



**BORİK ASİTİN NFKB SİNYALİ İLETİM YOLAĞINA
ETKİSİNİN NFKB-GFP BELİRTEÇ SİSTEMİ ENTEGRE
EDİLMİŞ TRANSGENİK HEK293 HÜCRE HATTI
KULLANILARAK ÇALIŞILMASI**

Feyza YILMAZ DÜNDAR

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi – 2022

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BORİK ASİTİN NFκB SİNYALİ İLETİM YOLAĞINA ETKİSİNİN
NFκB-GFP BELİRTEÇ SİSTEMİ ENTEGRE EDİLMİŞ TRANSGENİK
HEK293 HÜCRE HATTI KULLANILARAK ÇALIŞILMASI**

Feyza YILMAZ DÜNDAR

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet KOÇ**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2021-2387 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2022**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) Transkripsiyon Faktörleri	3
2.2. NF- κ B'nin Aktivasyonu	3
2.2.1. NF- κ B Protein Ailesi	4
2.2.2. NF- κ B'nin DNA'ya Bağlı Yapıları	6
2.3. İnhibitör- κ B (I κ B) Proteinleri.....	8
2.3.1. I κ B Proteinleri Ailesinin İncelenmesi.....	8
2.4. I κ B Kinaz (IKK) Kompleksi.....	12
2.4.1. IKK Kompleksini Oluşturan Proteinlerin Yapısal Analizi	12
2.5. Kanonik (Klasik) ve Kanonik Olmayan (Alternatif) Sinyal İletim Yolları	14
2.6. Borik Asit.....	16
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Metot.....	21
3.2.1. İnsan TNF- α ve Borik Asit Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	21
3.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	21
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	22
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması	22
3.2.5. Hücrelere TNF α 'nın Uygulanması	22
3.2.6. Hücrelere Borik Asit'in Uygulanması	23
3.2.7. Hücrelere TNF α ve Borik Asit'in Birlikte Uygulanması	23
3.2.8. Akış Sitometre Analizi.....	24
3.2.9. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. TNF α Uygulanmış HEK293 Hücrelerinin GFP Ekspresyon Analizi	25

4.2. Borik Asit Uygulanmış HEK293 Hücrelerinin GFP Ekspresyon Analizi	25
4.3. TNF α ve Borik Asit Birlikte Uygulanmış HEK293 Hücrelerinin GFP Ekspresyon Analizi	26
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR	38
EKLER.....	42
EK-1. Özgeçmiş.....	42
EK-2. Etik Kurul Kararı.....	43



TEŞEKKÜR

TYL-2021-2387 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Yüksek lisans tez çalışmam süresince derin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a, çalışmada kullandığımız hücre hattını bizlere temin eden Prof. Dr. Batu ERMAN'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle kıymetli katkılar sağlayan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın tüm saygıdeğer hocalarına,

Eğitim dönemimde, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik disipliniyle, duruşuyla örnek aldığım çok kıymetli hocam Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ceren ACAR'a ve o bünyedeki diğer tüm kıymetli hocalarıma,

Laboratuarda beraber çalıştığımız, deneyimin her aşamasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tüm sevgili çalışma arkadaşlarım Furkan ELMAS'a, Nefsun DANIŞ'a, Bahar KIZILASLAN'a, Melike ALP'e, İrem Nur MENEVŞE'ye, Nazmi ÖZGEN'e ve kıymetli ablam Öğr. Gör. Dr. Yağmur İNALKAÇ GEMİCİ'ye,

Tez çalışmam sırasında cihaz ölçümünde derin bilgisi ve güler yüzüyle kıymetli yardımları olan Halil İbrahim ÖZKAN'a, Göksel DEMİREL ve Ayşenur TURAN'a,

Her daim yanımda olan kıymetli arkadaşlarıma,

Bütün hayatım boyunca destekleri ve sonsuz sevgileri ile yanımda olan, en zor zamanlarımda bana inanılmaz bir güç veren, annem Ferah YILMAZ'a; babam Kadir YILMAZ'a; kardeşlerim Funda DEMİRCİOĞLU'na ve Rahmi Yusuf YILMAZ'a; ailemizin neşe kaynağı yiğenim Samet Eren DEMİRCİOĞLU'na varlıklarını ve karşılıksız sevgilerini hep hissettirdikleri için teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olup, her anıma mutluluk katan, hem çalışma hem hayat arkadaşım, biricik eşim Arş. Gör. Muhammed Dündar'a,

Çok teşekkür ederim...

Feyza YILMAZ DÜNDAR

ÖZET

Borik Asitin NF- κ B Sinyali İletim Yolağına Etkisinin NF- κ B-GFP Belirteç Sistemi Entegre Edilmiş Transgenic HEK293 Hücre Hattı Kullanılarak Çalışılması

Amaç: Araştırma, insan sağlığı üzerine birçok metabolik ve biyokimyasal etkisi olduğu bilinen borik asitin, inflamatuvar yanıtların anahtar düzenleyicisi olan NF- κ B yolağını regüle edebilme potansiyelini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada NF- κ B-GFP belirteç sistemi entegre edilmiş transgenic HEK293 hücreleri model olarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda, çalışma için uygun TNF α ve borik asit miktarları tespit edilmiştir. Ardından TNF α ile uyarılmış ve aktifleşmiş NF- κ B sinyal iletim yolağına, kontrol grubuna kıyasla borik asitin etkisi incelenmiştir. Borik asitin NF- κ B yolağını regüle edebilme kapasitesi akış sitometrik analizlerle belirlenmiştir. TNF α ve borik asit uygulanmış hücrelerin GFP yoğunluğunun ortalaması ve standart sapması, üç bağımsız biyolojik deneyden hesaplanmıştır. İstatistiksel testler için iki örneklem konum t-testi kullanılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada kullanılan HEK293 hücrelerinin genomuna entegre GFP kaseti bulunduğundan, akış sitometrik analizlerle kontrol grubunda bir miktar GFP ekspresyonu gözlemlenmiştir. Belirli dozlarda TNF α verildiğinde, hücrelerde kontrol grubuna kıyasla 6-8 kat daha yoğun GFP ekspresyonu belirlenirken ($p < 0.0001$), sadece borik asit uygulandığında, hücrelerde kontrol grubuna kıyasla eşit veya daha az yoğunlukta GFP ekspresyonu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). TNF α ve farklı dozlarda borik asit birlikte verildiğinde ise, TNF α grubuna kıyasla GFP yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$).

Sonuç: Analizler sonucunda, HEK293 hücrelerine tek başına borik asitin muamelesi kontrole kıyasla etkili bir fark oluşturmamışken, TNF α ile aktive edilen yolakta borik asit muamelesinin NF- κ B aktivasyonunu azaltıcı yönde etkisi olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: NF- κ B sinyal yolağı, NF- κ B-GFP, bor toksisitesi, enflamasyon

ABSTRACT

Study of the effect of boric acid on the NF κ B signal transduction pathway using the transgenic HEK293 cell line integrated with the NF κ B-GFP marker system

Aim: The research was carried out to determine the potential of boric acid, which is known to have many metabolic and biochemical effects on human health, to regulate the NF- κ B pathway, which is a key regulator of inflammatory responses.

Material and Method: In this study, transgenic HEK293 cells with integrated NF- κ B-GFP marker system were used as a model. In this direction, suitable amounts of TNF α and boric acid were determined for the study. Then, the effect of boric acid on TNF α stimulated and activated NF- κ B signal transduction pathway compared to the control group was investigated. The capacity of boric acid to regulate the NF- κ B pathway was determined by flow cytometric analysis. The mean and standard deviation of the GFP density of TNF α and boric acid-treated cells were calculated from three independent biological experiments. Two-sample position t-test was used for statistical tests.

Results: Since the HEK293 cells used in this study had a GFP cassette integrated into their genome, some GFP expression was observed in the control group by flow cytometric analysis. When given specific doses of TNF α , 6-8 times more intense GFP expression was determined in the cells compared to the control group ($p < 0.0001$), while when only boric acid was applied, equal or less intense GFP expression was observed in the cells compared to the control group ($p < 0.05$). When TNF α and different doses of boric acid were given together, it was observed that the GFP density decreased compared to the TNF α group ($p < 0.05$).

Conclusion: As a result of the analysis, it was revealed that boric acid treatment in HEK293 cells alone did not make an effective difference compared to the control, while boric acid treatment had a decreasing effect on NF- κ B activation in the pathway activated by TNF α .

Key Words: NF κ B signaling pathway, NF- κ B-GFP, boron toxicity, inflammation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece (santigrad)
µl	: mikrolitre
ANK	: ankirin tekrarları bölgesi
ARD	: Ankirin tekrar alanı
BAFF	: B hücrelerini aktifleştiren faktör
BCR	: B hücresi reseptörü
CC	: Süper sarmal
CD40L	: CD40 ligandı
CTD	: Karboksi-terminal bölgesi
DD	: Dimerizasyon bölgesi
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
FBS	: Fötal sıgır serumu
FSC	: İleri saçılma
GFP	: Yeşil floresan protein
HLH	: Sarmal-ilmek-sarmal
HEK293	: İnsan embriyonik böbrek 293
IKK	: IκB kinaz
IL	: İnterlökin
IL-1R	: İnterlökin 1 reseptörü
IκB	: NF-κB inhibitörü
kDa	: Kilodalton
LPS	: Lipopolisakkarit
LTβR	: Lenfotoksin β reseptör
LZ	: Lösün fermuarı motifi
NEMO	: NF-κB esansiyel modülatörü

NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
NIK	: NF-κB'yi indükleyen kinaz
NLS	: Nükleer lokalizasyon dizisi
NTD	: Amino-terminal bölgesi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PEST	: P, prolin; E, glutamik asit; S, serin; T, treonin
PRR	: Patern tanıma reseptörü
RANK	: Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligandı
REL-C	: Karboksi-terminal alanı
REL-N	: Amino-terminal alanı
RHD	: Rel-homoloji bölgesi
SRD	: Sinyal alıcı alan
SSC	: Yan saçılma
TAD	: Transkripsiyonal aktivasyon bölgesi
TCR	: T hücresi reseptörü
TLR	: Toll-benzeri reseptör
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFα	: Tümör nekroz faktörü alfa
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptör
ZF	: Çinko parmak

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No.	Sayfa No.
Şekil 2.1. NF-κB'yi aktive eden bazı faktörler.	3
Şekil 2.2. NF-κB alt birimlerinin genel yapısı.....	5
Şekil 2.3. NF-κB proteinlerinin homo- ve heterodimer formları.	6
Şekil 2.4. DNA'ya bağlı p50/p65 hetero-kompleksinin kristal yapısının şerit diyagram modeli ile iki yönlü gösterimi.	7
Şekil 2.5. IκB proteinlerinin genel yapısı.	9
Şekil 2.6. IκBa'ya bağlı p50/p65 hetero-kompleksinin kristal yapısının şerit diyagram modeli. p65'in NLS'si kırmızı ile gösterilmiştir.	10
Şekil 2.7. IKK kompleksinin genel yapısı.	13
Şekil 2.8. NEMO dimerinin boşluk-doldurma modeli ile gösterimi.	13
Şekil 2.9. Kanonik ve alternatif NF-κB sinyal yolları.	15
Şekil 2.10. Borik asitin yapısı.....	17
Şekil 3.1. Iş akış planı.....	19
Şekil 3.2. HEK293 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).....	20
Şekil 3.3. Ölçüm yapılan akış sitometri cihazı	24
Şekil 4.1. Borik asit, TNFα, ve TNFα + borik asit uygulamalarının GFP yoğunluk grafîği	28
Şekil 4.2. HEK293 hücrelerinde 10 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.	29
Şekil 4.3. HEK293 hücrelerinde 25 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.	30
Şekil 4.4. HEK293 hücrelerinde 75 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.	31
Şekil 4.5. HEK293 hücrelerinde 175 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.	32
Şekil 4.6. HEK293 hücrelerinde 225 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.	33

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No.	Sayfa No.
Tablo 3.1. Kimyasal Listesi	20
Tablo 3.2. Deney cihazları listesi	21
Tablo 4.1. HEK293 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda TNF α uygulaması sonrası GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri ve Kat Yoğunluk Değerleri	25
Tablo 4.2. HEK293 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulaması sonrası GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri ve Kat Yoğunluk Değerleri	26
Tablo 4.3. HEK293 hücrelerinde, 10 ng/ml TNF α + farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulaması sonrası GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri, Kat Yoğunluk ve p Değerleri	27

1. GİRİŞ

Transkripsiyon faktörü olan NF- κ B proteini, hücrenin enflamatuvar ve immün tepkileri, hücre büyümesi ve gelişimi gibi bir dizi işlemde yer alan çok çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler (1). Normalde inaktif durumda olan NF- κ B'nin aktivasyonu hücre dışı uyaranlar tarafından başlatılır (2). Nükleer faktör- κ B protein kompleksi beş farklı alt proteinden (RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (p105 prekürsör) ve p52 (p100 prekürsör) oluşmaktadır. Bu proteinler sayesinde DNA'ya bağlanabilmekte ve hücre içi inhibitörü olan I κ B ile etkileşimini sağlayabilmektedir (3).

NF- κ B bütün hücrelerde bulunur ve normal şartlarda inhibitör I κ B (NF κ B inhibitörü) proteini tarafından sitozolde tutulur (4). Fizyolojik olarak I κ B proteinleri, NF- κ B aktivitesinin inhibitörleri ve düzenleyicileri olarak hizmet eder ve klasik I κ B proteinleri (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ), NF- κ B öncü proteinler (p100 ve p105) ve nükleer I κ B (I κ B ζ , Bcl-3 ve I κ BNS) üyelerinden oluşmaktadır (2). RelA (p65), RelB ve c-Rel, hedef gen ekspresyonunu etkinleştirmelerine izin veren bir C-terminal transaktivasyon alanı (TAD) içerir ve p50 (p105 öncüsü), p52 (p100 öncüsü), TAD alanı yerine C terminallerinde uzun, ankirin tekrar içeren bir alan (ARD) içerir ve bu nedenle bir homodimer olarak hedef gen ekspresyonunu etkinleştiremez (2). Bugüne kadar, DNA'ya bağlanan NF- κ B dimerlerinin birçok yapısı çözülmüş ve ortak bir DNA bağlanma ve dimerizasyon modu ortaya çıkarılmıştır (2).

Öte yandan NF- κ B'nin aktivasyonu hücre içi büyüme faktörleri, oksidatif stres, patojenler, proinflamatuvar sitokinler, yaralanmalar, çevresel stres koşulları gibi pek çok farklı etken ile gerçekleşmektedir (2, 3). Bu uyaranlar, toll benzeri reseptörler gibi doğuştan gelen immün reseptörler ve TNF (tümör nekroz faktörü) reseptör süper ailesindekiler gibi sitokin reseptörleri tarafından tanınır ve adaptör sinyalleme proteinlerinin bir sinyalleme kaskadını başlattığı hücreye iletilir (1, 5). Bu sinyalleme basamakları, I κ B kinazın (IKK) aktivasyonu ile sonuçlanır (2). Sinyalin alınması ile hücre içi inhibitörü olan I κ B fosforile edilerek parçalanır ve serbest kalarak aktifleşen NF- κ B molekülü sitoplazmadan çekirdeğe taşınır (3). Çekirdeğe taşınan NF- κ B proteini hedefi olan genlerin transkripsiyonunu uyarır (3).

NF- κ B proteinlerinin aktivasyonu sıkı bir şekilde düzenlenir ve NF- κ B sinyal yollarının uygun olmayan aktivasyonu, otoimmünite, kronik inflamasyon ve çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir (2).

En zengin kaynakları Türkiye’de bulunan bor mineralinin, insan sağlığı üzerine birçok metabolik ve biyokimyasal etkisi olduğu bilinmektedir (6, 7). Biyolojik ortamlarda borik asit formunda bulunan bor, bitkiler için gerekli bir mikro besindir ve hayvan büyümesi ve gelişimi için de oldukça faydalı etkileri vardır (6, 8). Bor topraktan bitkilere, bitkilerden de beslenme yoluyla insanlara geçmektedir (7). Bor, düşük konsantrasyonlarda biyolojik sistemler üzerinde geniş bir yelpazede fizyolojik etkilere sahipken, yüksek konsantrasyonlarda toksiktir (8). Borun biyolojik etkileri ve toksisitesi üzerine birçok çalışma olmasına rağmen, etki mekanizmalarını anlamak için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır (6, 8). Borun toksik etkisini, genel amino asit kontrol sisteminin aktivasyonu ve protein sentezini inhibe ederek gösterdiğini varsayarak genel amino asit kontrol yolu ökaryotlar arasında korunduğu için, bu mekanizmanın genel bir öneme sahip olabileceği düşünülmektedir (6).

Borik asitin oluşturduğu hücresel stres cevapları ya da biyolojik etki mekanizmalarının karakterize edilmesi gerekmektedir. Bu alışma kapsamında HEK293 hücreleri model olarak kullanılarak borik asitin NF- B yolağını regüle edebilme kapasitesi araştırılmak istenmektedir. Kullanılacak hücre hattında NF- B transkripsiyon faktörünün bağlanacağı bir prom tor bölgesi kontrolünde bulunan yeşil floresan protein (GFP) ifadelenme kaseti genoma entegre edilmiş şekilde bulunmaktadır. Bu modelde NF- B yi aktive eden herhangi bir uygulama hücrelerin içerisinde yeşil floresan proteinin oluşumuna neden olacaktır ve bu durumda floresan deteksiyonu akış sitometre sayesinde tespit edilecektir. TNF ile aktive edilen yolakta borik asit muamelesinin etkisi araştırılacaktır. Ayrıca, tek başına borik asit uygulamalarının etkileri de araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

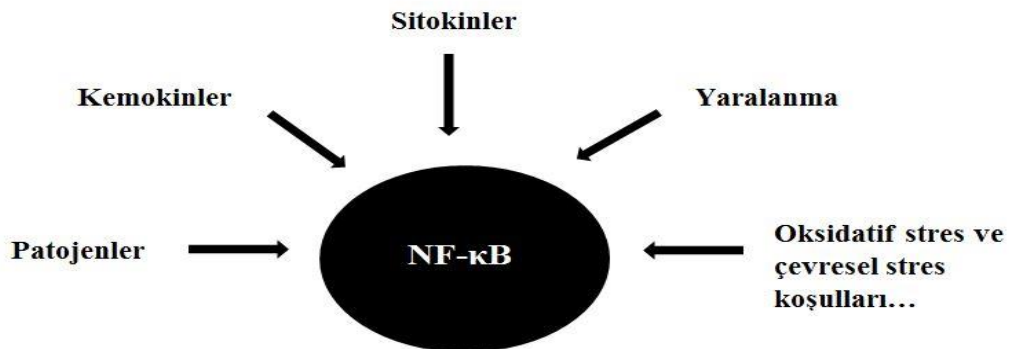
2.1. Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) Transkripsiyon Faktörleri

NF- κ B (nükleer faktör kappa B) ailesi transkripsiyon faktörleri, 1986'da Nobel ödüllü David Baltimore'un laboratuvarında keşfedildi (1, 9). Bu nükleer faktör, antikor üreten olgun B lenfositlerinin çekirdeklerinde, immünoglobulin-kappa hafif zincire ait genin geliştiricisi içinde bulunan, on baz çiftli bir DNA dizisi (5'-GGGACTTTCC-3)'ne bağlanır (2, 10). NF- κ B kısaltması bu şekilde oluşturulmuştur.

Kısa bir süre sonra, bu spesifik DNA bağlama aktivitesini barındıran proteinlerin, hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese edildiği ve çok çeşitli işlevlerle birçok hedef geni düzenlediği anlaşıldı (11, 12). Evrimsel olarak korunan bu transkripsiyon faktörleri, prototip bir proinflamatuvar sinyal yolu olarak, immün ve inflamatuvar yanıtların farklı süreçlerinde yer alan çok çeşitli genleri düzenler (13, 14). Ayrıca hücre büyümesi ve gelişimi gibi bir dizi süreçte yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunda görev alır (5, 15).

2.2. NF- κ B'nin Aktivasyonu

İndüklenebilir transkripsiyon faktörü NF- κ B, çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive edilir (16, 17). NF- κ B'nin aktivasyonu, sitokinler, kemokinler, patojenler, yaralanmalar, oksidatif stres ve çevresel stres koşulları gibi pek çok farklı etken ile gerçekleşmektedir (3, 16). NF- κ B'nin en iyi karakterize edilmiş indükleyicileri arasında TNF sitokin ailesinin üyeleri yer alır (özellikle TNF α) (17). Bu sitokinler, öncelikle NF- κ B yolunun aktivasyonu yoluyla inflamasyonu, hücre hayatta kalmasını, proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenleyen genlerin hızlı transkripsiyonunu indükler (12, 17).



Şekil 2.1. NF- κ B'yi aktive eden bazı faktörler.

Öte yandan NF- κ B normal hücrelerde nadiren aktiftir, sadece uygun uyaranlardan sonra aktive olur ve hedef genlerinin transkripsiyonunu yukarı regüle eder (3, 4). Daha sonra, düzenleyici mekanizmalar NF- κ B'yi inaktif durumuna döndürür (18). NF- κ B aktivasyonu bu nedenle indüklenabilir ve geçici bir süreçtir (18).

NF- κ B, I κ B (NF- κ B inhibitörü) proteinleri ile etkileşimler yoluyla düzenlenir (1, 19). Bu nedenle, uyarılmamış hücrelerde NF- κ B, inhibitör bir protein olan I κ B'ye bağlanır ve sitoplazmada inaktif durumda tutulur (20, 21). I κ B'ye bağlanma, NF- κ B'nin nükleer lokalizasyon sinyalini (NLS) maskeler, sitoplazmada NF- κ B-I κ B kompleksini oluşturur ve NF- κ B'nin DNA'ya bağlanmasını önler (2).

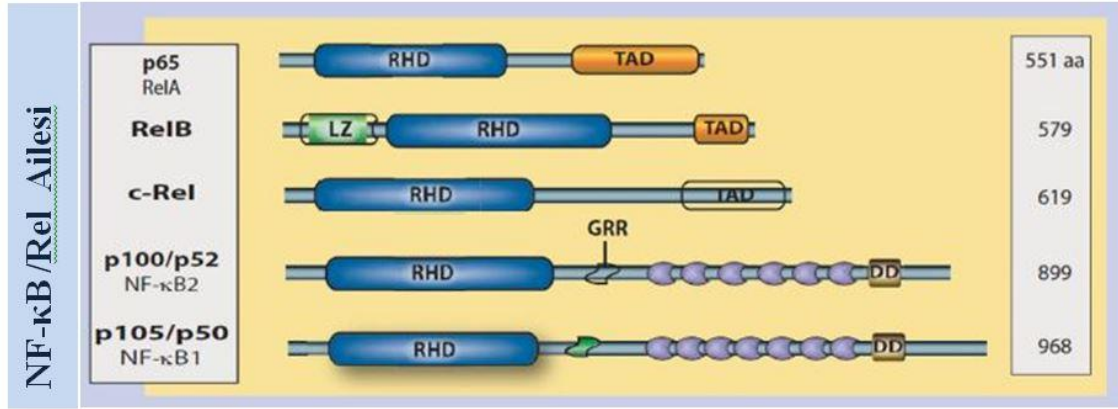
NF- κ B sinyalinin aktivasyonu, hücre dışı indükleyici uyaranlar tarafından başlatılır (2). İndükleyici uyarı, I κ B proteinlerinin fosforilasyonuna ve bozulmasına yol açan IKK (I κ B kinaz)'nın aktivasyonu ile sonuçlanır (22, 23). Aktif IKK, sitoplazmada NF- κ B-I κ B kompleksinin inhibitör I κ B alt birimini fosforile eder. Bu fosforilasyon, proteazom tarafından parçalanması için I κ B'yi işaretler ve serbest kalarak aktifleşen NF- κ B proteinleri daha sonra sitoplazmadan ayrılarak hedef dizilerine bağlandıkları ve gen transkripsiyonunu aktive ettikleri çekirdeğe taşınır (12, 24). Çekirdeğe taşınan NF- κ B proteini hedefi olan genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için promotör DNA'ya spesifik olarak bağlanır (3, 22). Bu üç molekül (NF- κ B dimerleri, I κ B düzenleyicileri ve IKK kompleksleri) birlikte NF- κ B sinyal modülünü oluşturur (22).

κ B dizisinin dejenere doğası ve NF- κ B'nin diğer transkripsiyon faktörleriyle heterotipik kompleksler oluşturma yeteneği, NF- κ B'nin çok çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemesine izin verir (17). NF- κ B proteinlerinin aktivasyonu sıkı bir şekilde düzenlenir ve NF- κ B sinyal yollarının uygunsuz aktivasyonu otoimmün hastalıkların kronik inflamasyonu ile ilişkilendirilmiştir (25, 26).

2.2.1. NF- κ B Protein Ailesi

Her yerde eksprese edilen NF- κ B proteini, şu anda bilinen beş proteinin bulunduğu Rel transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler, NF- κ B1 (p50 ve öncüsü p105), NF- κ B2 (p52 ve öncüsü p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel'den oluşmaktadır (1, 21). Bu proteinler sayesinde DNA'ya bağlanabilmekte ve hücre içi inhibitörü olan I κ B ile etkileşimini sağlayabilmektedir (3). RelA (p65), c-Rel ve RelB proteinleri, olgun ürünler olarak sentezlenir ve proteolitik işlem gerektirmez (24). Diğer aile üyelerinin aksine, NF- κ B1 ve NF- κ B2 pro-formlar (p105 ve p100) olarak

sentezlenir ve daha sonra proteozomlar tarafından proteolitik olarak p50 ve p52'ye işlenir (14, 27).

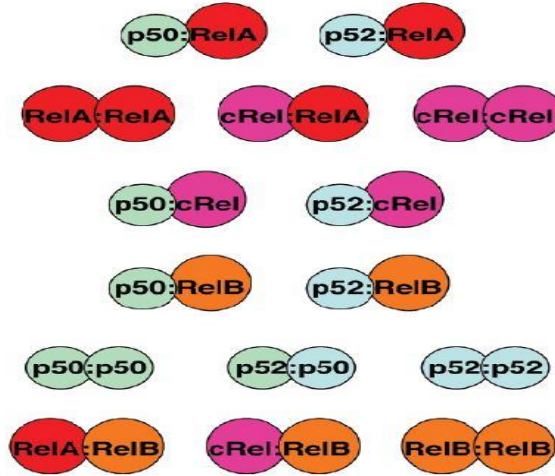


Şekil 2.2. NF-κB alt birimlerinin genel yapısı.

Olgun formda sentezlenen RelA, c-Rel ve RelB, hedef genlerin ekspresyonunu pozitif olarak düzenleyen bir C-terminal transaktivasyon alanı (TAD) içerir ve bu alan hedef gen ekspresyonunu aktive etmelerini sağlar (2, 28). Hem p50 hem de p52, DNA bağlanma alanını içerir fakat güçlü transaktivasyon alanlarından yoksundurlar (4, 23). Ancak, bu proteinlerin karboksiterminal uçları glisin açısından zengin bölgelere sahiptir ve uzun, ankirin tekrar alanı (ARD) içerirler (1, 22). p50 ve p52 proteinleri, bir TAD alanı içeren NF-κB ailesi üyesi veya koaktivatör alımı yapabilen diğer proteinlerle ilişkilendirilmedikçe hedef gen ekspresyonunu aktive edemezler (1, 18). Ek olarak, bu proteinler IκB proteinleri olarak işlev görerek transkripsiyonu baskılayabilirler (29, 30). Bu nedenle, NF-κB dimerleri, bir dimerdeki üyelerin trans-aktif edici alan içerip içermediğine bağlı olarak, κB bölgelerinde transkripsiyonel aktive ediciler veya baskılayıcılar olarak hareket edebilirler (21, 23, 31).

Çeşitli NF-κB alt birimleri arasındaki homo- ve heterotipik etkileşimler, farklı DNA bağlama özgüllükleri ve transaktivasyon potansiyeli olan kompleksler üretir (20, 22). DNA bağlanma bölgelerine yönelik bu özgünlük nedeniyle, dimerler, hedef promotörlerle farklı protein-protein etkileşimlerine sahiptir ve belirli fizyolojik koşullar altında aktive edilir (30). Teoride, beş NF-κB alt biriminin hücre içi değişen işlevlere sahip kombinatorial dimerizasyonundan toplam 15 benzersiz homo ve heterodimer oluşması mümkündür (11, 22). Bunlardan 12'si in vivo olarak tanımlanmıştır (22). Var olduğu bilinmeyen üç tanesi RelB:RelB, RelB:c-Rel ve p52:c-Rel'dir (22). Bununla birlikte, bu üçünden yalnızca RelB homodimeri in vivo mevcut değildir ve diğer iki

dimerin durumu belirsizdir; p65/RelA:RelB heterodimer gibi özel koşullar altında var olabilirler (22).



Şekil 2.3. NF-κB proteinlerinin homo- ve heterodimer formları.

p65, C-terminal ucundaki transaktivasyon alanlarının mevcudiyeti nedeniyle kB bölgelerinden gen ekspresyonunun güçlü bir aktivatörüdür (1). Bu nedenle, NF-κB ailesinin en yaygın aktif formu, p50/p65 veya p52/p65 alt birimleri arasında oluşan heterodimerlerdir (32, 33). Genel olarak, p50 ve p52'nin sıklıkla RelA, c-Rel veya RelB ile heterodimerler oluşturarak aktif transkripsiyonu tetiklediği, p50/p50 ve p52/p52 homodimerlerinin ise transkripsiyonel baskılayıcılar olarak hareket ettiği düşünülmektedir (28, 34).

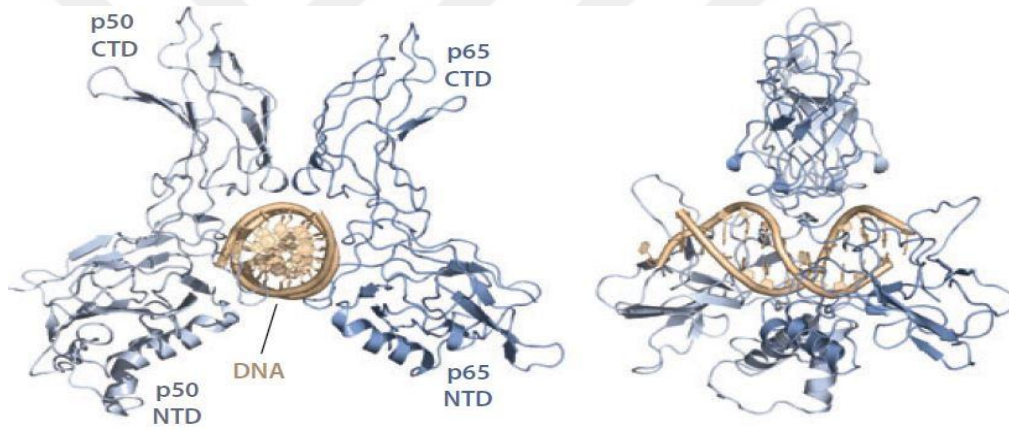
Rel homoloji bölgesi (RHD) için tahmin edilen bir lösün fermuar motifi (LZ) amino terminali içeren RelB, daha büyük bir düzenleyici esneklik sergileyip ve hem etkinleştirici hem de baskılayıcı olabilir (22, 34). Örneğin, bu protein kendisi ile homodimerize olmaz, fakat p52 veya p50 ile komplekslendiğinde transkripsiyonel aktivite sağlayabilir (4, 34). Bazı durumlarda da RelB, DNA'yı bağlayamayan RelA/RelB heterodimerleri oluşturarak ve RelA'yı sekestre ederek NF-κB aktivitesini bastırır (4). RelB'ye benzer şekilde c-Rel, lenfoid dokularda eksprese edilir ve hem c-Rel homodimerleri hem de c-Rel/p50 heterodimerleri baskın olarak hematopoietik hücrelerde saptanır (4).

2.2.2. NF-κB'nin DNA'ya Bağlı Yapıları

NF-κB transkripsiyon faktörleri ailesi, çok sayıda genin promotörleri ve geliştiricileri içinde yer alan 10-baz çiftli palindromik bir DNA dizisine bağlanır ve

transkripsiyonu indükler veya baskılar (21, 23, 31, 34). Bu dizi ilk olarak olgun B hücrelerinde immünoglobulin κ -hafif zincir geninin enhansırı olarak ifade edilmiştir (2).

Bu protein ailesinin beş üyesinin tümü homo- veya heterodimerler oluşturur ve aynı kökenli DNA elemanlarına bağlanma için gerekli olan nükleer lokalizasyon dizisini içeren 300 amino asitlik bir N-terminal Rel-homoloji alanını paylaşır (11,32). İki immünoglobulin benzeri tekrardan oluşan bu alan, yüksek oranda korunmuş bir DNA bağlama ve dimerizasyon alanını içerir (1, 24). Bu alan sayesinde hedef DNA'yı bağlayabilir ve farklı hedef genleri indükleyebilirler (14). Dimerizasyonun yanı sıra, bu RHD nükleer lokalizasyondan ve I κ B proteinleri ile etkileşimden sorumludur (22). Rel-homoloji bölgesinin ilk yapısı, idealize edilmiş bir κ B hedef DNA dizisine bağlı bir p50 homodimerinin, iki X-ışını kristal yapısının başarılı bir şekilde belirlenmesiyle ortaya çıkarılmıştır (2).



Şekil 2.4. DNA'ya bağlı p50/p65 hetero-kompleksinin kristal yapısının şerit diyagram modeli ile iki yönlü gösterimi.

Bugüne kadar, DNA'ya bağlı NF- κ B dimerlerinin birkaç yapısı çözülmüştür (2). Dimerdeki her bir p50 alt biriminden RHD'nin tamamının çift sarmallı DNA'nın ana oluğu boyunca bir tam dönüşle temasa dahil olduğu yeni bir DNA bağlama motifi ortaya çıkarılmıştır (2, 22). Bu yapılar, silindirik bir DNA gövdesi (vücut) etrafında kanatları oluşturan iki protein alt birimi ile bir kelebeğe benzer (22). NF- κ B alt biriminin RHD alanı, p50:DNA kompleks yapıları tarafından açığa çıkarıldığı gibi, kısa bir esnek bağlayıcı tarafından bağlanmış N-terminal alanı (NTD) ve C-terminal alanı (CTD) olmak üzere iki β -sandviç yapıya katlanmış alandan oluşur (2, 22).

CTD, yalnızca dimerizasyondan sorumludur ve DNA ile fosfat teması kurar (2). DNA'nın şeker fosfat omurgası ile spesifik olmayan temaslarına ek olarak NTD, DNA

bazları ile spesifik etkileşim yoluyla hedef DNA sekansını da tanır (2, 22). Amino-terminal alanı (veya Rel-N) yaklaşık 160-210 amino asit uzunluğundadır ve immünoglobulin katının bir varyantını sergiler (22). Karboksi-terminal dimerizasyon alanı (Rel-C olarak adlandırılır) kabaca 100 amino asidi kapsar ve ayrıca immünoglobulin benzeri bir kıvrımı benimser (22). İki alan, yaklaşık 10 amino asit uzunluğunda kısa bir esnek bağlayıcı ile birleştirilir (22). Nükleer lokalizasyon sinyalinin gömülü olduğu karboksi-terminal (CTD) esnek bölgesi, NF- κ B alt birimlerinin korunmuş RHD bölümünü sonlandırır (22). NF- κ B, hedef DNA'yı çevrelemek için her iki RHD alanını da kullanır (2, 22). Mevcut yapıların analizi, NF- κ B homo- ve heterodimerlerinin hedef dizisinde plastisite göstermiştir (2).

2.3. İnhibitör- κ B (I κ B) Proteinleri

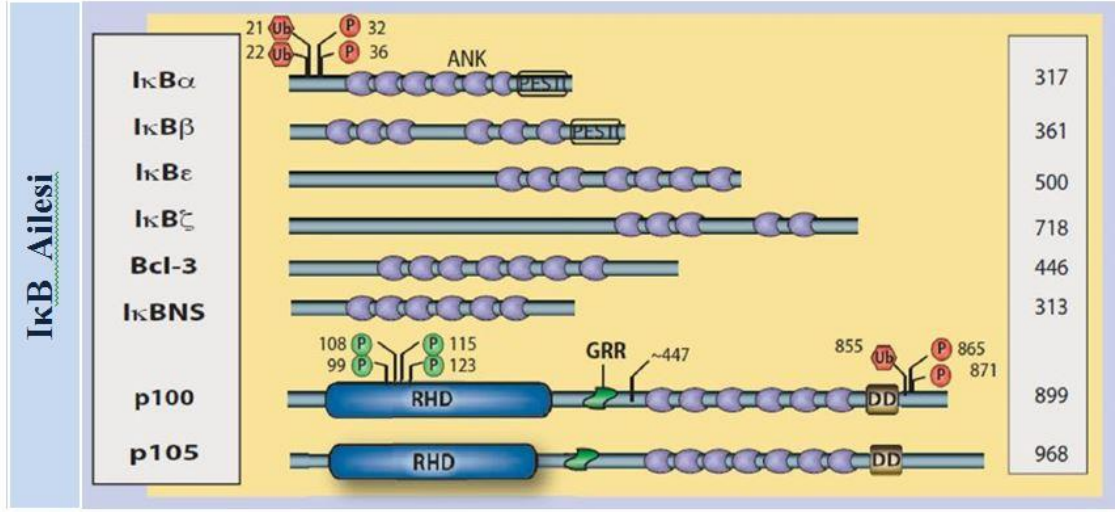
İnhibitör κ B (Nükleer I κ B) ailesinin proteinleri, NF- κ B aktivitesinin düzenleyicileri olarak hizmet eder (2, 22). "Nükleer I κ B" olarak sınıflandırılmaları, ankirin tekrarları içermeleri, NF- κ B alt birimlerini bağlamaları ve hücrelerde ifade edildiğinde çekirdek içinde konsantre olmaları gerçeğinden kaynaklanmaktadır (22). I κ B proteininin işlevi oldukça değişkendir (17). I κ B ailesi üyeleri, sitoplazma ve çekirdekte NF- κ B dimerlerini bağlayabilir ve transkripsiyonel tepkileri hem inhibe edebilir hem de artırabilir (2, 17). NF- κ B dimerleri, uyarılmamış çoğu hücre tipinde, RHD'ye bağlanan ve onun NLS işlevine müdahale eden spesifik inhibitörler olan I κ B'ler tarafından sitoplazmada tutulur (15, 34). Bu nedenle, bu proteinler transkripsiyonel olarak inaktif kalırlar ve hedef DNA bölgelerine bağlanmaları engellenir (4, 28).

2.3.1. I κ B Proteinleri Ailesinin İncelenmesi

Bugüne kadar, memeli hücrelerinde tanımlanmış sekiz bilinen I κ B proteini vardır (29). Bu proteinler üç sınıfta toplanmıştır (29). I κ B ailesinin bu üyeleri, klasik I κ B proteinleri (I κ B α , I κ B β ve I κ B ϵ), NF- κ B öncü proteinleri (p100 ve p105) ve nükleer I κ B (I κ B ζ , Bcl-3 ve I κ BNS)'lerdir (1,4). I κ B ailesinin proteinlerinin tümü, NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma alanları olan RHD ile birleşerek onları transkripsiyonel olarak inaktif hale getiren 6-7 ankirin tekrarlarının varlığı ile karakterize edilir (14, 18).

Üç nükleer I κ B proteininin her biri, NF- κ B'ye bağımlı genlerin ürünleridir ve içsel nükleer lokalizasyon eğilimine sahiptir (22). Bunlar NF- κ B'ye bağlanırlar, ancak klasik I κ B proteinleri en az bir RelA veya c-Rel alt birimine sahip dimerleri tercih

ederken veya klasik olmayan p105 ve p100 tüm NF- κ B alt birimlerine bağlanırken, nükleer I κ B'ler spesifik olarak p50 (Bcl-3, I κ B ζ) ve p52'ye (Bcl-3) bağlanır (4, 22).



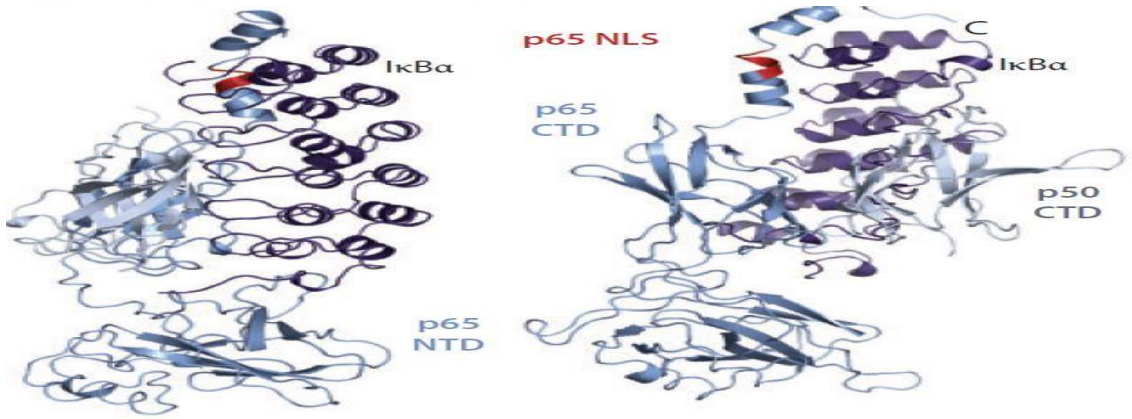
Şekil 2.5. I κ B proteinlerinin genel yapısı.

Farklı I κ B molekülleri, farklı ve örtüşen özgülöklere sahiptir (32). I κ B ϵ , endotel hücrelerinde, p65 ile ve daha az ölçüde c-Rel ile ilişkilidir, oysa I κ B α ve I κ B β , p65 ile birleşir, ancak c-Rel ile ilişkilendirilmez (32). p50:RelA dimer uyarılmamış hücrelerde bulunur, ancak DNA bağlama aktivitesi I κ B tarafından inhibe edilir (35).

I κ B proteinleri, bir N-terminal sinyal alıcı alan (SRD), bir merkezi ARD ve bir C-terminal uçlarında prolin-, glutamat-, serin- ve treonin bakımından zengin kısa bir dizi (PEST) sekansı içerir (2, 22). Tüm I κ B'ler, ARD'leri aracılığıyla NF- κ B'yi tanıır (2). I κ B ARD'nin yapısı, her biri bir β -döngüsü ve iki α -heliksi içeren altı ankirin tekrarı içerir (2). PEST bölgesi ise, I κ B gibi hücrelerde hızlı dönüşüm sergileyen birçok protein için ortaktır (22). Bununla birlikte, I κ B α 'nın PEST bölgesi, önceden oluşturulmuş NF- κ B:DNA komplekslerini bozma yeteneği için de gereklidir (22).

Daha önce de bahsedildiği gibi, klasik I κ B proteinleri, bir amino-terminal sinyal yanıt bölgesi ve karboksi terminal PEST bölgesi ile çevrili ankirin tekrarlarına sahiptir (22). I κ B'ye bağlı NF- κ B heterodimer kompleksi p50·p65·I κ B α 'nın yapısını inceleyecek olursak, 1. ve 2. ankirin tekrarlar p65'in NLS' sini bağlar; 4. ve 6. ankirin tekrarlar eşleşmiş dimerizasyon alanlarının arayüzünde kontak p50'yi tekrar eder; ve son olarak 5. ve 6. ankirin tekrarlar p65'in dimerizasyon alanına temas eder (2). Böylece I κ B'ler, NF- κ B dimerlerin NLS'lerinin işlevini sterik olarak bloke ederek, sitoplazmik tutulmalarına neden olur (19).

Bugüne kadar en iyi çalışılmış ve en önemli IκB ailesi üyesi IκBα'dır (13, 23). IκBα ilk olarak önceden oluşturulmuş NF-κB·DNA komplekslerini in vitro olarak ayrıştıran bir faktör olarak keşfedildi (2). IκBα'nın amino-terminal bölgesi ayrıca işlevsel bir nükleer dışı aktarma dizisi içerir (22). NF-κB'ye bağlanırken maskelenmez ve NF-κB:IκBα komplekslerinin gözlenen sitoplazmik lokalizasyonuna katkıda bulunur (22). IκBα, p50-p65 heterodimerine ve p50 homodimerine bağlanır, ancak p50 homodimerinin DNA bağlama aktivitesini inhibe etmez (32). Bu IκBα proteini, geçici NF-κB aktivasyonu ile ilişkiliyken, IκBβ sürekli aktivasyonla ilişkilidir (32). IκBβ, p50-p65'i, p50-RelB ve p50-c-Rel komplekslerini engellediğinden daha güçlü bir şekilde inhibe eder (32).



Şekil 2.6. IκBα'ya bağlı p50/p65 hetero-kompleksinin kristal yapısının şerit diyagram modeli. p65'in NLS'si kırmızı ile gösterilmiştir.

İlk modeller, IκB proteinlerinin NF-κB dimerlerinin nükleer translokasyonunu da engellediğini öne sürerken, IκBα ve IκBε'ye bağlı dimerlerin aktif olarak nükleer ve sitoplazmik bölmeler arasında gidip geldiği açık hale geldi (35). p100 ve p105'in daha büyük kompleksler halinde birleştirilmesine, ankirin-tekrar alanlarına hemen amino-terminal olarak yerleştirilmiş bir oligomerizasyon alanı aracılık eder (22). Bu birleşim heterojendir, yani birkaç farklı NF-κB alt birimi, tek bir inhibitör kompleks içinde inhibe edilebilir (22). Bu nedenle, p100 veya p105'in uyarana özgü bozunması, prensipte farklı NF-κB dimerlerini serbest bırakabilir (22). Birlikte, bu dimerler çok daha geniş bir gen düzenleyici aktivite yelpazesi sergiler (22).

Bununla birlikte, IκB/NF-κB kompleksinin ayrışma ve yeniden birleşme süreçlerine tabi olduğu göz önüne alındığında, sitozol ve çekirdek arasında sürekli bir mekik oluşturduğu bilinmektedir (20, 27).

IkB ζ ilk olarak bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) veya inflamatuvar sitokin interlökin-1 (IL-1) ile bağışıklık hücrelerinin uyarılmasından sonra artan ekspresyon sergileyen bir gen ekranında keşfedildi (22, 30). Ikb ζ proteini, Bcl-3'e diğer Ikb'lerden daha fazla homoloji sergileyen Ikb'dir (30). Klasik Ikb'lerin aksine, Ikb ζ ne yapısal olarak eksprese edilir ne de indüklenabilir bozunma tarafından kontrol edilir, ancak mikroRNA tarafından transkripsiyon sonrası olarak düzenlenebilir (30). Ikb ζ , tercihen p50 NF- κ B dimerlerine bağlanan TLR ligandları ile mücadeleye yanıt olarak IL-6 üretimine bağlanmıştır (30).

IkB ailesinin ilginç bir üyesi de, transkripsiyonu desteklemek için belirli NF- κ B alt birimleri ile etkileşimler yoluyla işlev gören Bcl-3'tür (36). Bcl-3, klasik olmayan Ikb ailesine ait ilk klonlanmış proteindir ve sitoplazma yerine çekirdekte işlev görür (22, 34). Bcl-3, TAD alanından yoksun p50 ve p52 alt birimini içeren heterodimerlere spesifik olarak bağlanan NF- κ B aktivitesinin bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır (30). p50 ve p52'nin aksine, Bcl-3 ayırt edici bir TAD bölgesi oluşturur (18, 27). Bcl-3'ün p50 veya p52'ye bağlanması, komplekse transkripsiyonel aktivite sağlar (4, 34). Öte yandan Bcl-3, hedef genlerin κ B bölgesindeki p50 homodimerlerini stabilize ederek bir baskılayıcı olarak da işlev görebilir (4, 30).

IkBNS başlangıçta timosit TCR stimülasyonu üzerine, NF- κ B DNA bağlama aktivitesini inhibe eden, ancak çekirdeğe translokasyonunu engellemeyen, hızlı bir şekilde indüklenen bir gen olarak tanımlandı (2, 30). Bu da çekirdek içinde NF- κ B'yi negatif olarak düzenleyebileceğini düşündürdü (30). IkbNS'nin seçici olarak IL-6'ya alındığı, ancak TNF- α promotörüne değil, LPS ile indüklenen IL-6 üretimini baskıladığı gösterildi (30).

Genel olarak, NF- κ B'nin aktivasyonu, Ikb moleküllerinden salınmasıyla gerçekleşir (19,27). Bu, inhibitörlerin proteazomal bozunmasıyla veya öncülerin kısmi bozunmasıyla elde edilir (27). Bu ubiquitination enzimleri, tanıma bölgesi olarak substrat üzerinde spesifik bir çift fosforilasyon gerektirir (2, 18).

Sitokinler, viral ve bakteriyel patojenler ve stres indükleyici ajanlar (TNF α , IL-1b,..) dahil olmak üzere çoklu uyaranlara yanıt olarak, Ikb'ler aktive edilmiş IKK kompleksi tarafından fosforile edilir (19, 20). Ikb'nin IKK ile indüklenen fosforilasyonu, Ikb α için Ser-32 ve Ser-36 serin tortuları üzerinde ve Ikb β için Ser-19 ve Ser-23 üzerinde meydana gelir ve 26S proteozom tarafından inhibitör alt biriminin bozulmasına yol açar (18, 24). Bu süreç, NF- κ B'yi aktive eder. Aktif NF- κ B çekirdeğe

yer değiştirir ve spesifik genlerin promotör veya güçlendirici bölgelerindeki DNA bağlama bölgesine bağlanarak transkripsiyonu aktive eder (1, 15).

2.4. İκB Kinaz (IKK) Kompleksi

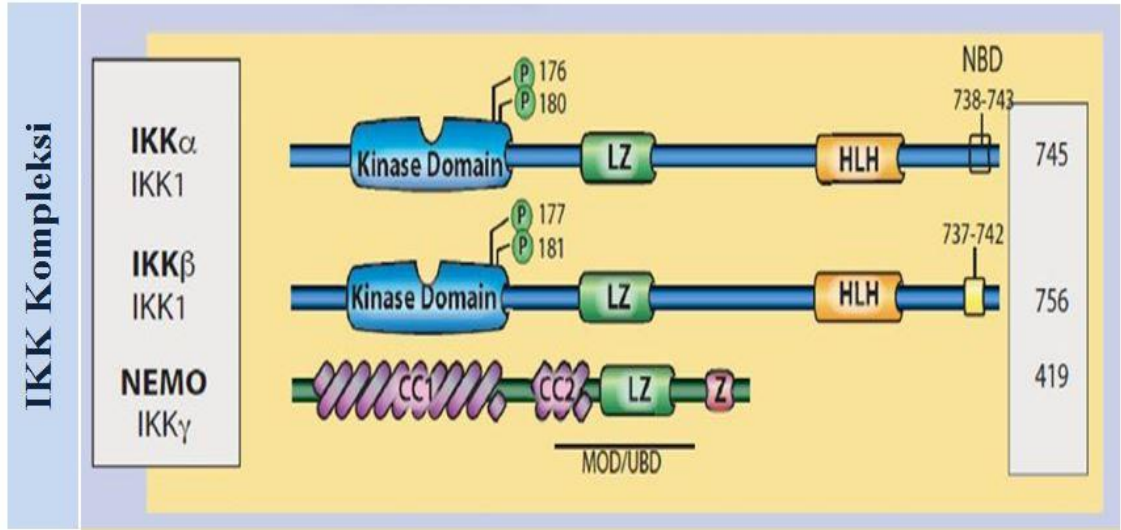
NF-κB sinyal yolundaki önemli bir adım, NF-κB ile inhibitör İκB arasındaki etkileşimin düzenlenmesidir (2). NF-κB aktivasyonunun IKKα veya IKKβ aktivasyonunu gerektirdiğı genel olarak kabul edilir. Bu nedenle, IKK aktivitesinin düzenlenmesini anlamak, NF-κB'nin aktivasyonunu anlamak için merkezi öneme sahiptir (23, 32).

NF-κB'nin aktivasyonuna yol açan tüm uyaranlara yanıt olarak İκB fosforilasyonunun kontrolü, İκB kinaz kompleksi (IKK)'nin omuzlarında bulunur (19, 32). 1997'de sitokin kaynaklı HeLa hücrelerinden saflaştırılmış 700-900 kDa'lık ağırlıkta IKK kompleksi, fonksiyonel olarak pleiotropiktir ve inflamasyon, otofaji, insülin sinyali ve DNA hasar yanıtı dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte önemli roller oynar (17, 29).

IKK, NF-κB inhibitörü İκB'nin SRD'sindeki iki serin tortusunu fosforile eder ve bu inhibitörü ubiquitin-proteazom yolu ile bozunma için hedefler (11, 37). Aktif kalan NF-κB daha sonra, immün ve inflamatuvar yanıtlara katkıda bulunan hedef genlerin indüklenmesi için çekirdeğe girmek üzere serbest bırakılır (9, 37).

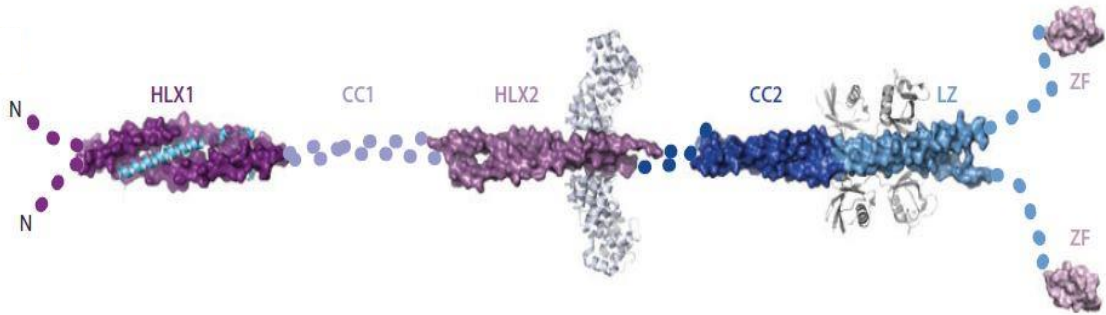
2.4.1. IKK Kompleksini Oluşturan Proteinlerin Yapısal Analizi

IKK kompleksi iki kinaz alt biriminden, IKKα (IKK1) ve IKKβ (IKK2) ve düzenleyici bir alt birim olan IKKγ'den (NEMO) oluşur (11, 24, 28, 33). IKKα ve IKKβ sırasıyla 85 ve 87 kDa'lık moleküler kütlelerdir ve amino asit seviyesinde %50 özdeşlik sergilerler (24, 29). NEMO olarak da bilinen IKKγ de 49 kDa'dan oluşmaktadır (22, 23). Bu polipeptitlerden IKKα ve IKKβ, kinazın katalitik alt birimleri olarak hizmet ederken, üçüncü polipeptit olan IKKγ, düzenleyici alt birim olarak hizmet eder (19).



Şekil 2.7. IKK kompleksinin genel yapısı.

IKK aktivasyonu aynı zamanda sağlam bir IKK γ alt biriminin varlığına bağlıdır (20, 24). IKK γ , 1998'de Alain Israël'in laboratuvarında klonlanmış α -sarmal bölgelerden oluşur (19, 29). IKK γ , herhangi bir kinaz alanına veya katalitik aktiviteye sahip olmayan ancak IKK α ve IKK β 'nin kinaz aktivasyonu için önemli olan düzenleyici bir alt birimdir (9, 33). NEMO, bir C-terminal çinko parmak motifi (ZF) (390-412), bir lösin fermuarı (LZ) (303-337), ve N-terminal ve C-terminal iki bobin sarmal alanı, CC1 (93-231) ve CC2 (234-286) içerir (23, 37).



Şekil 2.8. NEMO dimerinin boşluk-doldurma modeli ile gösterimi.

IKK β 'nin eylemleri, büyük ölçüde IKK γ ile etkileşimine bağlıdır (1, 34). IKK α 'nın C-terminalinde benzer bir dizi mevcut olmasına rağmen, IKK α ve IKK γ arasındaki etkileşim, IKK β ve IKK γ arasındaki etkileşimden çok daha az güçlüdür (34).

IKK α 'nın bağışıklık sistemindeki ana işlevi, ikincil lenfoid organların gelişimi, organizasyonu ve B hücresi olgunlaşması ile ilgiliyken, IKK β , doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin aktivasyonu ve bağışıklık hücrelerinin hayatta kalması için esastır

(34). IKK α ve IKK β 'nin yapısal benzerliğine rağmen, biyolojik işlevdeki bu farklılık oldukça şaşırtıcıdır ve genetik çalışmalar, IKK α 'dan ziyade IKK β 'nin aktivasyonunun, proinflatuar uyarıların NF- κ B fonksiyonunu indüklediği birincil yola katıldığını göstermektedir (24, 32). Büyük olasılıkla, IKK α ve IKK β 'nin işlevleri arasındaki biyolojik farklılıklar, düzenlemelerindeki ve substrat özgüllüklerindeki biyokimyasal farklılıklardan kaynaklanmaktadır (34).

IKK α ve IKK β alt birimlerinin kabaca ilk 300 amino asitleri, açıkça tanımlanabilir bir kinaz alanı içerir (22). Bunu, ubiquitin ile uzak homoloji sergileyen kısa bir bölge takip eder (22). IKK α ve IKK β , bir N-terminal katalitik alanı, homodimer ve heterodimer oluşumunda yer alan merkezi olarak konumlandırılmış bir LZ motifi ve bir C-terminal sarmal-ilmek-sarmal (HLH) alanı dahil olmak üzere benzer işlevsel alanlara sahiptir (24, 34). IKK α :IKK β heterodimerlerinin önce oluşması ve ardından dimer oluşumuna aracılık eden IKK γ ile etkileşime girmesi mümkündür (19). IKK α ve IKK β sadece serinlerde fosforile edilirken IKK γ serin ve treonin üzerinde fosforile edilir (4, 19). IKK α ve IKK β 'nin serin fosforilasyonu [IKK α için serin 176 ve 180; IKK β için serin 177 ve 181], konformasyonel değişiklik ve kinaz aktivasyonu ile sonuçlanır (4, 19).

2.5. Kanonik (Klasik) ve Kanonik Olmayan (Alternatif) Sinyal İletim Yolları

Son yıllarda, NF- κ B'nin aktivasyonu için en az iki ayrı yol olduğu anlaşılmıştır (5, 16). NF- κ B aktivasyonu, sinyal mekanizmasındaki farklılıklara rağmen, her ikisi de immün ve inflammatuar yanıtları düzenlemek için önemli olan, kanonik ve kanonik olmayan yollar olmak üzere iki sinyal yolu içerir (13, 25). Her iki yolun aktivasyonu, bu moleküllerin bazılarına kovalent olarak bağlı olan spesifik poli-ubikitin kısımları yoluyla sinyal moleküllerinin etkileşimlerini gerektirir (22, 25).

Kanonik yol, çeşitli sitokin reseptörlerinin ligandları, patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) ve TNF α tarafından uyarılan TNF reseptörü (TNFR) süper ailesi üyelerinin yanı sıra T ve B hücresi reseptörü (TCR/BCR) dahil olmak üzere çeşitli uyarılar tarafından tetiklenir (18, 36). Değişmez bir şekilde, inflamasyon bölgelerindeki NF- κ B aktivitesi, aktif IKK β proteinlerinin aracılığıyla RelA veya c-Rel içeren komplekslerin aktivasyonu ve I κ B α , I κ B β ve p105'in bozunması ile ilişkilidir (18, 33).

Alternatif yol, TNF-ailesi sitokinler, lenfotoksin β reseptörü (LT β R), CD40 ligandı (CD40L), B hücresi aktive edici faktör (BAFF) ve NF- κ B ligandının reseptör

RelB/p52 heterodimerlerinin aktivasyonuna yol açar (23, 34). p100'ün işlenmesi, olgun p52'nin üretilmesi ve alternatif NF- κ B kompleksi p52/RelB'nin nükleer translokasyonu ile sonuçlanır (16, 27, 36). Bu iki yol arasındaki en önemli ayrım, p100 fosforilasyonuna aracılık etmek için IKK α 'yı aktive eden ve işlevsel olarak işbirliği yapan NF- κ B'yi indükleyen kinaz (NIK)'dır (11, 29). NIK, tümör nekroz faktörü sitokin ailesinin belirli üyeleri tarafından tetiklenerek IKK α homodimerlerini aktive eder (14, 34).

Her iki yol da, IKK kompleksinin bileşenlerine bağlıdır (10, 16). IKK α ve IKK α 'ya bağımlılık genellikle kanonik ve alternatif sinyal yolları arasında ayrım yapmak için kullanılır (17). IKK β , IkB'lerin fosforilasyonu yoluyla kanonik yolun aktivasyonunu düzenler ve IKK γ alt birimini gerektirir, ancak IKK α 'yı gerektirmez; oysa IKK α tek başına, p52'nin öncüsü olan p100'ün fosforilasyonu ve işlenmesi yoluyla alternatif yolun aktivasyonu için gereklidir, ancak bu hem IKK β 'den hemde IKK γ 'den bağımsızdır (28, 35). Çalışmalar, IKK γ ve IKK β alt birimlerinin, IkB α fosforilasyonu ve kanonik NF- κ B aktivasyonu için gerekli olduğunu, alternatif yolun ise hem IKK γ hem de IKK β 'den bağımsız olduğunu göstermiştir (10, 14).

Kanonik ve alternatif yollardan kaynaklanan dimerler, en yaygın olarak üretilenler (RelA-p50, c-Rel-p50, RelB-p52) olsa da, diğer heterodimer türleri (c-Rel-RelA, c-Rel-c-Rel)) veya homodimerler (p50-p50 ve p52-p52) de üretilebilir (18). Her NF- κ B dimerinin farklı düzenleyici fonksiyonlara sahip olması muhtemeldir (18).

2.6. Borik Asit

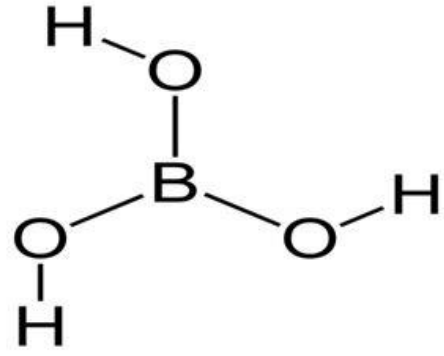
Bitkiler için esansiyel bir element olan bor mineralinin, insan ve hayvan sağlığı üzerine birçok metabolik ve biyokimyasal etkisi olduğu iyi bilinmektedir (7,8,38). Bor bileşikleri yüzyıllardır bilinmesine rağmen element olarak ilk kez 1808 yılında Sir Humphry Davy, Gay Lussac ve Thenard tarafından eş zamanlı olarak keşfedilmiştir (8, 39).

Bor, periyodik tablonun 3A grubunda ilk sırada yer alan, 'B' simgesiyle gösterilen, atom numarası 5, atom kütlesi 10.811 g/mol olan yarı iletken ve yarı metal olan bir elementtir (8, 38). Havada, toprakta ve suda 250'den fazla bileşiğinin mevcut olduğu bilinmektedir (38, 39).

Bor; oksijen, hidrojen ve su ile tepkimeye girebilir, su ile tepkimeye girdiğinde borik asit (H₃BO₃) ve çeşitli bor bileşenleri oluşur (7, 39). Borik asit küçük, yüksüz bir

molekül olup hacmi 71.5 Å, pKa'sı 9.25 olan zayıf bir Lewis asididir (8). Ek olarak, toz ve kristal granüler halde bulunmasına karşın suda çok çabuk eriyebilirler (38).

Dünyada bor kaynaklarının dağılımına bakıldığında %73.8'lik bir paya sahip olan Türkiye birinci sıradadır (38). En önemli bor kaynakları yeryüzü suları ve topraktır (8). Bor toprak ve sudan bitkilere, bu vasıtalarla da insan ve hayvanlara geçer (38, 40). Sağlıklı insanlarda bor seviyeleri 15 ile 80 µg/kg arasında değişmektedir (8). Yetersiz bor alımının bağışıklık cevabının zayıflamasına neden olabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (7).



Şekil 2.10. Borik asitin yapısı

Bor, düşük konsantrasyonlarda biyolojik sistemler üzerinde geniş bir fizyolojik etkiye sahipken, yüksek konsantrasyonlarda toksik etki oluşturabilir (8). Bor mineralinin fazla veya eksik tüketimiyle birlikte insan vücudunda birçok anormallik görülmektedir (7). Bu yüzden vücuda alınan bor miktarına dikkat edilmesi gereklidir (7, 40).

Bor bileşiklerinin kullanım alanları oldukça fazladır. Özellikle son yıllarda canlıların beslenmesinde organik mineral kavramının gelişmesi ile bor elementinin biyolojik önemi anlaşılmış ve sağlık üzerine olan etkilerini araştıran klinik ve deneysel çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (7, 39). Bor kalsiyum metabolizması, kemikler ve immün sistem başta olmak üzere birçok fizyolojik süreci etkilemektedir (7, 38). Bor, bazı iltihaplı hastalıklarda (eklem şişmesi gibi) spesifik enzimlerin aktivitelerini baskılayarak inflamatuvar yanıtta rol aldığı bilinmektedir (8). Ayrıca borun, gastrointestinal sistemi ve mineral metabolizmasını etkilediği de bilinmektedir (7). Bor bileşiklerinin oral yolla alındığında, gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde borik

aside dönüştürüldüğü, neredeyse tamamının borik asit şeklinde emilerek kan aracılığı ile dokulara dağıldığı belirtilmektedir (39).

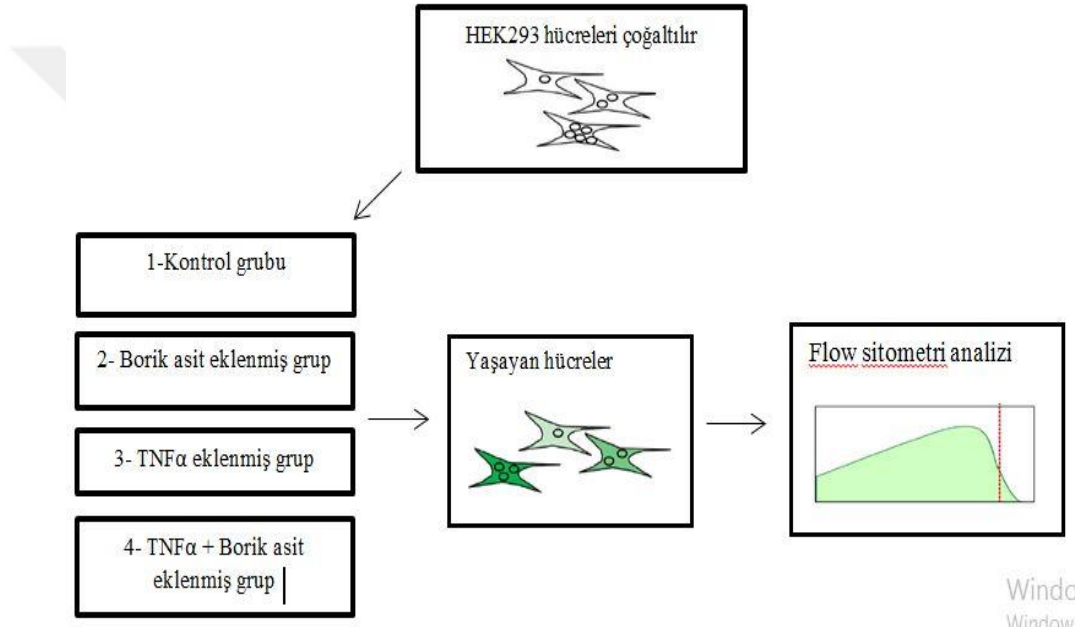
Bu dağılımın önceki yıllarda sadece pasif difüzyon ile olduğu düşünülmekte iken, 2004 yılında, sodyum bağımlı borat taşıyıcı 1 (NABC1) izole edilmesinden sonra bu düşünce değişmiş ve borun hücreye alınmasında hem pasif difüzyonun hem de NABC1'in etkili olacağı düşünülmeye başlanmıştır (39). Ayrıca bor bileşiğinde bor-oksijen bağı kırarak için gereken enerji çok yüksek olduğundan bor bileşiğinin metabolize edilmeden vücuttan atıldığı da ileri sürülmektedir (39).

Ek olarak proteomik analizler, toksik borik asit seviyelerinin varlığında ekspresyonu artan proteinlerin olduğunu göstermiştir. Tüm bu genler ve proteinler, hücre içinde daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyan farklı yolları gösterir (8).

Bor elementi ile ilgili çalışmalar genellikle bitki ve hayvanlar üzerinde yapılmıştır. Bu nedenle bu konuyla ilgili insanlar üzerinde yapılan araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İnsanlar üzerindeki bor etkinliğini açıklayabilmek için aydınlık getirilmesi gereken en önemli konulardan biri Bor'un eksik ve fazla alımlarında ortaya çıkacak durumlardır (40). Borun insan ve hayvan metabolizmasında etkilediği enzimlerle ilgili kesin sonuçlara ulaşmak için yapılan çalışmalar devam etmektedir (38).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, HEK293 hücreleri model olarak kullanılarak borik asitin NF- κ B yolağını regüle edebilme kapasitesi araştırılmıştır. Kullanılacak hücre hattında NF- κ B transkripsiyon faktörünün bağlanacağı bir promötor bölgesi kontrolünde bulunan yeşil floresan protein (GFP) ifadenme kaseti genoma entegre edilmiş şekilde bulunmaktadır. Çalışmanın iş akış planı ise Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İş akış planı

3.1. Materyal

Hücre kültürü çalışmalarında NF- κ B-GFP belirteç sistemi entegre edilmiş transgenik bir HEK293 (insan embriyonik böbrek 293) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Batu Erman’dan temin edilmiştir. Yardımları için teşekkür ederiz.



Şekil 3.2. HEK293 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X)

Tablo 3.1. Kimyasal Listesi

Kimyasal	Üretici
TNF α	Cell Signaling Technology
Borik asit	Pancreac Applichem
FBS	Gibco
PBS	NutriCulture
Trypsin-EDTA	Capricorn
DMEM (High G.)	Multicell
DMSO	Fisher Sci.
Pen/Strep.	Gibco
Etil Alkol	Sigma

Tablo 3.2. Deney cihazları listesi

Cihaz	Marka
Hassas terazi	Shimadzu
Mikrosantrifüj	VWR
Soğutmalı santrifüj cihazı	Nüve
İnkübatör	Nüve
-80° ultra soğutucu	Thermo Scientific
Distile deiyonize su ünitesi	Millipore
Otoklav	Nüve
-20° derin dondurucu	Uğur, Arçelik
Mikroskop	Olympus
Akış sitometre cihazı	BD Accuri™ C6 Plus
Terazi	Kern
Vorteks	VWR

3.2. Metot

3.2.1. İnsan TNF-a ve Borik Asit Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Liyofilize halde temin edilen 10µg TNF-a, 1% FBS (Fetal Sığır Serumı) içeren 400µl steril 1X PBS içerisinde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca yavaşça vortekslenip çözülerek 25µg/ml stok çözeltisi hazırlandı ve deneysel kullanıma kadar -20 °C’de saklandı.

Borik asitin hücre kültürü çalışmalarında kullanımı için, hassas terazide 309.15 mg katı borik asit tartıldı ve bir miktar steril saf su içerisinde çözdürüldükten sonra, son hacim 100 ml olacak şekilde 50 mM borik asit çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan borik asit çözeltisi, hücre kültürü uygulamalarına kadar +4°C’de saklandı.

3.2.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

-80 °C’de kriyojenik tüplerde saklanan 1 ml HEK293 hücre çözeltisi üzerine hızlı bir şekilde 37 °C’de ısıtılmış bir miktar besi yeri eklenerek çözdürüldü ve toplamda 5 ml olacak şekilde steril falkon tüplere alındı. 1000 rpm’de 7 dakika santrifüj işlemi uygulandı ve üstte kalan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüp içerisinde kalan hücre pelleti üzerine 5 ml besiyeri (% 10 fetal sığır serumu, L-glutamin ve %1

penisilin/streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)) eklenerek 25 cm²'lik kültür flasklarına transfer edildi. İnverted mikroskop yardımıyla flask içerisindeki hücreler kontrol edildikten sonra %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37 °C'de kültüre edildi.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Kültür boyunca, 24 saatlik periyodlar halinde, inverted mikroskop yardımıyla hücrelerin tutunması, gelişimi ve kontaminasyon açısından kontrolleri yapıldı. Hücreler, flaskın tabanının yaklaşık % 80'ini kapladıktan sonra pasaj için hazırlandı. Bu işlem için, eski besiyeri steril serolojik pipet ile flasktan uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1.25 ml % 0.25'lik 1X Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37°C'lik inkübatörde yaklaşık 5 dk boyunca bekletildi. Flask tabanından kalkmış hücrelerin üzerine 3.75 ml taze besiyeri eklendikten sonra steril falkon tüpe alınarak 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti üzerine yeterli miktarda taze besiyeri eklenerek süspanse edildi ve diğer deneysel uygulamalarda kullanımı için hazırlandı.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Pasajlama sırasında elde edilen hücrelerin bir kısmı diğer deneysel çalışmalar için ayrıldı ve kalan hücre solüsyonuna hücre kültürüne uygun %10 DMSO eklendikten sonra kriyojenik tüplere alındı. Sonraki kullanımlar için -80°C'de ve daha uzun süreli depolama için sıvı azot içerisinde saklandı.

3.2.5. Hücrelere TNF α 'nın Uygulanması

Pasajlama yapılarak ekim için hazır hale getirilmiş hücre solüsyonu, her birine 2 ml taze besiyeri eklenmiş 6 kuyucuklu kültür plakasına eşit şekilde paylaştırıldı. Hücre homojenizasyonu için yavaş bir şekilde karıştırıldıktan sonra hücre büyümesi için uygun inkübatöre alındı. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra, inverted mikroskopta kontrolleri yapılarak eski besiyerleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 2 ml taze besiyeri eklendi. Ardından, kontrol için ayrılmış bir kuyucuk dışında diğerlerine sırasıyla 10, 20, 30, 40 ve 50 ng/mL TNF α eklendi. TNF α 'nın besi yeri içerisinde eşit şekilde dağılması için plaka hafifçe çalkalandıktan sonra 12 saatlik muamele için inkübatöre alındı. Süre sonunda, hücrelere 500'er μ L, 0.25%'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37 °C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kalkması sağlandı.

Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. Santrifüj işleminden sonra her bir pellet üzerine 250 µl steril PBS eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 96 well plate içerisinde akış sitometre cihazında analiz edildi.

3.2.6. Hücrelere Borik Asit'in Uygulanması

Pasajlama yapılarak ekim için hazır hale getirilmiş hücre solüsyonu, her birine 2 ml taze besiyeri eklenmiş 6 kuyucuklu 2 kültür plakasına eşit şekilde paylaştırıldı. Hücre homojenizasyonu için yavaş bir şekilde karıştırıldıktan sonra hücre büyümesi için uygun inkübatöre alındı. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra, inverted mikroskopta kontrolleri yapılarak eski besiyerleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 2 ml taze besiyeri eklendi. Ardından, kontrol için ayrılmış bir kuyucuk dışında diğerlerine sırasıyla 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ve 225 µM borik asit eklendi. Borik asit'in besi yeri içerisinde eşit şekilde dağılması için plakalar hafifçe çalkalandıktan sonra 12 saatlik muamele için inkübatöre alındı. Süre sonunda, hücrelere 500'er µL, 0.25%'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37°C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. Santrifüj işleminden sonra her bir pellet üzerine 250 µl steril PBS eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 96 well plate içerisinde akış sitometre cihazında analiz edildi.

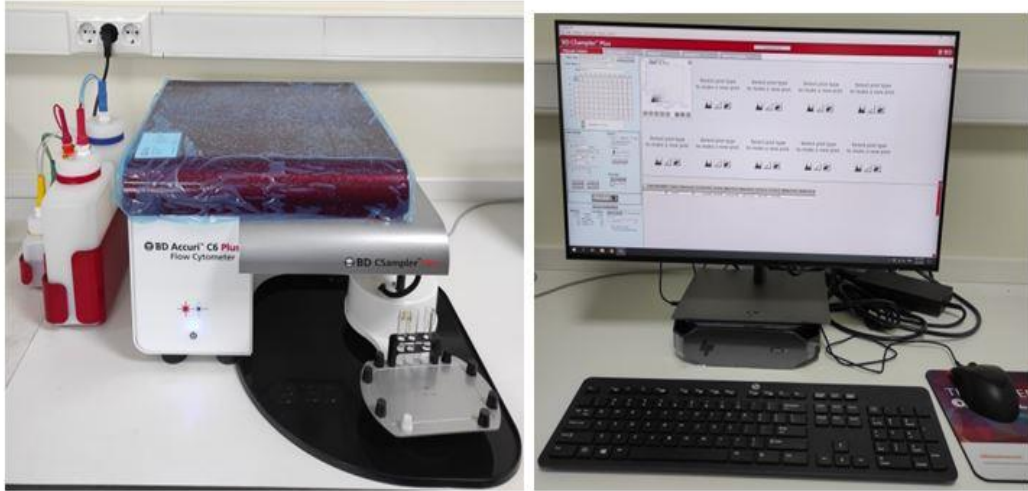
3.2.7. Hücrelere TNFα ve Borik Asit'in Birlikte Uygulanması

Pasajlama yapılarak ekim için hazır hale getirilmiş hücre solüsyonu, her birine 2 ml taze besiyeri eklenmiş 6 kuyucuklu 2 kültür plakasına eşit şekilde paylaştırıldı. Hücre homojenizasyonu için yavaş bir şekilde karıştırıldıktan sonra hücre büyümesi için uygun inkübatöre alındı. Yaklaşık 24 saatlik inkübasyondan sonra, inverted mikroskopta kontrolleri yapılarak eski besiyerleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 2 ml taze besiyeri eklendi. Ardından, kontrol için ayrılmış bir kuyucuk dışında diğerlerine sırasıyla 10'ar ng/µl TNFα eklendi. TNFα eklenmiş kuyucukların üzerine sırasıyla 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ve 225 µM borik asit eklendi. Plakalar yavaşça çalkalandıktan sonra 12 saatlik muamele için inkübatöre alındı. Süre sonunda, hücrelere 500'er µL, 0.25%'lik tripsin çözeltisi eklenerek 37°C'lik inkübatörde 5 dakika bekletildi ve hücrelerin kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1'er ml taze besi yeri eklenerek steril eppendorf tüplere alındı. Santrifüj işleminden sonra her bir pellet

üzerine 250 µl steril PBS eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 96 well plate içerisinde akış sitometre cihazında analiz edildi.

3.2.8. Akış Sitometre Analizi

Süspanse edilen hücre numuneleri, 96 kuyucuklu plakalarda doğrudan akış sitometresine verildi. Akış sitometre analizi için, BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Life Sciences, San Jose, CA, 95131, USA) kullanıldı. Numune başına maksimum 10.000 olay (hücre) analiz edildi ve ölü hücreler ve hücre kalıntıları, ileri (FSC) ve yan saçılım (SSC) ışık geçişine dayalı olarak analizden çıkarıldı. GFP, mavi bir lazer (488 nm) tarafından uyarıldı ve FL1 kanalında 530/30 nm bandpass filtre kullanılarak floresan tespit edildi. GFP kat floresans yoğunluğu, BD Accuri™ C6 Plus software kullanılarak TNF α ve borik asit uygulanmış hücre popülasyonunun FL1 floresan sinyali kontrol hücrelerinin (TNF α ve borik asit uygulanmamış) otofloresan FL1 sinyaline bölünmesiyle elde edildi.



Şekil 3.3. Ölçüm yapılan akış sitometri cihazı

3.2.9. İstatiksel Analiz

TNF α ve borik asit uygulanmış hücrelerin GFP yoğunluğunun ortalaması ve standart sapması, üç bağımsız biyolojik deneyden hesaplandı. İstatistiksel testler için iki örneklem konum t-testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. TNF α Uygulanmış HEK293 Hücrelerinin GFP Ekspresyon Analizi

Farklı dozlarda TNF α uygulanmış HEK293 hücrelerinin GFP yoğunluk ve kat yoğunluk değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. 12 saatlik TNF α uygulamasından sonra, akış sitometresi ile toplamda maksimum 10.000 hücre analiz edilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, HEK293 hücrelerinin genomuna entegre GFP proteini bulunduğundan, kontrol grubunda bir miktar GFP ekspresyonu gözlemlenmiştir. Belirli dozlarda TNF α verildiğinde ise, hücrelerde kontrol grubuna kıyasla 6-8 kat daha yoğun GFP ekspresyonu belirlenmiştir. 10 ng/ml TNF α uygulandığında, hücrelerde yeterince GFP ekspresyon yoğunluğunu arttırdığı gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$) ve diğer aşamalarda bu doz kullanılmıştır.

Tablo 4.1. HEK293 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda TNF α uygulaması sonrası GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri ve Kat Yoğunluk Değerleri

Gruplar	GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri	Kat Yoğunluk (Değer/Kontrol)
Kontrol	3110 $\pm$ 329.15	1
10 ng/ml TNF α	22128 $\pm$ 503.78	7.11
20 ng/ml TNF α	20125 $\pm$ 975.10	6.47
30 ng/ml TNF α	26538 $\pm$ 1035.94	8.53
40 ng/ml TNF α	22867 $\pm$ 1650.85	7.35
50 ng/ml TNF α	22305 $\pm$ 1329.15	7.17

4.2. Borik Asit Uygulanmış HEK293 Hücrelerinin GFP Ekspresyon Analizi

Farklı dozlarda borik asit uygulanmış HEK293 hücrelerinin GFP yoğunluk ve kat yoğunluk değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. 12 saatlik Borik asit uygulamasından sonra, akış sitometresi ile toplamda maksimum 10.000 hücre analiz edilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, belirli dozlarda borik asit uygulandığında, hücrelerde kontrol grubuna kıyasla daha düşük yoğunlukta GFP ekspresyonu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2. HEK293 hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulaması sonrası GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri ve Kat Yoğunluk Değerleri

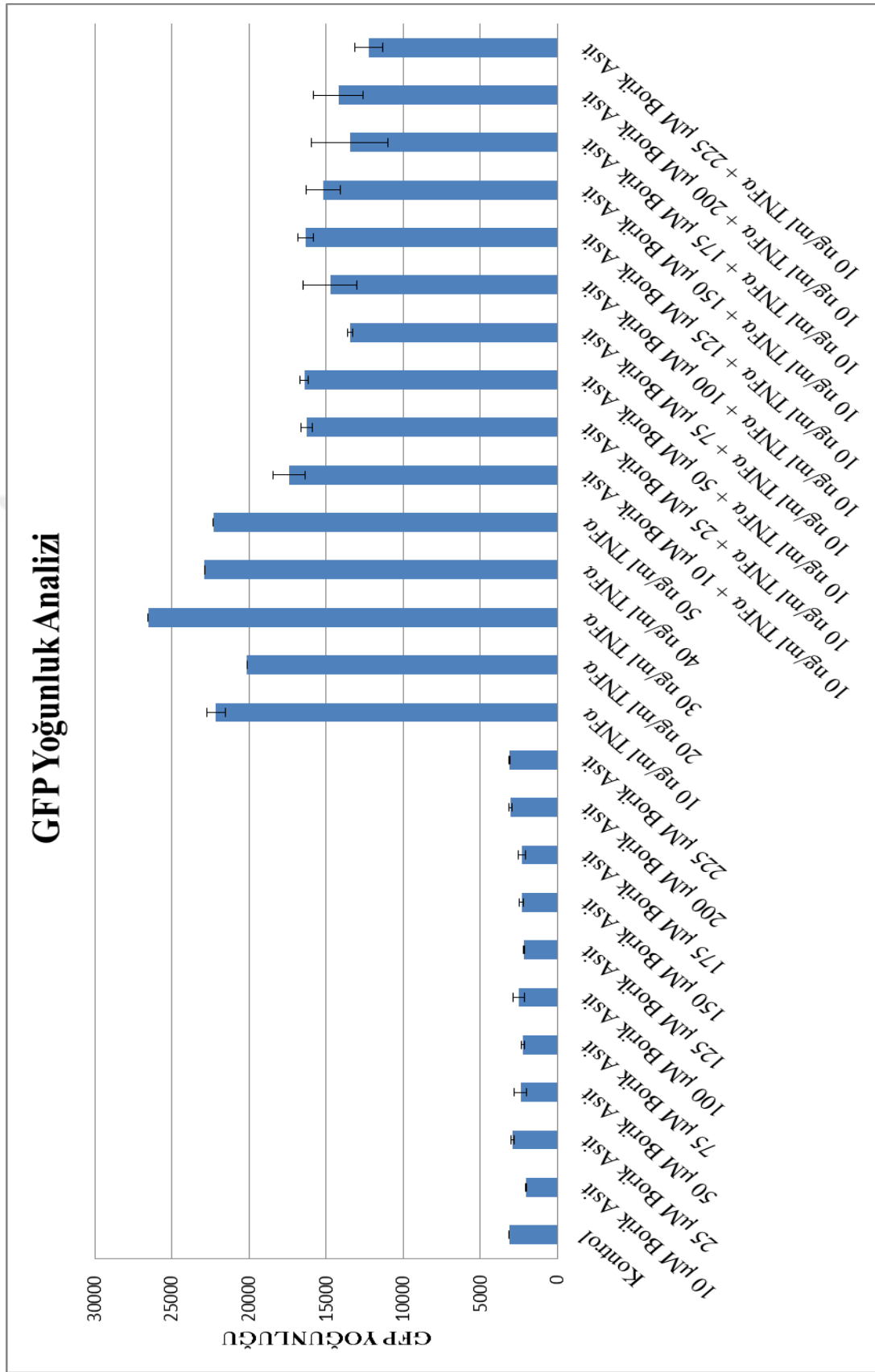
Gruplar	GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri	Kat Yoğunluk (Değer/Kontrol)
Kontrol	3110 $\pm$ 329.15	1
10 μM Borik asit	2042 $\pm$ 51.10	0.65
25 μM Borik asit	2936 $\pm$ 75.37	0.94
50 μM Borik asit	2402 $\pm$ 379.70	0.77
75 μM Borik asit	2227 $\pm$ 79.21	0.71
100 μM Borik asit	2491 $\pm$ 313.13	0.80
125 μM Borik asit	2162 $\pm$ 51.58	0.69
150 μM Borik asit	2338 $\pm$ 150.79	0.75
175 μM Borik asit	2290 $\pm$ 190.65	0.73
200 μM Borik asit	3062 $\pm$ 86.55	0.98
225 μM Borik asit	3109 $\pm$ 52.66	0.99

4.3. TNF α ve Borik Asit Birlikte Uygulanmış HEK293 Hücrelerinin GFP Ekspresyon Analizi

Tablo 4.3’de hücrelerin her birine 10 ng/ml TNF α ve farklı dozlarda borik asit uygulanmış HEK293 hücrelerinin GFP yoğunluk ve kat yoğunluk değerleri verilmiştir. 12 saatlik TNF α + Borik asit uygulamasından sonra, akış sitometresi ile toplamda maksimum 10.000 hücre analiz edilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, GFP yoğunluk değeri hücrelere 10 ng/ml TNF α verildiği zaman kontrol grubuna göre 7 kat civarında artmıştır, fakat 10 ng/ml TNF α + farklı dozlarda borik asit verildiğinde ise, GFP yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.3. HEK293 hücrelerinde, 10 ng/ml TNF α + farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulaması sonrası GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri, Kat Yoğunluk ve p Değerleri

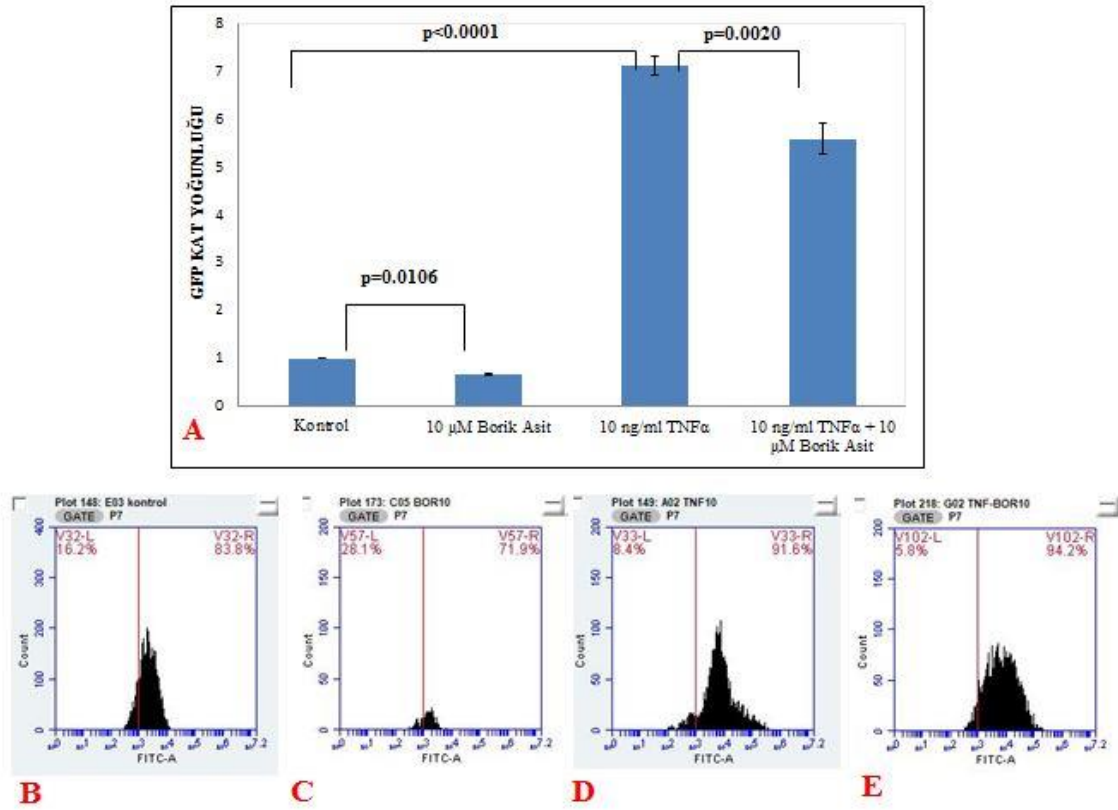
Gruplar	GFP Yoğunluk Ortalaması $\pm$ Standart Sapma Değerleri	Kat Yoğunluk (Değer/Kontrol)	Saptanan GFP Kat Yoğunluk p Değerleri
Kontrol	3110 $\pm$ 329.15	1	
10 ng/ml TNFα	22128 $\pm$ 503.78	7.11	p<0.0001
10 ng/ml TNFα + 10 μM Borik asit	17388 $\pm$ 788.65	5.59	p=0.0020
10 ng/ml TNFα + 25 μM Borik asit	16256 $\pm$ 249.79	5.22	p=0.0001
10 ng/ml TNFα + 50 μM Borik asit	16415 $\pm$ 204.49	5.27	p=0.0001
10 ng/ml TNFα + 75 μM Borik asit	13435 $\pm$ 116.76	4.31	p<0.0001
10 ng/ml TNFα + 100 μM Borik asit	14735 $\pm$ 1416.62	4.73	p=0.0022
10 ng/ml TNFα + 125 μM Borik asit	16323 $\pm$ 355.74	5.24	p=0.0002
10 ng/ml TNFα + 150 μM Borik asit	15200 $\pm$ 828.65	4.88	p=0.0005
10 ng/ml TNFα + 175 μM Borik asit	13465 $\pm$ 1604.82	4.32	p=0.0019
10 ng/ml TNFα + 200 μM Borik asit	14184 $\pm$ 1074.51	4.56	p=0.0007
10 ng/ml TNFα + 225 μM Borik asit	12216 $\pm$ 653.20	3.92	p<0.0001



Şekil 4.1. Borik asit, TNFα, ve TNFα + borik asit uygulamalarının GFP yoğunluk grafiği

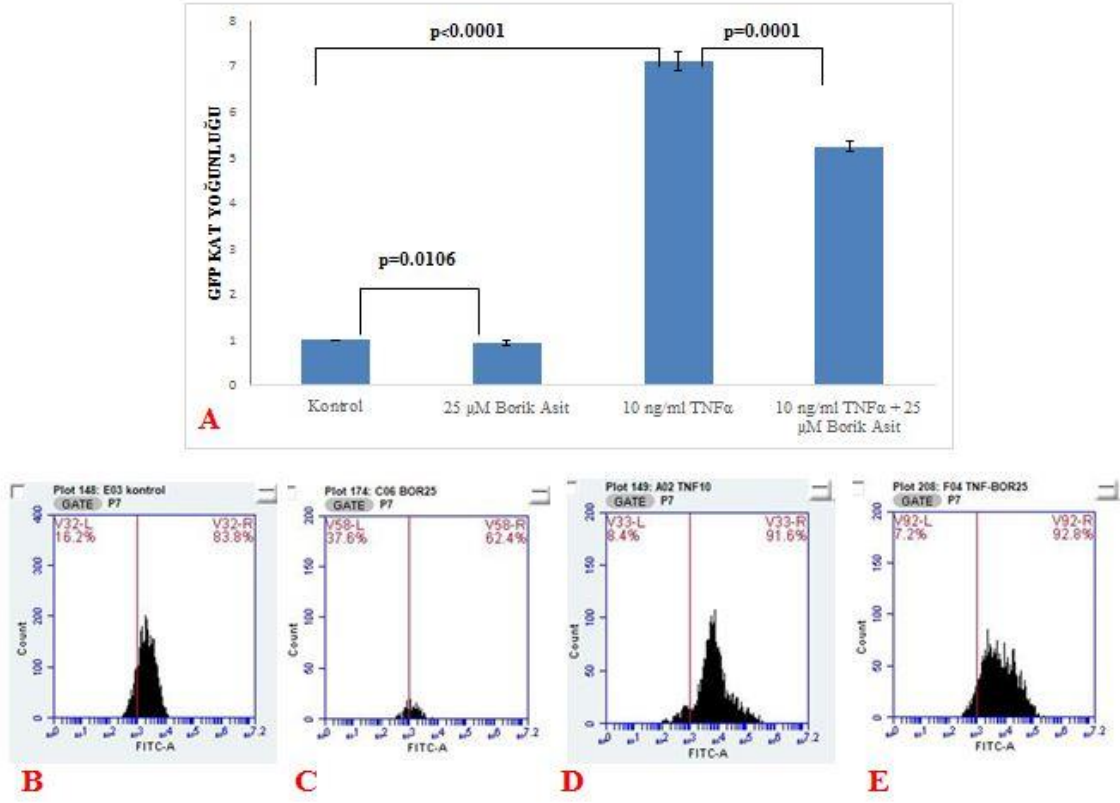
Şekil 4.1.'de borik asit, TNF α ve TNF α + borik asit uygulamalarının HEK293 hücrelerinde analiz edilmiş GFP ekspresyon yoğunluk değerleri gösterilmiştir.

10 ng/ml TNF α uygulanmış HEK293 hücrelerine, farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulandığında her bir borik asit uygulaması, TNF α ile ekspresyon yoğunluğu artırılmış GFP için istatistiksel anlamlı bir azalma sağlamıştır. Tablo 4.3'te her grup için TNF α ve borik asit + TNF α uygulamaları arasındaki GFP yoğunluğu açısından istatistiksel p değerleri gösterilmektedir. Değerlendirmelerde istatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ esas alınmıştır ve $p \geq 0.05$ değerleri istatistiksel anlamlı farkın olmadığını temsil etmektedir.



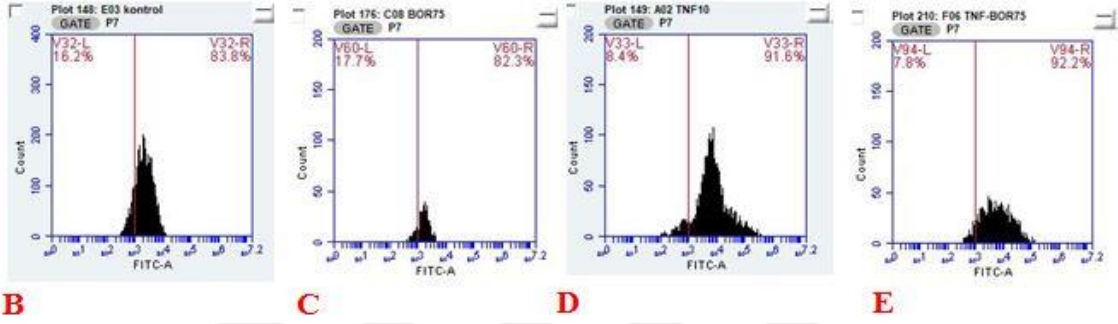
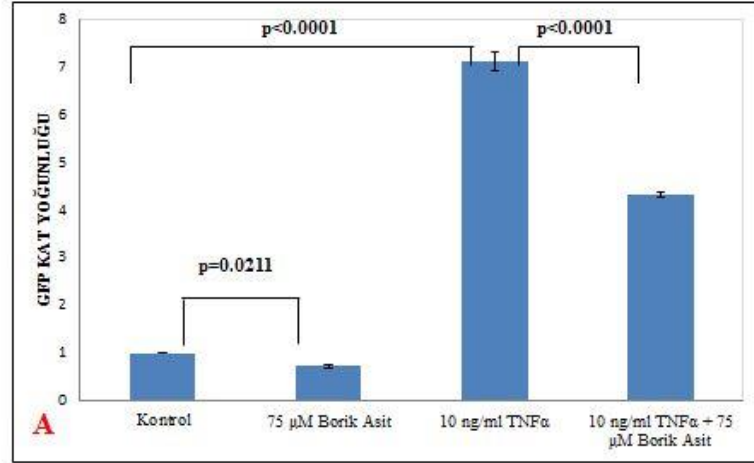
(HEK293 hücrelerinde GFP kat yoğunluk analizi. (A) HEK293 kontrol grubu, (B) 10 µM borik asit uygulanmış, (C) 10 ng/ml TNF α uygulanmış, (D) 10 ng/ml TNF α + 10 µM borik asit uygulanmış HEK293 hücreleri akış sitometri GFP (FITC) yoğunluk histogram görüntüleri. (E) GFP kat yoğunluk ortalamaları $\pm$ standart sapma üçlü paralel tekrar ölçümü sütun grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).

Şekil 4.2. HEK293 hücrelerinde 10 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.



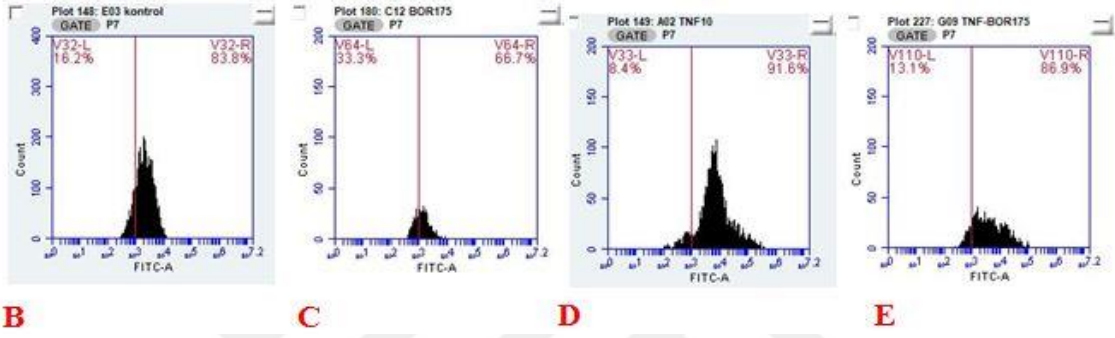
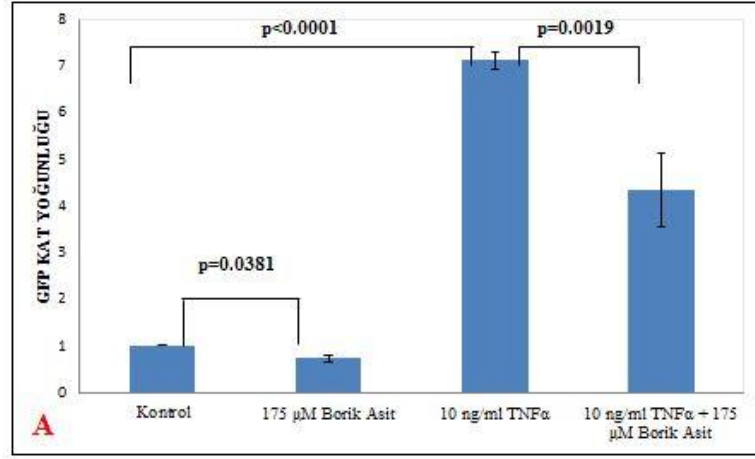
(HEK293 hücrelerinde GFP kat yoğunluk analizi. (A) HEK293 kontrol grubu, (B) 25 µM borik asit uygulanmış, (C) 10 ng/ml TNFα uygulanmış, (D) 10 ng/ml TNFα + 25 µM borik asit uygulanmış HEK293 hücreleri akış sitometri GFP (FITC) yoğunluk histogram görüntüleri. (E) GFP kat yoğunluk ortalamaları ± standart sapma üçlü paralel tekrar ölçümü sütun grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).

Şekil 4.3. HEK293 hücrelerinde 25 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.



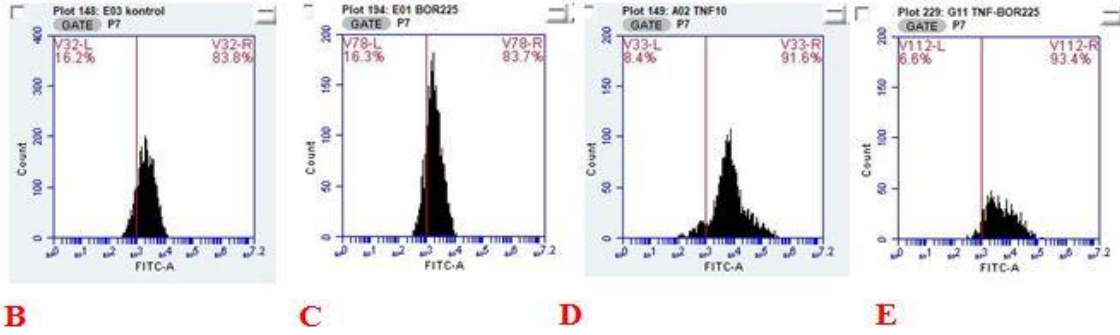
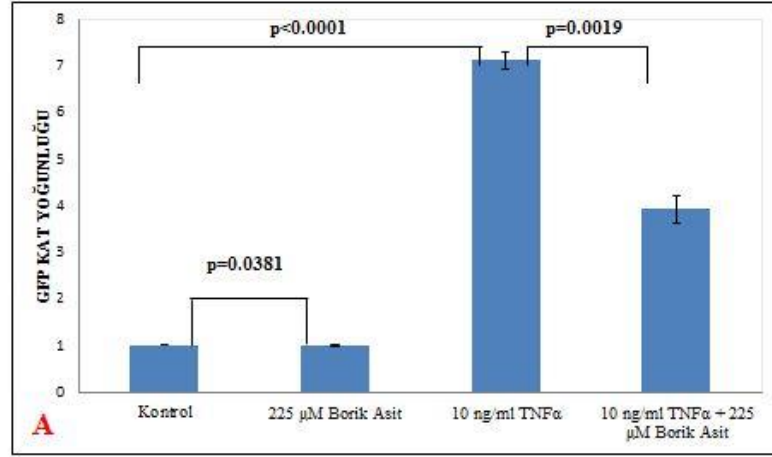
(HEK293 hücrelerinde GFP kat yoğunluk analizi. (A) HEK293 kontrol grubu, (B) 75 µM borik asit uygulanmış, (C) 10 ng/ml TNFα uygulanmış, (D) 10 ng/ml TNFα + 75 µM borik asit uygulanmış HEK293 hücreleri akış sitometri GFP (FITC) yoğunluk histogram görüntüleri. (E) GFP kat yoğunluk ortalamaları ± standart sapma üçlü paralel tekrar ölçümü sütun grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).

Şekil 4.4. HEK293 hücrelerinde 75 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.



(HEK293 hücrelerinde GFP kat yoğunluk analizi. (A) HEK293 kontrol grubu, (B) 175 µM borik asit uygulanmış, (C) 10 ng/ml TNFα uygulanmış, (D) 10 ng/ml TNFα + 175 µM borik asit uygulanmış HEK293 hücreleri akış sitometri GFP (FITC) yoğunluk histogram görüntüleri. (E) GFP kat yoğunluk ortalamaları ± standart sapma üçlü paralel tekrar ölçümü sütun grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).

Şekil 4.5. HEK293 hücrelerinde 175 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.



(HEK293 hücrelerinde GFP kat yoğunluk analizi. (A) HEK293 kontrol grubu, (B) 225 µM borik asit uygulanmış, (C) 10 ng/ml TNFα uygulanmış, (D) 10 ng/ml TNFα + 225 µM borik asit uygulanmış HEK293 hücreleri akış sitometri GFP (FITC) yoğunluk histogram görüntüleri. (E) GFP kat yoğunluk ortalamaları ± standart sapma üçlü paralel tekrar ölçümü sütun grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel p değerleri, Student's T testi ile elde edilmiştir).

Şekil 4.6. HEK293 hücrelerinde 225 µM borik asitin GFP kat yoğunluk analizi.

5. TARTIŞMA

İnflamasyon, fiziksel, fizyolojik ve oksidatif strese yanıt olarak doğuştan gelen bağışıklık sürecidir ve tüm çok hücreli hayvanlarda korunan kanonik NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu ile ilişkilidir (13, 27, 36). Transkripsiyon faktörü NF- κ B, inflamatuvar yanıtı düzenleyen çeşitli hücrel genlerin transkripsiyonunu kontrol eden en önemli düzenleyicilerden biridir (1, 13, 32). NF- κ B aktivasyonu, prototipik bir proinflamatuvar sinyal yolu olarak uzun süredir kabul edilmektedir (5, 13, 14). Yirmi yılı aşkın süredir yapılan önemli araştırma çabaları, NF- κ B'nin bağışıklık sistemindeki işleyişini anlamaya yönelik çok sayıda literatür ortaya çıkarmıştır (35). İndüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin NF- κ B ailesi, çeşitli uyarılara yanıt olarak aktive edilir (17). NF- κ B'nin inflamatuvar sitokinler tarafından aktivasyonu, NF- κ B indükleyici kinazın (NIK) ve en azından IKK α ve IKK β 'nin sıralı aktivasyonunu içerir (1, 14). Tüm uyarılar arasında belki de en çok bilineni TNF α 'nın NF- κ B'yi aktive ettiği mekanizma hakkındadır (9, 41, 42). En güçlü NF- κ B aktivatörlerinden biri olan TNF α , anahtar bir inflamatuvar sitokindir ve inflamatuvar süreçlerde ve immün yanıtların düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (41-43). TNF α ile indüklenen hücrel tepkilere, TNF reseptörü 1 (TNF-R1) ve TNF reseptörü 2 (TNF-R2) aracılık eder ve karmaşık bir sinyal olayları dizisini başlatır (37, 43).

NF- κ B sistemi sıkı bir şekilde düzenlenir ve NF- κ B'nin düzensiz aktivasyonu çeşitli inflamatuvar hastalıklarda yer almaktadır (13, 25, 26). Bu nedenle, gelecekteki çalışmalar, NF- κ B aktivasyonunun ve proinflamatuvar fonksiyonun altında yatan mekanizmanın daha iyi anlaşılması ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde terapötik stratejiler için büyük önem taşımaktadır (10, 13). Bu anlamda, NF- κ B aktivasyonunun düzenlenmesinde görev alabilecek yeni mekanizmaların araştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda, çalışmamızda daha önce araştırılmamış olan, borik asitin NF- κ B aktivasyonu üzerindeki etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir.

Bor biyolojik ortamlarda borik asit (H₃BO₃) formunda bulunur ve insan ve hayvan sağlığı üzerine birçok metabolik ve biyokimyasal etkisi olduğu iyi bilinmektedir (7, 8, 38). Borun, yara iyileşmesi, iltihabın giderilmesi ve bağışıklık üzerinde olumlu etkileri bulunmakta ve inflamatuvar yanıtta rol almaktadır (8, 38). Bor, düşük konsantrasyonlarda biyolojik sistemler üzerinde geniş bir fizyolojik etkiye sahipken, yüksek konsantrasyonlarda hücreler için toksik etki oluşturabilir (8). Bu yüzden,

aydınlık getirilmesi gereken en önemli konulardan biri, borun eksik ve fazla alımlarında ortaya çıkacak durumlardır (40).

Borun tıpta kullanımına ilişkin kanıtlar giderek artmaktadır. Biriken kanıtlar, bor ve bor içeren moleküllerin günlük diyetle doğal antikanser ajanı veya potansiyel ilaçlar olabileceğini düşündürmektedir. Ancak borun sağlık açısından faydalı olabilmesi için hem in vitro hem de in vivo yeni yaklaşımlarla etki mekanizmalarının aydınlatılması gerekmektedir (8). Ayrıca, borik asitin oluşturduğu hücresel stres cevapları ya da biyolojik etki mekanizmaları da karakterize edilmelidir. Bu kapsamda çalışmamızda, HEK293 hücreleri model olarak kullanılarak borik asitin NF- κ B yolağını regüle edebilme kapasitesi araştırılmak istenmiştir.

Yeşil floresan protein (GFP) ekspresyonunun, akış sitometrik analizi, gen transfer nicelemesinin popüler bir yolu haline gelmiştir, çünkü bu teknik, hücre fiksasyonu veya numune hazırlama gereksinimi olmaksızın protein ekspresyon seviyesinin ve transfeksiyon verimliliğinin aynı anda ölçülmesine izin verir (44). Bu çalışmada kullanılan hücre hattında, NF- κ B transkripsiyon faktörünün bağlanacağı bir promötör bölgesi kontrolünde bulunan GFP ifadenme kaseti genoma entegre edilmiş şekilde bulunmaktadır. NF- κ B'yi aktive eden TNF α uygulaması, hücrelerin içerisinde yeşil floresan proteinin oluşumuna neden olmuştur. Daha sonra, bu floresan deteksiyonu akış sitometre sayesinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak, HEK293 hücrelerine tek başına borik asitin muamelesi kontrole kıyasla etkili bir fark oluşturmamışken, TNF α ile aktive edilen yolda borik asit muamelesinin NF- κ B aktivasyonunu azaltıcı yönde etkisi olduğu ortaya konmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Transkripsiyon faktörü NF- κ B, inflamatuvar yanıtı düzenleyen çeşitli hücrelerin transkripsiyonunu kontrol eden en önemli düzenleyicilerden biridir. İndüklenebilir transkripsiyon faktörlerinin NF- κ B ailesi, çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive edilir. En güçlü NF- κ B aktivatörlerinden biri olan TNF α , anahtar bir inflamatuvar sitokindir ve inflamatuvar süreçlerde ve immün yanıtların düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. NF- κ B aktivasyonunun düzenlenmesinde görev alabilecek yeni mekanizmaların araştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda bu doğrultuda daha önce araştırılmamış olan, borik asitin NF- κ B aktivasyonu üzerindeki etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu kapsamda HEK293 hücreleri model olarak kullanılarak borik asitin NF- κ B yolağını regüle edebilme kapasitesi araştırılmıştır. Bor biyolojik ortamlarda borik asit (H_3BO_3) formunda bulunur, yara iyileşmesi, iltihabın giderilmesi ve bağışıklık üzerinde olumlu etkileri bulunmakta ve inflamatuvar yanıtta rol almaktadır.

Bu çalışmada kullanılan hücre hattında, NF- κ B transkripsiyon faktörünün bağlanacağı bir promötör bölgesi kontrolünde bulunan GFP ifadenme kaseti genomu entegre edilmiş şekilde bulunmaktadır. NF- κ B'yi aktive eden TNF α uygulaması, hücrelerin içerisinde yeşil floresan proteinin oluşumuna neden olmuştur. Daha sonra, bu floresan deteksiyonu akış sitometre sayesinde tespit edilmiştir. HEK293 hücrelerinin genomuna entegre GFP proteini bulunduğundan, kontrol grubunda bir miktar GFP ekspresyonu gözlemlenmiştir. Belirli dozlarda TNF α verildiğinde, hücrelerde kontrol grubuna kıyasla 6-8 kat daha yoğun GFP ekspresyonu belirlenmiştir. 10 ng/ml TNF α uygulandığında, hücrelerde yeterince GFP ekspresyon yoğunluğunu arttırdığı gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$) ve diğer aşamalarda bu doz kullanılmıştır. Farklı dozlarda borik asit uygulanmış HEK293 hücrelerinin GFP yoğunluk ve kat yoğunluk değerlerinin analizi sonucunda ise, bazı hücrelerde kontrol grubuna kıyasla daha düşük GFP ekspresyon yoğunluğu gözlemlenirken, bazılarında GFP yoğunluk değerlerinin istatistiksel anlamda değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. TNF α ile farklı dozlarda borik asit birlikte uygulanmış HEK293 hücrelerinin GFP yoğunluğunun azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak, HEK293 hücrelerine tek başına borik asitin muamelesi kontrole kıyasla etkili bir fark

oluşturmamışken, TNF α ile aktive edilen yolakta borik asit muamelesinin NF- κ B aktivasyonunu azaltıcı yönde etkisi olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamız, sadece HEK293 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Borik asit tarafından NF- κ B regülasyonunun daha iyi anlaşılması için, bağışıklık sistemi hücreleri de dahil farklı hücre hatları veya in vivo deneyler yapılarak çalışmanın kapsamının genişletilmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Schottelius AJ, Baldwin AS Jr. A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis.* 1999, 14(1): 18-28.
2. Huxford T, Ghosh G. A structural guide to proteins of the NF-kappaB signaling module. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, 1(3): a000075.
3. Sel M, Erbaş O. Polifenolden zengin bitki ürünlerinin nükleer faktör-kappa B yolağı üzerine etkileri. *FNG & Bilim Tıp Dergisi* 2018, 4(4): 208-12.
4. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor-κB in autoimmunity. *Trends Immunol.* 2013, 34(6): 282-9.
5. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009, 1(6): a001651.
6. Kot, FS. Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2009, 8(1): 3-28.
7. Başkan S, Kanak EK, Yılmaz SÖ. Borun Antimikrobiyel Etkileri ve Gıdalarda Koruyucu Olarak Kullanım Olanaklarının Değerlendirilmesi. *Gıda* 2022, 47(3): 399-407.
8. Aydın T, Gönen B, Eseceli H. Bor'un İnsan Sağlığı ve Beslenme Üzerine Etkisi. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2018, 9(2): 119-22.
9. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia.* 2002, 16(6): 1053-68.
10. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 1988, 242(4878): 540-6.
11. Nennig SE, Schank JR. The Role of NFκB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol.* 2017, 52(2): 172-9.
12. Tripathi P, Aggarwal A. NF-κB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current science* 2006, 519-31.
13. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017, 2(1): 1-9.

14. Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, Arias D, Rolfo C, Trinh XB, van Dam PA. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017, 120: 141-50.
15. Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, Makarov SS. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95(23): 13859-64.
16. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med*. 2003, 9(5): 575-81.
17. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol*. 2014, 26(3): 253-66.
18. Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 1999, 18(49): 6867-74.
19. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2004, 82(7): 434-48.
20. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011, 12(8): 695-708.
21. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013, 42: 443-68.
22. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008, 132(3): 344-62.
23. Jimi E, Ghosh S. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev*. 2005, 208: 80-7.
24. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol*. 2013, 34(6): 282-9.
25. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016, 8(3): 227-41.
26. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013, 12: 86.

27. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006, 25(51): 6758-80.
28. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat F, Weil R. NF-κB: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2021, 12: 716469.
29. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004, 25(6): 280-8.
30. Zhang H, Sun SC. NF-κB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci*. 2015, 5: 63.
31. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001, 107(1): 7-11.
32. Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-κ B and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*, 2008, 47(5): 584-90.
33. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004, 25(6): 280-8.
34. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*. 2006, 22(2): 245-57.
35. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*. 2006, 210: 171-86.
36. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007, 19(2): 154-61.
37. Uluisik I, Karakaya HC, Koc A. The importance of boron in biological systems. *J Trace Elem Med Biol*. 2018, 45: 156-62.
38. Kuru R, Yarat A. Bor ve sağlığımıza olan etkilerine güncel bir bakış. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 2017, 7(3): 107-14.
39. Demirtaş A. Bor'un insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010, 41(1): 75-80.
40. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG. Both cIAP1 and cIAP2 regulate

TNF α -mediated NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(33): 11778-83.

41. Chen T, Zhang X, Zhu G, Liu H, Chen J, Wang Y, He X. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine (Baltimore)*. 2020, 99(38): e22241.
42. Haas TL, Emmerich CH, Gerlach B, Schmukle AC, Cordier SM, Rieser E, Feltham R, Vince J, Warnken U, Wenger T, Koschny R, Komander D, Silke J, Walczak H. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell*. 2009, 36(5): 831-44.
43. Keith MB, Farrell PJ, Iatrou K, Behie LA. Use of flow cytometry to rapidly optimize the transfection of animal cells. *Biotechniques*. 2000, 28(1): 148-54.
44. Uluisik I, Kaya A, Fomenko DE, Karakaya HC, Carlson BA, Gladyshev VN, Koc A. Boron stress activates the general amino acid control mechanism and inhibits protein synthesis. *PLoS One*. 2011, 6(11): e27772.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Kararı

