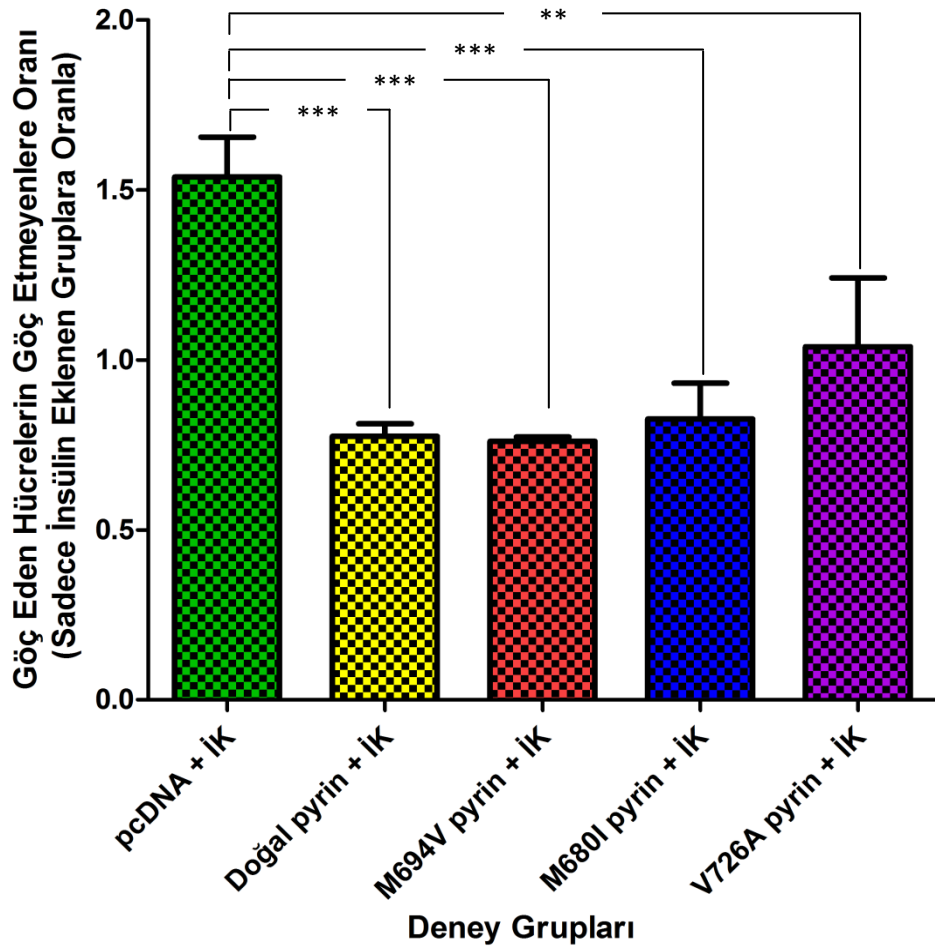
Şekil 4.20. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden hücrelerin göç etmeyen hücrelere oranları. Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. Sütun renkleri farklı transfeksiyon koşullarını temsil etmektedir. “+ I” insülin uygulanan deney gruplarını göstermekteyken “+ İK” hem insülin hem kolşisin uygulanan deney gruplarını göstermektedir. **p<0,01 #p<0,05.

Transfeksiyon gruplarının birbirleri aralarında karşılaştırılması için her transfeksiyon grubunun insülin uygulanan ve insülin + kolşisin uygulanan deney grupları kendi transfeksiyon gruplarının kontrol gruplarına oranlanarak yeni bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.21). Buna göre insülin uygulanan deney grupları karşılaştırıldığında pcDNA ve M694V *pyrin* grupları ile doğal *pyrin* grupları arasında tek yönlü ANOVA ve sonrasında yapılan Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,001$).

Kolşisin'in etkisinin transfeksiyon grupları arasında karşılaştırılması içinse her transfeksiyon grubundaki kolşisin ve insülin uygulanan deney gruplarının sonuçları sadece insülin uygulanan gruplara oranlanmıştır (Şekil 4.22). Buna göre pcDNA transfekte edilen grup ile bütün diğer gruplar arasında tek yönlü ANOVA ve sonrasında yapılan Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır ($p<0,01$).



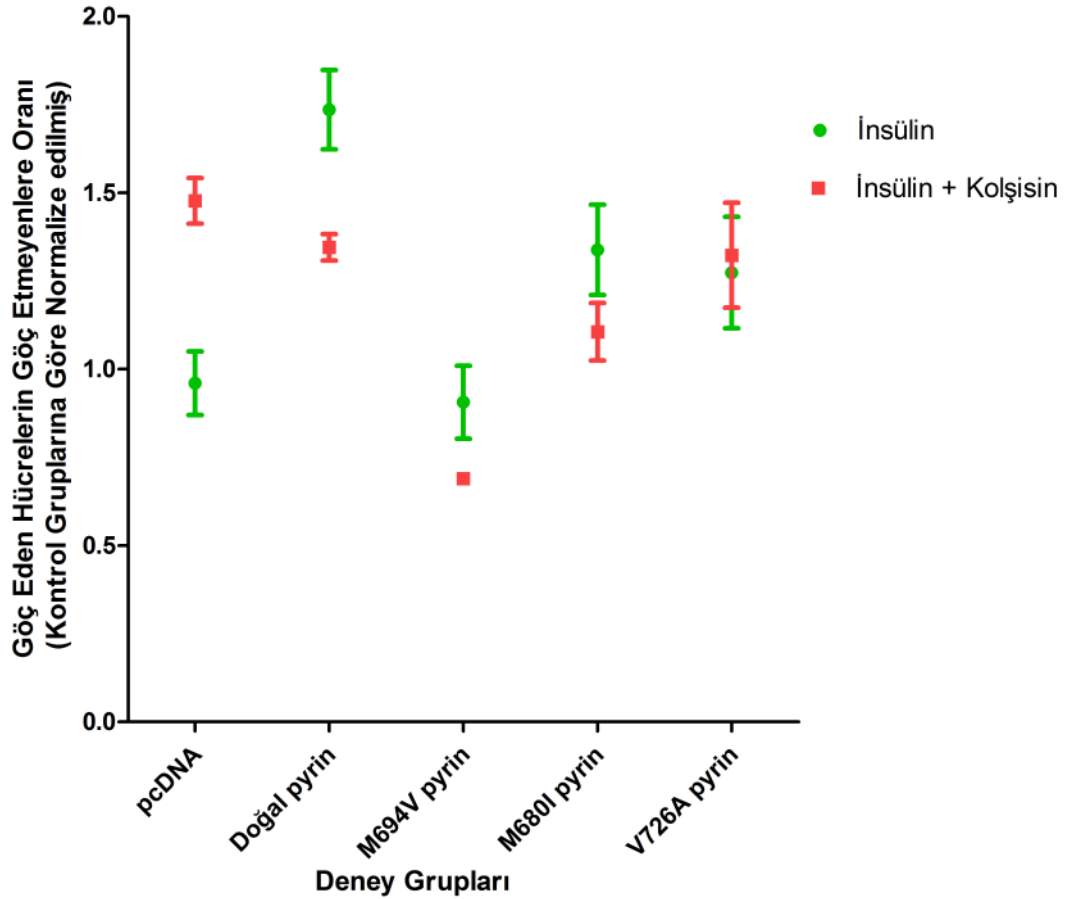
Şekil 4.21. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden hücrelerin göç etmeyen hücrelere oranları (kontrol gruplarına oranla). Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. Sütun renkleri farklı transfeksiyon koşullarını temsil etmektedir. “+ I” insülin uygulanan deney gruplarını göstermekteyken “+ İK” hem insülin hem kolşisin uygulanan deney gruplarını göstermektedir. **p<0,01. ***p<0,001



Şekil 4.22. Filtre deneyinde her deney grubundaki insülin ve kolşisin alan hücreler için göç eden hücrelerin göç etmeyen hücrelere oranları (insülin alan deney gruplarına oranla). Sütunların yükseklikleri deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. Sütun renkleri farklı transfeksiyon koşullarını temsil etmektedir. “+ İ” insülin uygulanan deney gruplarını göstermekteyken “+ İK” hem insülin hem kolşisin uygulanan deney gruplarını göstermektedir. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Şekil 4.23’de ise her transfeksiyon grubu için sadece insülin alan ile insülin ve kolşisin alan grupların bir başka karşılaştırması görülmektedir. Burada açıkça sadece pcDNA grubu dışında kolşisinin hücre göçünü azaltıcı etkisi görülmektedir. Bu

verilere göre yapılan 2 yönlü ANOVA analizi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır ($p < 0,001$) ve bu anlamlı fark transfeksiyon farklılığından kaynaklanmaktadır ($p < 0,01$). Farkı yaratan grup ise diğer transfeksiyon gruplarında kolşisin hücre göçünü düşürürken hücre göçünün arttığı pcDNA grubudur ($p < 0,05$).



Şekil 4.23. Filtre deneyinde her deney grubundaki göç eden hücrelerin göç etmeyen hücrelere oranları (kontrol gruplarına oranla). Noktalar deney gruplarının ortalamalarını, bağlantılı çizgiler ise standart sapmaları göstermektedirler. Yeşil renk sadece insülin uygulanan gruplara ait verileri temsil etmekteyken kırmızı renk insülin ve kolşisin uygulanan grupları temsil etmektedir.

5. TARTIŞMA

Günümüzde insan hastalıklarının pek çoğunda inflamatuvar süreçlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. İnflamatuvar süreçte inflamatuvar hücre göçünün önemi göz ardı edilemez. Bunun en önemli nedeni, inflamatuvar yanıtın oluşacağı hedef doku veya dokularda, hasarla sonuçlanan inflamatuvar yanıt oluşurken diğer dokuların inflamatuvar yanıt ve dolayısıyla hasardan korunmasıdır. İnflamasyonun kontrol altından çıktığı ve vücutta yaygın inflamasyonun olduğu pek çok hastalıkta bile bazı dokular inflamasyondan hiç etkilenmemekte veya daha az etkilenmektedir. Bu doku seçiciliğinde en önemli neden, inflamatuvar hücre göçüdür. Ailesel Akdeniz Ateşi (AAA) hastalığı da özellikle doğal bağışıklık sisteminin kontrolsüz inflamatuvar yanıt oluşturması sonucu ortaya çıkan, otoinflamatuvar hastalıklardan birisidir. Bu hastalıkta da inflamatuvar yanıt, periton gibi bazı dokularda diğerlerine göre çok daha öncelikli olarak ortaya çıkarken, merkezi sinir sistemi gibi bazı dokular inflamatuvar cevaptan hiç etkilenmemektedir (14,15). Bu nedenle, AAA patogenezinde de hücre göçünün doğrudan veya dolaylı olarak rol oynadığı şüphesizdir.

Bu tezin savunduğu hipotezin dayanak noktası, AAA hastalığından sorumlu *pyrin* proteininin, inflamatuvar hücre göçü üzerinde doğrudan etkileri olabileceğine ilişkin kanıtlardır. Bu kanıtlardan bazıları; *pyrinin* hücre göçünden sorumlu proteinlerle olan ilişkisine dayanmaktadır. Bu proteinlerden bazıları PSTPIP1, tubülin, aktin, Arp2 ve VASP proteinleridir (10). Ayrıca, doğal hücrelerde hücre göçü sırasında gerek doğal, gerekse M694V mutant *pyrinin* aktif aktin polimerizasyonu yönünde yerleştiği gösterilmiştir (10).

Pyrinin hücre göçünde rol aldığını gösteren dolaylı bir kanıt ise, mikrotübül polimerizasyonunu bozarak, hücre göçünü bozduğu bilinen kolşisinin AAA tedavisinde ilk tercih ilaç olarak kullanılmasıdır (11). Nötrofillerin inflamasyonun ilk üç gününde dokulardaki inflamasyondan sorumlu oldukları ve daha sonra yerlerini dokulara göç eden monositlere bıraktığı bilinmektedir (59). Bu durum, klasik AAA ataklarının süresiyle örtüşmesi nedeniyle bu ataklardan sorumlu olan başlıca

hücrelerin doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofiller olabileceğini düşündürmektedir. ABCB1 (*ATP Binding Cassette B1*) gibi kolşisinin hücre dışına pompalanmasından sorumlu sistemlerin kendilerinde daha az bulunması nedeniyle doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofillerin kolşisinin birinci hedefi olması olasıdır (52). Bu nedenle, hücre göçü mekanizmalarını bozan kolşisinin özgül olarak nötrofil hücre göçünü hedef alarak etki göstermesi de mümkündür. Bu da AAA patogenezinde hücre göçünün doğrudan önemli olabileceğine yönelik dolaylı; ancak önemli kanıtlar arasındadır.

Bu tez çalışmasının amaçları, *pyrinin* ve mutant formlarının hücre göçü üzerine olan etkilerinin gösterilmesi ve *pyrinin* hücre göçüne olan etkilerini kolşisinin nasıl değiştirdiğinin araştırılmasıdır. Bunu yapabilmek amacıyla bu tez çalışmasında öncelikle kolşinin, kullanılan hücre hatları üzerine olan toksik etkileri incelenmiştir. Kolşisinin farklı hücre tipleri üzerine etkilerini farklı derişimlerde ve farklı etki sürelerinde gösterebildikleri bilinmektedir. Örneğin, bir çalışmada HL-60 (*Human Leucemia 60*, İnsan Lösemisi 60) hücre hattı için IC₅₀ (*Inhibitory Concentration 50*, İnhibitör Derişim 50) saptanan kolşisin değeri $8,71 \times 10^{-3}M$, bir fibroblast hücre hattı olan 3T3 (*3-day Transfer - 3x10⁵ cells*, 3 günde transfer - 3×10^5 hücre) hücreleri için saptanan kolşisin değeri $1,05 \times 10^{-6}M$, NHK (*Normal Human Keratinocytes*, Normal İnsan Keratinositleri) hücreleri için saptanan kolşisin değeri $1,74 \times 10^{-8}M$ olarak bulunmuştur (53). Kolşisinin farklı hücre hatları arasındaki yüz bin kata varan farklı IC₅₀ değerleri nedeniyle bu çalışmadaki deneyler için uygun kolşisin derişimini saptamak şart olmuştur. Bu tez çalışmasında, hücre ölümünü anlamlı olarak artırmayan, hücrenin mikrotübül iskeletini bozmayan ve hücre göçünden sorumlu olduğu bilinen Golgi Aparatı'nın bütünlüğünü bozmayan en yüksek kolşisin derişimi o hücre hattı için göç deneylerinde kullanılmıştır. Derişimin bu şekilde seçilmesi AAA hastalığının tedavisinde kullanılan toksik olmayan en yüksek kolşisin derişiminie yakın bir derişim saptamak amacıylaadır. Buna göre, HeLa hücreleri için 7,5ng/ml, COS-7 hücreleri için 10ng/ml uygun kolşisin derişimleri olarak belirlenmiştir. COS-7 hücreleri için belirlenen kolşisin derişimi filtre deneylerinde kullanılırken HeLa hücreleri için belirlenen kolşisin derişimi ile yara iyileşmesi deneyleri yapılmamıştır.

Ancak, HeLa hücrelerine ait kolşisin toksisitesi verileri bu 2 hücre hattının diğer özelliklerinin yanında, kolşisine verdikleri cevapları açısından da farklılık gösterdiklerinin belirlenmesi önemlidir.

Bu tez çalışmasından elde edilen en güçlü sonuç, doğal *pyrinin* hücre göçünü artırdığına yönelik bulgulardır. Bu yöndeki kanıtlar, iki farklı deney sisteminden gelmektedir. Bu deney sistemlerinden birincisi yara iyileşmesi deney sistemidir. Bu deney sisteminde kullanılan HeLa hücreleri, *pyrinin* doğrudan ilişkide olduğu bilinen ve hücre göçünde *pyrin* ile birlikte çalışabileceği düşünülen ASC ve PSTPIP1 proteinlerini doğal olarak ifade etmemektedirler (38, 44). Bu nedenle, *pyrinin* HeLa hücre hattında hücre göçünün üzerine bir etkisinin olması bu iki proteinle olan etkileşimine bağlanmamaktadır.

Yara iyileşmesi deney sistemlerinde yaranın iyileşme sinyalinin nasıl oluştuğu ve hücrelerin nasıl durağan epitel hücre özelliklerini değiştirerek, göç eden aktif hücrelere dönüştüğü tam olarak bilinmemektedir. Yara iyileşmesi sırasında hücrelerdeki sinyal iletimi yollarını açıklamak için çok çeşitli hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, EGF (*Epidermal Growth Factor*, Epidermal Büyüme Faktörü) gibi bazı otokrin ve parakrin büyüme faktörlerinin, hücre-hücre, hücre-matriks (74,75) bağlarının kopması ve komşu hücre hasarı gibi bazı faktörlerin etkisi tartışılmıştır. Çalışmalarda, bu faktörlerin hepsi, yara sınırına komşu hücrelerde MAPK yolağının aktive edilmesi ve hücrelerin morfolojik ve işlevsel değişimi ile sonuçlanmıştır. Bununla beraber, yara iyileşmesi deneylerinde komşu hücre hasarının üzerinde özellikle durulmuştur. MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*, Madin-Darby Köpek Böbreği) epitelyal hücre hattı ile yapılan yara iyileşmesi deneylerinde komşu hücre hasarı yaratılan yara modelinde ve komşu hücre hasarı yaratılmayan yara modeline göre MAPK sinyal yolağı aktivasyonunun daha erken olduğu ve hücre göçünün daha hızlı gerçekleştiği gösterilmiştir (76). Bu durum, hücre içeriğinin besi yerine yayılması ve hücre artıklarının oluşması gibi bazı sinyallerin yara içine hücre göçünü tetiklemede önemli olduğunu göstermektedir. Benzer deneylerde yara sınırında artmış oksijen radikallerinin de yara içine epitelyal hücre göçünü tetiklemede önemli olabileceği tartışılmıştır (76). Bunların hepsi

inflamasyon alanında da gerçekleşen ve inflamasyonun hem tetikleyicisi hem de sonucu olan olaylardır. Bu tez çerçevesinde yapılan yara iyileşmesi deneylerinde de hücre hasarı yaratan bir sistem kullanılmıştır. Bu sistemde *pyrinin* hücre göçü üzerine bir etkisinin olduğunun gösterilmesi, özellikle hasar kaynaklı sinyallere *pyrinin* cevap verdiğini işaret edebilir. *Pyrinin* inflamatuvar sinyal benzeri hasar sinyallerini algılayan hücre içi sinyal iletiminde bir görev alması *pyrinin* inflamasyon ile ilişkili rolüyle de doğrudan bağdaşmaktadır.

Pyrinin HeLa hücrelerinde 208, 209 ve 242. pozisyonlarındaki serin bölgelerinden fosforile olduktan sonra 14-3-3 protein ailesinin bazı izoformları ile etkileşime geçerek çekirdeğe girebildiği bilinmektedir (47). 14-3-3 proteinleri MAPK sinyal iletimi yolağında *scaffold* proteinler olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle, özellikle *pyrinin* aşırı ifade edildiği hücrelerde *pyrinin* bu yolağı etkilemesi, hatta *pyrinin* bazı MAPK'ler tarafından fosforile edilen bir hedef olması olasıdır. *Pyrinin* fosforilasyonundan sorumlu proteinler henüz bilinmemektedir (47).

Pyrinin çekirdeğe girmesinin bazı genlerin ifadesini değiştirebileceğine yönelik kanıtlar vardır. Bunlardan birincisi, *pyrin* bir DNA bağlayan protein *domaini* olan bZIP *domaini* içermektedir (40). Bunlardan bir diğeri ise p65 gibi transkripsiyon faktörleri ile *pyrinin* etkileşime girmesidir (40). Çekirdeğe giren *pyrinin* burada hücre göçünü artıracak şekilde gen ifadesini etkileyecek olaylara yol açması olasıdır.

14-3-3 proteinleri ile etkileşimde özellikle önemli olduğu belirtilen *pyrinin* 242. pozisyonundaki serin amino asidinin *missens* mutasyonları AAA ile ilişkili bulunmuştur (47). Ayrıca, bu 3 amino asidi kodlayan nükleotid dizileri AAA kliniği ile en çok ilişkilendirilen iki ekzondan biri olan ekzon 2 üzerinde yer almaktadır (21,22). Bu nedenle, bu bölgenin fosforilasyonu ve hücre göçüne yaptığı olası katkı hücre göçünü etkilemesiyle AAA patogenezi açısından önemli olabilir.

Bir başka olasılık da *pyrinin* doğrudan ya da dolaylı olarak MAPK sinyal iletim yolağında bir hedef protein olmasıdır. *Pyrinin* aktin, aktin ilişkili proteinler ve tübülün ile de doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşime girdiği bilinmektedir (8,10). Bu şekilde, *pyrin* doğrudan bu proteinlerin işlevlerini etkileyerek de hücre göçünü

etkileyebilir. Tüm bu nedenlerle, *pyrinin* hücre göçü üzerine etkisinde *pyrin* fosforilasyonunun önemini saptanması için ileri deneylere gereksinim vardır.

MAPK sinyal yolağı, otoinflamatuvar hastalıklar ve hücre göçü ile ilgili önemli bir bulgu da, başka bir otoinflamatuvar hastalık olan NOMID (*Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease*, yenidoğanın multisistem inflamatuvar hastalığı) ve *Muckle-Wells* Sendromu'nun bulgularını taşıyan bir çocuğa ait vaka sunumundan gelmektedir. Bu iki hastalık da *cryopyrin* adı verilen inflamazom oluşumunda görevli *pyrinden* başka bir proteini kodlayan gendeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir otoinflamatuvar hastalıktır. Bu vakada, kemoatraktanlar cevap olarak azalmış nötrofil göçü filtre deneyleri kullanılarak gösterilmiştir. Buna karşın, yapılan *Western Blot* analizi ile nötrofillerde p38 MAPK miktarının, kontrol nötrofillere göre arttığı gözlenmiştir (77). Bu durum, p38 MAPK artışına mutant *cryopyrin* taşıyan nötrofillerde hücre göçü açısından yanıtızlığı göstermektedir. Bu bulgu, otoinflamatuvar hastalıklarda MAPK yolağı ile hücre göçünün uyarılmasında sorun olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Bu gözlem de *pyrinin*, *cryopyrin* gibi, hücre göçü sinyallerinin hücre içi iletiminde benzer bir görevi olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

İkinci grup hücre göçü deneylerinde ise, filtre deneyleri aracılığıyla *pyrin*, mutantları ve kolşisinin hücre göçü üzerine etkileri incelenmiştir. Filtre deneylerinde transfeksiyon grupları arasında bir kemoatraktan ya da kolşisin uygulanmadığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Diapedez hareketinin test edildiği bu deney sisteminde *pyrinin* mutant formlarının kendiliğinden hücre göçü üzerine etkisi olmadığını saptanmıştır. Ancak, insülin aracılığıyla tetiklenmiş hücre göçü incelendiğinde, doğal *pyrin* grubu ile diğer gruplar arasındaki fark göze çarpmaktadır. Bu farklardan M694V *pyrin* ve pcDNA grupları ile doğal *pyrin* grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

COS-7 hücrelerinin insülin gradyentinde filtre deneylerinde göç etmesi sağlanan bir çalışmaya rastlanılmamıştır; ancak COS-7 benzeri bir çok hücre daha önceden kullanılmıştır (78). Ayrıca, başka deney sistemlerinde de COS-7 hücrelerinin insüline karşı hücre göçü cevabı verdikleri bilinmektedir. Bu tezde yapılan filtre

deneylerinde de COS-7 hücreleri insüline cevap olarak doğal *pyrin* ifadeleri olmadığı durumda, *pyrin* içeren COS-7 hücrelerine göre daha az göç ettikleri saptanmıştır.

COS-7 hücrelerinin göç hareketlerinde kolşisinin etkisi test edildiğinde, pcDNA grubunda kolşisinin hücre göçü üzerine anlamlı bir artışa neden olduğu; ancak doğal ve mutant *pyrin*ler ile transfekte deney gruplarında bu artış eğiliminin istatistiksel olarak anlamlı olarak tersine döndüğü gözlenmiştir. Başka bir deyişle kolşisinin hücre göçü üzerine baskılayıcı etkisini gösterebilmesi için mutlaka doğal tip veya mutant *pyrin* varlığı gereklidir.

Bu tez çalışmaları kullanılarak kolşisin derişiminde, pcDNA ile transfekte edilen COS-7 hücrelerinde göç hareketinin artması önemlidir. Hücrelerin mikrotübül yapısı, yüksek ve düşük derişimlerde kolşisinden farklı etkilemektedir. Kolşisinin etkisi düşük derişimlerde mikrotübüllerin dinamik instabilitesini azaltarak mikrotübülleri daha stabil hale getirmekteyken yüksek kolşisin derişimlerinde mikrotübül depolimerizasyonuna neden olmaktadır (49). Kolşisinin farklı derişimlerdeki bu etkileri, farklı hücre işlevleri üzerine etkileriyle de ilişkilendirilmiştir. Kolşisinin yara iyileşmesi deney sisteminde CHO (*Chinese Hamster Ovary*) hücrelerinde hücre göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir (49). Bu durum, kolşisinin aktif lamellipod oluşumunu engellemesinden çok, hücrenin arka kısmındaki işlevleri bozması ile ilişkilendirilmiştir. Daha stabil mikrotübüllerin göç eden hücrenin ön kısmında; ancak daha dinamik mikrotübüllerin hücrenin arka kısmında yerleştiğinin de gösterilmesi bu durumu desteklemektedir (49). Bu deneylerin sonucuna göre kolşisin hücrenin göç hareketine başlamasını değil; ancak hücrenin göç hareketini devam ettirmesini engelleyen bir ilaç olarak göze çarpmaktadır. Filtre deneylerinde de hücrelerin diapedez hareketi ile gövdelerinin büyük kısmını filtrenin alt kısmına geçirebilmeleri onları göç etmiş hücreler olarak belirtmektedir. Bu hücreler tripsine maruz kaldıklarında büyük olasılıkla filtrenin alt kısmında kalmaktadırlar. Bu nedenle, kolşisin varlığında hücrenin arka kısmının hücreyi takip ederek göç hareketlerini tamamlamasalar da hücrelerin göç etmiş olarak saptanabileceği düşünülebilir.

Kolşisinin transkripsiyon üzerine etkileri olduğu da bilinmektedir. Grubumuzda yapılmakta olan başka bir çalışmada, THP-1 hücrelerinde kolşisinin mikrotübüllere, mikrotübül ilişkili proteinlere, aktine ve aktin ilişkili proteinlere ait pek çok mRNA'nın ifadesini düşük derişimlerde dahi etkilediğini göstermiştir. Benzer bir çalışma HUVEC (*Human Umbilical Vein Epithelial Cells*, İnsan göbek kordonu toplardamar epitel hücreleri) ile de yapılmış ve kolşisinin transkripsiyon üzerinde derişim ve zaman bağı etkisi gösterilmiştir (79). Kolşisinin küçük bir molekül olması sebebiyle aktin ve diğer başka proteinler üzerine doğrudan etkileri de olabileceği unutulmamalıdır.

Kolşisine maruz kalan hücrelerde aktin ve aktin ilişkili proteinlerin protein miktarının da arttığı gösterilmiştir (80). Aktin iskeleti, özellikle lamellipodlardaki ağ benzeri aktif yapısı ile hücrenin ilerlemesinden sorumlu olduğu bilinen hücre iskeleti üyesidir (64). Kolşisin derişiminin artışı sonucu hücrelerin bazı mekanik özelliklerinde değişiklikler olduğu bildirilmiştir (80). Bu etkiler, beklenebileceği üzere hücreleri daha kırılğan hale getirmek yerine hücreleri daha sert hale getirmektedir. Bu durum da hücreler içindeki aktin iskeletinin miktarının artmasına bağlanmıştır. Artmış aktin miktarının hücreyi göç sinyallerine daha duyarlı hale getirebileceği görüşü elbette ki tartışmalıdır; ancak bu durum kolşisine verilen yanıtın, hücre göçünde artış şeklinde olmasını açıklayabilir.

Yüksek derişimlerde kolşisin kullanılarak yapılan çalışmalarda, endotel hücrelerinin yüzeylerine PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) taşımalarının engellendiği ve böylece endotel üzerinden inflamatuvar hücre göçünün azaldığı belirtilmiştir (81,82). Bir başka çalışmada ise, gut modeli olan farelerde düşük dozlarda verilen kolşisin hücre göçünü inhibe etmezken hücre göçünü inhibe edecek dozun onda biri dozlarda süperoksit oluşumunu engelleyerek gut ataklarına faydalı olabileceği belirtilmiştir (83). Bu çalışmaların da gösterdiği gibi kolşisinin hücre göçü üzerinde yaratabileceği etki derişim bağımlı olabilmektedir ve kolşisinin beklendiğinin aksine hücre göçünü baskılamaması deneylerde kullanılan derişiminin düşük olması ile açıklanabilir.

COS-7 hücre hattıyla yapılan filtre deneylerinde insülin varlığında hücrelerin doğal *pyrine* verdiği göç cevabının iki olası nedeni olabilir. Birincisi, HeLa hücrelerindeki benzer nedenlerle COS-7 hücrelerinde doğal *pyrinin* insüline karşı hücre göçü yanıtı oluşturmasıdır. İkincisi ise, COS-7 hücre hattının, HeLa hücre hattından, farklı proteinleri ifade etmesi ve bu proteinler aracılığıyla hücre göçü cevabı oluşturabilmeleridir. Bu farklı ifade edilen proteinler arasında en dikkati çeken *pyrin* proteini ile etkileşime girdiği bilinen PSTPIP1 proteindir. COS-7 hücre hattı doğal olarak PSTPIP1 proteinini ifade etmektedir (44).

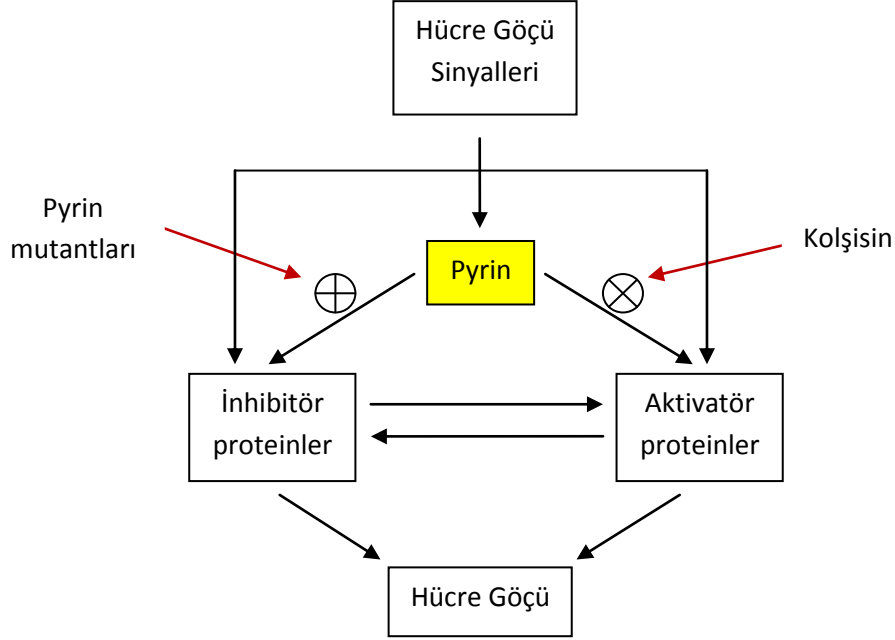
Pyrinin domainlerinin işlevleri için öne sürülen bir modele göre inflamasyon için bir sinyal olmadığı anlarda pyrin, B-box ve PYD domainleri birbirinin üzerine katlanmış ve otoinhibisyon halinde bulunmaktadır (84). Bu modele göre, bir trimer halinde bulunan pyrin proteini trimerik olan PSTPIP1 ile B-Box domaini aracılığıyla etkileşime girerek kendi üzerindeki inhibisyonu kaldırır ve böylece pyrinin PYD domaini açığa çıkarak ve ASC'nin PYD domaini ile etkileşime geçerek kaspaz-1 aktivasyonunu gerçekleştirebilir. Bu modele göre PAPA Sendromu'ndan sorumlu mutasyonlara sahip olan PSTPIP1 mutantları pyrine daha yüksek afinite ile bağlanarak pyrinin aşırı miktarda ASC aktivasyonuna sebep olmasına neden olurlar. Literatürdeki bir başka bilgi de PAPA Sendromu olan bireylerin heterozigot MEFV mutasyonu taşıdıklarında daha hafif bir klinik tabloya sahip olmalarıdır (85). Burada pyrin için ASC aktivasyonu sürecinde bahsedilen durum doğal tip ve mutant pyrinler için bu tez çalışması kapsamında hücre göçü için elde edilen bulgularla örtüşmektedir. Bu tez çalışmasındaki bulgularla da doğal pyrin hücre göçünü artırırken M694V mutant formunda kontrol grubu seviyelerine dönecek şekilde bir düşüş vardır. Bunun yanında, kolşisinin PSTPIP1 ve pyrin arasındaki etkileşimi bozarak ASC aktivasyonunu azalttığı da gösterilmiştir (84). Bu durum da mutant veya doğal tip pyrin varlığında kolşisine verilen yanıt göze alındığında bu tez kapsamında elde edilen verilerle örtüşme halindedir. Tüm bu örtüşmeler filtre deneyinde gösterilen bu değişikliklerin pyrinin PSTPIP1 ile etkileşiminin hücre göçü üzerine etkilerinin yansıması olabileceğini düşündürmektedir.

PSTPIP1 proteinini aşırı ifade eden farklılaşmış HL60 hücrelerinde, bu proteinin hücre göçünü azalttığı ve HeLa hücrelerinde fagositoz işlevini bozduğu daha önceden gösterilmiştir. Bahsedilen model ile bu bilgi birleştirildiğinde *pyrin* ve PSTPIP1 etkileşiminin PSTPIP1'in hücre göçü üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığı düşünülebilir. Bu durumda, *pyrinin* bu tez çalışmasında, bahsedilen koşullar altında, COS-7 hücre hattındaki hücre göçü yanıtları, PSTPIP1 etkileşimi ile açıklanabilir.

Pyrin tipinin ve kolşisinin etkisi beraber değerlendirildiğinde hücre göçünün *pyrin* tarafından kontrolünde oldukça karmaşık bir yolak ortaya çıkmaktadır. Bu yolak *pyrin* merkezli bir bakış açısı ile şöyle açıklanabilir. *Pyrin*, henüz işlevinin tam olarak ne olduğu bilinmeyen ve büyük olasılıkla bir sinyal yolağının sonunda yer alan bir proteindir. *Pyrin* aktif hale geçince, hücre göçü üzerine hem inhibisyon hem de aktivasyon yapan bazı hücre iskeleti elemanları ve bunlarla ilişkili proteinlerle etkileşime geçer. Bu etkileşimlerden özellikle hücre göçünü uyarıcı nitelikte olanlar kolşisine duyarlıdır; çünkü sadece *pyrin* ve mutantları varlığında kolşisinin hücre göçünü pcDNA grubuna göre baskılayıcı etkisi ortaya çıkmaktadır. *Pyrinin* hücre göçü üzerine olan genel etkisi ise uyarıcı yönde olmaktadır; ancak mutant *pyrinler* varlığında bu durum bozulmaktadır. Bu da büyük olasılıkla *pyrinin* hücre göçünü uyarıcı proteinler ilişkisini kaybetmesinden çok hücre göçünü inhibe eden proteinlerle ilişkisinin güçlenmesi nedeniyle; çünkü kolşisine duyarlılık mutant *pyrin* proteinleri için dahi devam etmektedir. *Pyrinden* bağımsız hücre göçünü kontrol eden başka sinyal yolaklarının da olduğuna şüphe yoktur (Şekil 5.1).

Pyrinin diğer çalışmalarda ortaya çıkmış çelişkili proinflamatuvar ve antiinflamatuvar görevleri konusuna da değinmek gereklidir. Doğal *pyrinin* hücre göçünü artırması inflamasyon ve hücre göçünün yakından ilişkili olaylar olması nedeniyle *pyrinin* proinflamatuvar bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, artmış inflamasyonun görüldüğü AAA'ya yol açan *pyrin* mutantları ile hücre göçünün baskılanması doğal *pyrinin* antiinflamatuvar rolü olabileceğini ve mutasyonlar ile bunu kaybetmiş olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, hücre

göçü açısından da bakıldığında *pyrinin* hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar özellikler gösteren görevleri olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 5.1. *Pyrinin* hücre göçünün kontrolündeki yerini gösteren ve bu tez çalışmasının bulguları ile oluşturulan şema.

Bu tez çalışması sonucunda doğal *pyrin* proteininin etkileri doğal koşullar altında *pyrin* proteini ifade etmeyen ve inflamatuvar sistem hücresi olmayan hücrelerde gösterilmiştir. Öncelikle, bu hücreler *pyrin* ifade etmediklerinden *pyrinin* etkilerini gerçekleştirmek için gereksinim duyduğu ve etkileşime girdiği diğer bütün proteinlerin tamamına da sahip değildir. COS-7 ve HeLa hücre hattı *pyrinin* etkileşime girdiği proteinlerin ancak bir kısmını içerebilirler. Bu iki açıdan önemlidir. Birincisi, hem HeLa hem de COS-7 hücre hatlarının *pyrinin* hücre göçü üzerindeki etkilerini gerçekleştirmek için gereksinim duyduğu “makine”ye inflamatuvar hücreler olmamalarına karşın sahip olmasıdır. Bu tez çalışmasında kurulan sistem, bu nedenle kısmen de olsa izole bir sistemdir ve *pyrinin* normalde içinde bulunmadığı bir sitoplazmadaki işlevini incelemektedir. Bu “makine”nin tamamına sahip olmayan hücrelerde bile *pyrinin* hücre göçünü etkileyebilmesi *pyrinin* genel geçer bazı hücre

göçü kontrol yolları üzerinden doğrudan etkileri olabileceğini düşündürmektedir. İkincisi ise, *pyrinin* burada gösterilen etkisinin *pyrini* doğal olarak ifade eden hücrelerde aynı olmayabileceğidir. Örneğin, *pyrin* ile etkileşimi iyi bilinen ASC proteini deneylerde kullanılan her iki hücre hattında da bulunmamaktadır. ASC'nin ve diğer inflamatuvar protein makinesinin bulunduğu bir bağışıklık sistemi hücresinde *pyrinin* hücre göçü üzerinde farklı bir etki gösterebileceği akılda tutulmalıdır. Buna karşın, her iki hücre hattında da aynı etkiyi gösteren doğal *pyrin* proteininin hücre göçü üzerinde mutlaka bir etkisi olduğunu ve büyük olasılıkla da bunu hücre göçünü uyarıcı yönde gösterdiğini düşünmek yerinde olacaktır.

Bu çalışmanın temel sonuçlarını oluşturan filtre deneylerinin bazı kısıtlılıkları da vardır. Bu kısıtlılıklar arasında en çok göze çarpanı deneylerde geçici olarak transfekte edilmiş hücrelerin kullanılmasıdır. Geçici transfekte hücrelerle yapılan deneyler homojen olmayan bir hücre topluluğunda yapıldığı için gözlenen etkiler sadece hücrelerin transfekte olan kısmının neden olduğu değişikliklere atfedilebilmektedir. Bu nedenle, kalıcı olarak transfekte edilmiş hücrelerle deney tekrarlandığında saptanabilecek farklar gözden kaçabilmektedir. Ancak, geçici transfekte hücrelerle elde edilen istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarının kalıcı transfekte hücrelerle aynı deney tekrarlandığında sadece istatistiksel olarak daha da anlamlı sonuçlar elde edilmesi beklenebilir. Bunun nedeni, yapılan deneyde artık bütün hücrelerin transfeksiyondan kaynaklanan farklılığı gösterecek olmasıdır.

Transfeksiyon ile yapılan deneylerin bir başka etkisi de bu deneylerde aşırı protein ifadesine bağlı hücre işlevlerinin bozulmasıdır. Filtre deneyleri ile eş zamanlı yapılan immünflorasan boyamalarda da görüldüğü gibi bazı hücrelerde *pyrin* protein agregatları oluşmuştur. Bu şekilde oluşan aşırı proteinler hücrelerin aktif çaba harcayarak yerine getirdikleri hücre göçü gibi işlevleri yerine getirememelerine neden olması beklenir. Bu durum belki de mutantlardaki hücre göçü olmaması durumunu açıklayabilir; ancak doğal *pyrin* grubu bu durumdan etkilense dahi *pyrinin* işlevini yerine getirmesi engellenmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- COS-7 hücre hattında mikrotübül iskeletinin genel yapısını bozmayan kolşisin derişimi 10ng/ml olarak saptanmıştır.
- HeLa hücre hattında mikrotübül iskeletinin genel yapısını bozmayan kolşisin derişimi 7,5ng/ml olarak saptanmıştır.
- Yara iyileşmesi deneylerinde doğal *pyrinin* HeLa hücre hattında hücre göçünü artırdığı gösterilmiştir.
- Filtre deneylerinde doğal *pyrinin* COS-7 hücrelerinde insülin gradyenti varlığında hücre göçü hareketini ortaya çıkardığı gösterilmiştir.
- M694V, M680I, V726A *pyrin* mutantları ile yapılan filtre deneylerinde doğal *pyrinin* hücre göçünü artırıcı etkisinin ortadan kalktığı ve *pyrinin* hücre göçünü tetikleyici görevi açısından bir işlev kaybına neden olduğu gösterilmiştir.
- Filtre deneylerinde COS-7 hücrelerinde insülin gradyenti varlığında 10ng/ml kolşisinin hücre göçünü artırdığı gösterilmiştir.
- COS-7 hücrelerinde doğal *pyrin* ve *pyrin* mutantlarının kolşisin varlığında insülinle oluşturulan göç yanıtını tersine çevirdiği gösterilmiştir.
- Daha detaylı incelemeye ve kantitasyona izin veren yönelim deneyleri gibi hücre göçü deney sistemleri ile *pyrinin* hücre göçü üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik yeni çalışmalar planlanmalıdır. Ayrıca, ışık mikroskopisi ve florasana mikroskopisi yöntemleri ile canlı hücre görüntülemesi yapılarak hücre iskeleti ve hücre hareketi dinamiklerinin aşamalarının incelenerek, *pyrinin* hücre göçünün hangi aşamasını etkilediğinin araştırılması için yeni çalışmalar planlanabilir.
- Özellikle doğal bağışıklık sistemine ait hücre hatları olmak üzere farklı hücre hatları ve in vivo deneylerle *pyrinin*, mutantlarının ve kolşisinin hücre göçü üzerine etkilerinin araştırılması için yeni çalışmalar gerekmektedir.
- *Pyrinin* MAPK sinyal iletim yolağı ile olabilecek ilişkisinin araştırılması için yeni çalışmalar planlanabilir.

- Kolşisinin hücre göçü üzerindeki etkilerinin araştırılması ve pyrin ile kolşisin ilişkisinin detaylandırılması için diğer mikrotübül depolimerize edici ve polimerize edici moleküllerle deneyler yapılabilir.
- Pyrin ve ilişkili hücre göçü yollarının detaylı olarak açıklanması ile, otoinflamatuvar hastalıklar için yeni proteinler saptanabilir ve bunlar gelecekte ilaç araştırmaları için hedef olabilir.

KAYNAKLAR

1. Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454 (7203), 428-435.
2. Girard, J.P., Springer, T.A. (1995) High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology today*, 16 (9), 449-457.
3. Centola, M., Wood, G., Frucht, D.M., Galon, J., Aringer, M., Farrell, C. ve diğeri. (2000) The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood*, 95 (10), 3223-3231.
4. Chae, J.J., Cho, Y.H., Lee, G.S., Cheng, J., Liu, P.P., Feigenbaum, L. ve diğeri. (2011) Gain-of-Function Pyrin Mutations Induce NLRP3 Protein-Independent Interleukin-1beta Activation and Severe Autoinflammation in Mice. *Immunity*, 34 (5), 755-768.
5. Meinzer, U., Quartier, P., Alexandra, J.F., Hentgen, V., Retornaz, F., Kone-Paut, I. (2011) Interleukin-1 Targeting Drugs in Familial Mediterranean Fever: A Case Series and a Review of the Literature. *Seminars in arthritis and rheumatism*.
6. Papin, S., Cuenin, S., Agostini, L., Martinon, F., Werner, S., Beer, H.D. ve diğeri. (2007) The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell death and differentiation*, 14 (8), 1457-1466.
7. Gavrillin, M.A., Mitra, S., Seshadri, S., Nateri, J., Berhe, F., Hall, M.W. ve diğeri. (2009) Pyrin critical to macrophage IL-1beta response to Francisella challenge. *Journal of immunology*, 182 (12), 7982-7989.
8. Mansfield, E., Chae, J.J., Komarow, H.D., Brotz, T.M., Frucht, D.M., Aksentijevich, I. ve diğeri. (2001) The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood*, 98 (3), 851-859.
9. Waite, A.L., Schaner, P., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Masters, S.L., Brydges, S.D. ve diğeri. (2009) Pyrin Modulates the Intracellular Distribution of PSTPIP1. *PloS one*, 4 (7), e6147.
10. Waite, A.L., Schaner, P., Hu, C., Richards, N., Balci-Peynircioglu, B., Hong, A. ve diğeri. (2009) Pyrin and ASC co-localize to cellular sites that are rich in polymerizing actin. *Experimental biology and medicine*, 234 (1), 40-52.

11. Zadeh, N., Getzug, T., Grody, W.W. (2011) Diagnosis and management of familial Mediterranean fever: integrating medical genetics in a dedicated interdisciplinary clinic. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 13 (3), 263-269.
12. Terkeltaub, R.A. (2009) Colchicine update: 2008. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 38 (6), 411-419.
13. Livneh, A., Langevitz, P. (2000) Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Bailliere's best practice & research. Clinical rheumatology*, 14 (3), 477-498.
14. Livneh, A., Langevitz, P., Zemer, D., Zaks, N., Kees, S., Lidar, T. ve diğ erleri. (1997) Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism*, 40 (10), 1879-1885.
15. Yalcinkaya, F., Ozen, S., Ozcakar, Z.B., Aktay, N., Cakar, N., Duzova, A. ve diğ erleri. (2009) A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology*, 48 (4), 395-398.
16. Ben-Zvi, I., Livneh, A. (2011) Chronic inflammation in FMF: markers, risk factors, outcomes and therapy. *Nature reviews. Rheumatology*, 7 (2), 105-112.
17. Bilginer, Y., Akpolat, T., Ozen, S. (2011) Renal amyloidosis in children. *Pediatric nephrology*.
18. Ben-Chetrit, E., Touitou, I. (2009) Familial mediterranean Fever in the world. *Arthritis and rheumatism*, 61 (10), 1447-1453.
19. Tunca, M., Akar, S., Onen, F., Ozdogan, H., Kasapcopur, O., Yalcinkaya, F. ve diğ erleri. (2005) Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine*, 84 (1), 1-11.
20. Sood, R., Blake, T., Aksentijevich, I., Wood, G., Chen, X., Gardner, D. ve diğ erleri. (1997) Construction of a 1-Mb restriction-mapped cosmid contig containing the candidate region for the familial Mediterranean fever locus (MEFV) on chromosome 16p 13.3. *Genomics*, 42 (1), 83-95.
21. Touitou, I., Sarrauste de Menthière, C., Milhavet, F. (2010) InfEVERS: an online database for autoinflammatory mutations. Eriř im: 12 Haziran 2011, <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infEVERS/>
22. Milhavet, F., Cuisset, L., Hoffman, H.M., Slim, R., El-Shanti, H., Aksentijevich, I. ve diğ erleri. (2008) The infEVERS autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Human mutation*, 29 (6), 803-808.

23. Marek-Yagel, D., Bar-Joseph, I., Pras, E., Berkun, Y. (2009) Is E148Q a benign polymorphism or a disease-causing mutation? *The Journal of rheumatology*, 36 (10), 2372.
24. Topaloglu, R., Ozaltin, F., Yilmaz, E., Ozen, S., Balci, B., Besbas, N. ve diğ erleri. (2005) E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases*, 64 (5), 750-752.
25. Touitou, I., Sarkisian, T., Medlej-Hashim, M., Tunca, M., Livneh, A., Cattan, D. ve diğ erleri. (2007) Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Arthritis and rheumatism*, 56 (5), 1706-1712.
26. Ozen, S., Aktay, N., Lainka, E., Duzova, A., Bakkaloglu, A., Kallinich, T. (2009) Disease severity in children and adolescents with familial Mediterranean fever: a comparative study to explore environmental effects on a monogenic disease. *Annals of the rheumatic diseases*, 68 (2), 246-248.
27. Unal, A., Dursun, A., Emre, U., Tascilar, N.F., Ankarali, H. (2010) Evaluation of common mutations in the Mediterranean fever gene in Multiple Sclerosis patients: is it a susceptibility gene? *Journal of the neurological sciences*, 294 (1-2), 38-42.
28. Seyahi, E., Tahir Turanli, E., Mangan, M.S., Celikyapi, G., Oktay, V., Cevirgen, D. ve diğ erleri. (2010) The prevalence of Behcet's syndrome, familial Mediterranean fever, HLA-B51 and MEFV gene mutations among ethnic Armenians living in Istanbul, Turkey. *Clinical and experimental rheumatology*, 28 (4 Suppl 60), S67-75.
29. Uslu, N., Yuce, A., Demir, H., Saltik-Temizel, I.N., Usta, Y., Yilmaz, E. ve diğ erleri. (2010) The association of inflammatory bowel disease and Mediterranean fever gene (MEFV) mutations in Turkish children. *Digestive diseases and sciences*, 55 (12), 3488-3494.
30. Bayram, C., Demircin, G., Erdogan, O., Bulbul, M., Caltik, A., Akyuz, S.G. (2011) Prevalence of MEFV gene mutations and their clinical correlations in Turkish children with Henoch-Schonlein purpura. *Acta paediatrica*, 100 (5), 745-749.
31. Cosan, F., Ustek, D., Oku, B., Duymaz-Tozkir, J., Cakiris, A., Abaci, N. ve diğ erleri. (2010) Association of familial Mediterranean fever-related MEFV variations with ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism*, 62 (11), 3232-3236.
32. Day, T.G., Ramanan, A.V., Hinks, A., Lamb, R., Packham, J., Wise, C. ve diğ erleri. (2008) Autoinflammatory genes and susceptibility to psoriatic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58 (7), 2142-2146.

33. Ayaz, N.A., Ozen, S., Bilginer, Y., Erguven, M., Taskiran, E., Yilmaz, E. ve diğ erleri. (2009) MEFV mutations in systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*, 48 (1), 23-25.
34. Akdogan, A., Calguneri, M., Yavuz, B., Arslan, E.B., Kalyoncu, U., Sahiner, L. ve diğ erleri. (2006) Are familial Mediterranean fever (FMF) patients at increased risk for atherosclerosis? Impaired endothelial function and increased intima media thickness are found in FMF. *Journal of the American College of Cardiology*, 48 (11), 2351-2353.
35. Arra, M., Emanuele, E., Martinelli, V., Minoretti, P., Bertona, M., Geroldi, D. (2007) The M694V variant of the familial Mediterranean fever gene is associated with sporadic early-onset Alzheimer's disease in an Italian population sample. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 23 (1), 55-59.
36. Chae, J.J., Aksentijevich, I., Kastner, D.L. (2009) Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *British journal of haematology*, 146 (5), 467-478.
37. Palsson-McDermott, E.M., O'Neill, L.A. (2007) Building an immune system from nine domains. *Biochemical Society transactions*, 35 (Pt 6), 1437-1444.
38. Richards, N., Schaner, P., Diaz, A., Stuckey, J., Shelden, E., Wadhwa, A. ve diğ erleri. (2001) Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276 (42), 39320-39329.
39. Fink, S.L., Cookson, B.T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73 (4), 1907-1916.
40. Chae, J.J., Wood, G., Richard, K., Jaffe, H., Colburn, N.T., Masters, S.L. ve diğ erleri. (2008) The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. *Blood*, 112 (5), 1794-1803.
41. Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N. ve diğ erleri. (1999) ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry*, 274 (48), 33835-33838.
42. Chae, J.J., Wood, G., Masters, S.L., Richard, K., Park, G., Smith, B.J. ve diğ erleri. (2006) The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (26), 9982-9987.

43. Weinert, C., Grutter, C., Roschitzki-Voser, H., Mittl, P.R., Grutter, M.G. (2009) The crystal structure of human pyrin b30.2 domain: implications for mutations associated with familial Mediterranean fever. *Journal of molecular biology*, 394 (2), 226-236.
44. Balci-Peynircioglu, B., Waite, A.L., Hu, C., Richards, N., Staubach-Grosse, A., Yilmaz, E. ve diğeri. (2008) Pyrin, product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *Journal of cellular physiology*, 216 (3), 595-602.
45. Shoham, N.G., Centola, M., Mansfield, E., Hull, K.M., Wood, G., Wise, C.A. ve diğeri. (2003) Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (23), 13501-13506.
46. Cooper, K.M., Bennin, D.A., Huttenlocher, A. (2008) The PCH family member proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 targets to the leukocyte uropod and regulates directed cell migration. *Molecular biology of the cell*, 19 (8), 3180-3191.
47. Jeru, I., Papin, S., L'Hoste, S., Duquesnoy, P., Cazeneuve, C., Camonis, J. ve diğeri. (2005) Interaction of pyrin with 14.3.3 in an isoform-specific and phosphorylation-dependent manner regulates its translocation to the nucleus. *Arthritis and rheumatism*, 52 (6), 1848-1857.
48. Oner, A., Erdogan, O., Demircin, G., Bulbul, M., Memis, L. (2003) Efficacy of colchicine therapy in amyloid nephropathy of familial Mediterranean fever. *Pediatric nephrology*, 18 (6), 521-526.
49. Yang, H., Ganguly, A., Cabral, F. (2010) Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. *The Journal of biological chemistry*, 285 (42), 32242-32250.
50. Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S., Banerjee, M. (2008) Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal research reviews*, 28 (1), 155-183.
51. Nunez, J., Fellous, A., Francon, J., Lennon, A.M. (1979) Competitive inhibition of colchicine binding to tubulin by microtubule-associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (1), 86-90.
52. Ben-Chetrit, E., Levy, M. (1998) Does the lack of the P-glycoprotein efflux pump in neutrophils explain the efficacy of colchicine in familial Mediterranean fever and other inflammatory diseases? *Medical hypotheses*, 51 (5), 377-380.

53. Cerrato, L., Valeri, A., Bueren, J.A., Albella, B. (2009) In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. *Toxicology and applied pharmacology*, 238 (2), 111-119.
54. Li, J.J., Lee, S.H., Kim, D.K., Jin, R., Jung, D.S., Kwak, S.J. ve diğerleri. (2009) Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297 (1), F200-209.
55. Rigante, D., La Torraca, I., Avallone, L., Pugliese, A.L., Gaspari, S., Stabile, A. (2006) The pharmacologic basis of treatment with colchicine in children with familial Mediterranean fever. *European review for medical and pharmacological sciences*, 10 (4), 173-178.
56. Jaeger, A., Flesch, F., Sauder, P., Kopferschmitt, J. (1989) Colchine, 8.2 Therapeutic and toxic concentration. Erişim: 12 Haziran 2011, [http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/colchic.htm#SectionTitle: 8.2%20Therapeutic%20and%20toxic%20concentration](http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/colchic.htm#SectionTitle:8.2%20Therapeutic%20and%20toxic%20concentration)
57. Erten, S., Erten, S.F., Altunoglu, A. (2011) Successful treatment with anti-tumor necrosis factor (anti-TNF)-alpha of proteinuria in a patient with familial mediterranean fever (FMF) resistant to colchicine: anti-TNF drugs and FMF. *Rheumatology international*.
58. Alpay, N., Sumnu, A., Caliskan, Y., Yazici, H., Turkmen, A., Gul, A. (2010) Efficacy of anakinra treatment in a patient with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Rheumatology international*.
59. Kumar, V., Sharma, A. (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International immunopharmacology*, 10 (11), 1325-1334.
60. Choi, E.Y., Santoso, S., Chavakis, T. (2009) Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 14, 1596-1605.
61. Delves, P.J., Roitt, I.M. (2000) The immune system. First of two parts. *The New England journal of medicine*, 343 (1), 37-49.
62. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G. ve diğerleri. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302 (5651), 1704-1709.
63. Wang, F. (2009) The signaling mechanisms underlying cell polarity and chemotaxis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1 (4), a002980.
64. Pollard, T.D., Cooper, J.A. (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326 (5957), 1208-1212.

65. Yadav, S., Puri, S., Linstedt, A.D. (2009) A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Molecular biology of the cell*, 20 (6), 1728-1736.
66. Entschladen, F., Drell, T.L.t., Lang, K., Masur, K., Palm, D., Bastian, P. ve diğerleri. (2005) Analysis methods of human cell migration. *Experimental cell research*, 307 (2), 418-426.
67. Toetsch, S., Olwell, P., Prina-Mello, A., Volkov, Y. (2009) The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 1 (2), 170-181.
68. Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2 (2), 329-333.
69. Wang, F., Weaver, V.M., Petersen, O.W., Larabell, C.A., Dedhar, S., Briand, P. ve diğerleri. (1998) Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (25), 14821-14826.
70. Lauffenburger, D., Rothman, C., Zigmond, S.H. (1983) Measurement of leukocyte motility and chemotaxis parameters with a linear under-agarose migration assay. *Journal of immunology*, 131 (2), 940-947.
71. Vanderlinde, R.E. (1985) Measurement of total lactate dehydrogenase activity. *Annals of clinical and laboratory science*, 15 (1), 13-31.
72. Sarkadi, B., Szakás, G., Váradi, A. Multi-Drug Resistance in Cancer - Role of ABC Transporter Proteins. *Enzyme Explorer, Drug Metabolism Tech Review*, Erişim: 12 Haziran 2011, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/xenobiotics/drug-metabolism-tech-review.html>
73. Johnson, I. (2001). Cellular Function Probes. *Current Protocols in Cytometry*, Erişim: 12 Haziran 2011, <http://www.currentprotocols.com/protocol/cy0404>
74. Block, E.R., Matela, A.R., SundarRaj, N., Iszkula, E.R., Klarlund, J.K. (2004) Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints: role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 279 (23), 24307-24312.

75. Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B. ve diğeri. (2007) Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (41), 15988-15993.
76. Nikolic, D.L., Boettiger, A.N., Bar-Sagi, D., Carbeck, J.D., Shvartsman, S.Y. (2006) Role of boundary conditions in an experimental model of epithelial wound healing. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291 (1), C68-75.
77. Lokuta, M.A., Cooper, K.M., Aksentijevich, I., Kastner, D.L., Huttenlocher, A. (2005) Neutrophil chemotaxis in a patient with neonatal-onset multisystem inflammatory disease and Muckle-Wells syndrome. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 95 (4), 394-399.
78. Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K., Cheresch, D.A. (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *The Journal of cell biology*, 140 (4), 961-972.
79. Ben-Chetrit, E., Bergmann, S., Sood, R. (2006) Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology*, 45 (3), 274-282.
80. Tsai, M.A., Waugh, R.E., Keng, P.C. (1998) Passive mechanical behavior of human neutrophils: effects of colchicine and paclitaxel. *Biophysical journal*, 74 (6), 3282-3291.
81. Mamdouh, Z., Mikhailov, A., Muller, W.A. (2009) Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *The Journal of experimental medicine*, 206 (12), 2795-2808.
82. Mamdouh, Z., Kreitzer, G.E., Muller, W.A. (2008) Leukocyte transmigration requires kinesin-mediated microtubule-dependent membrane trafficking from the lateral border recycling compartment. *The Journal of experimental medicine*, 205 (4), 951-966.
83. Chia, E.W., Grainger, R., Harper, J.L. (2008) Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis: a rationale for use of low-dose colchicine. *British journal of pharmacology*, 153 (6), 1288-1295.
84. Yu, J.W., Fernandes-Alnemri, T., Datta, P., Wu, J., Juliana, C., Solorzano, L. ve diğeri. (2007) Pylrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Molecular cell*, 28 (2), 214-227.

85. Berkun, Y., Levy, R., Hurwitz, A., Meir-Harel, M., Lidar, M., Livneh, A. ve diğeri. (2011) The familial Mediterranean fever gene as a modifier of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 40 (5), 467-472.

EKLER

EK-1. Hücre Göçü Videoları

A. 2 boyutlu deneylerde COS-7 hücrelerinin insülin bulunmayan ortamdaki hareketlilikleri (10X). Bu videoda görülmekte olan COS-7 hücreleri kaplamasız bir zemin üzerinde insülin bulunmayan ortamda inkübe edilmektedirler. 5 dakikada bir görüntü alınarak 4 görüntü/saniye hızı ile video haline getirilmiştir. Videoda pek çok bölünme geçiren hücre göze çarpmaktayken hücrelerin belirgin şekilde yer değiştirmedeği gözlenmektedir.

B. 2 boyutlu deneylerde kaplamasız zemin üzerinde Whatmann kağıdından salınan insüline karşı COS-7 hücrelerinin cevabı (10x). 5 dakikada bir görüntü alınarak 4 görüntü/saniye hızı ile video haline getirilmiştir. Videoda pek çok bölünme geçiren hücre göze çarpmaktadır. Bunun yanında pek çok hücre uzantısının oluşum ve kaybolmasıyla beraber az miktarda yer değiştiren hücreler de göze çarpmaktadır.

C. 2 boyutlu deneylerde tip I kollajen kaplı zemin üzerinde Whatmann kağıdından salınan insüline karşı COS-7 hücrelerinin cevabı (10X). 5 dakikada bir görüntü alınarak 4 görüntü/saniye hızı ile video haline getirilmiştir. Videoda neredeyse hiç hücre hareketi göze çarpmamaktadır.

D. Yara iyileşmesi deney sisteminde COS-7 hücrelerinin yara içerisine göç hareketi (20X). 10 dakikada bir görüntü alınarak 2 görüntü/saniye hızı ile video haline getirilmiştir. Videoda COS-7 hücrelerinin çeşitli uzantılar uzatarak yarayı kapadıkları görülmektedir.

E. Yara iyileşmesi deney sisteminde HeLa hücrelerinin yara içerisine göç hareketi (10X). 5 dakikada bir görüntü alınarak 4 görüntü/saniye hızı ile video haline getirilmiştir. Videoda HeLa hücrelerinin çeşitli uzantılar uzatarak ve hücre bölünmeleriyle yarayı kapadıkları görülmektedir.

