

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**İNSÜLİNOMA KÖKENLİ FARE BETA
HÜCRE HATLARINDA *TRAIL*'İN
APOPTOTİK ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Özlem YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

İNSÜLİNOMA KÖKENLİ FARE BETA HÜCRE HATLARINDA *TRAIL*’IN APOPTOTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Özlem YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU**

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2013.02.0122.010)**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 26/12/2014

Tez Danışmanı: **Prof.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : **Prof.Dr. Osman Nidai ÖZEŞ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye : **Yrd.Doç.Dr. Devrim Demir DORA**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2014 tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Tip 1 Diyabet'te (T1D), pankreatik beta hücrelerinin, progresif insülitis sürecinde, proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile yıkıldığı bilinmektedir. TNF ve FasL'in yanında, IFN-gama ve IL-1beta'nın da beta hücre ölümüne katkıda bulunarak T1D'in ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. 1995 yılında keşfedilen TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand'ın (TRAIL) ise, TNF ailesi üyesi diğer sitokinlerin aksine otoimmün reaksiyonları baskılayabildiği gösterilmiştir. Ancak TRAIL'in, beta hücrelerinin ölüm mekanizmasında da rol alıyor olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, TRAIL'in beta hücreleri üzerindeki etkisi, ve genel olarak T1D'teki kesin rolü henüz açığa çıkarılamamıştır.

Sonuçlarımız, kullandığımız NIT-1 fare beta hücre hattında TRAIL hücre yüzey reseptörlerinden DR5'in en yüksek oranda sentezlendiğini, DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin de belirgin oranda ifade edildiğini göstermiştir. Çalışmamızda, NIT-1 hücrelerinde TRAIL'in çözülebilir formunun (sTRAIL) orta derecede sitotoksik etki yarattığı gösterilmiştir. TRAIL inflamatuvar sitokinlerle birarada uygulandığında kısa dönemde (24 st) hücre canlılığını azaltıcı yönde ek bir etki göstermesine rağmen, uzun dönemde (48 st) bu etkinin kaybolduğu, koruyucu etkinin dahi ortaya çıkabildiği gözlenmiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, DR5 ölüm reseptörünün inflamatuvar sitokinlerin etkisi ile 48. saatte baskılandığı görülmüştür. NIT-1 hücreleri üzerinde TRAIL ligand ekspresyonu da yine proinflamatuvar sitokinlerin etkisi ile 24. ve 48. saatlerde baskılanmıştır.

Bulgularımız, NIT-1 pankreatik beta hücrelerinde proinflamatuvar sitokinler ile birlikte TRAIL uygulamasının, ilk aşamada ölüm oranının artırdığı, ancak sonrasında TRAIL'in bu hücrelerde inflamatuvar sitokinlerin etkisine ek olarak canlılığı inhibe edici etkisinin olmadığı, koruyucu etkinin dahi ortaya çıkabildiği gözlenmiştir.

Sonuçlarımızın TRAIL'in T1D'teki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, NIT-1 Hücreleri, TNF, IFN-gama, IL-1beta, Pankreatik Beta Hücreleri, İnsülitis, Tip 1 Diyabet

ABSTRACT

Destruction of pancreatic beta cells during the course of progressive insulinitis by the effects of proinflammatory cytokines is well acknowledged in Type 1 Diabetes (T1D). Besides TNF and FasL, IFN-gamma and IL-1beta have also been correlated with beta cell deaths in T1D development. It was shown, on the other hand, that another TNF family member, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), which was discovered in 1995, could suppress autoimmune responses. However, there are also indications on TRAIL's possible destructive role on beta cells as well. Thus, the precise effect of TRAIL on beta cells, and its general role in T1D is not yet fully revealed.

Our results showed that among the TRAIL transmembrane receptors, DR5 is expressed at the highest level on the NIT-1 mouse beta cell lines, while the substantial expression of DcR1 and DcR2 decoy receptors is also evident. We detected that the soluble form of TRAIL (sTRAIL) displayed an intermediate level of cytotoxicity in NIT-1 cells. When applied together with the proinflammatory cytokines TNF, IFN-gamma, and IL-1beta, TRAIL increased cell death in short term (24 hours), while no additional cytotoxic effect to that of the proinflammatory cytokines was observed in longer term (48 hours), along with some protective effect as well. In accordance with these findings, DR5 death receptor expression was suppressed at 48 hours with the effect of the inflammatory cytokines. We also observed suppressed TRAIL ligand expression on NIT-1 cells at 24 and 48 hours by application of proinflammatory cytokines.

Our results indicate that cytotoxicity caused by the proinflammatory cytokines was increased in NIT-1 pancreatic beta cell lines after simultaneous exposure to TRAIL ligand in short term. Later on in longer term, TRAIL displayed no additional cytotoxic effect, and also acted in a protective manner at some extent.

We believe that our results will contribute to the better understanding of TRAIL's role in T1D.

Keywords: TRAIL, NIT-1 Cells, TNF, IFN-gamma, IL-1beta, Pankreatic Beta Cells, Insulinitis, Type 1 Diabetes

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca emek veren, yol gösteren ve her zaman destek olan, ve ayrıca tez çalışmamda Müdürlüğünü yürüttüğü Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nin imkanlarından yararlanmama olanak sağlayan danışman hocam Prof.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca öğrettiği her deney için, hayat tecrübelerini de benimle paylaşan, manevi babam olarak gördüğüm Prof.Dr. Nidai ÖZEŞ'e,

Tez çalışmamda fikirleri ile katkıda bulunan Yrd.Doç.Dr.Devrim DEMİR DORA'ya,

Yüksek lisans çalışmamda gerektiğinde malzeme desteği sunan Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na,

Yüksek lisans ve eğitimimde her zaman bilgi ve birikimlerinden yararlanmamı sağlayan ve bilimsel araştırmaya teşvik eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof.Dr. Nidai ÖZEŞ, Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM, Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU, Prof.Dr. İbrahim KESER, Prof.Dr. Özgül ALPER, Prof.Dr. Fahri UÇAR, Prof.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU, Doç.Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN, Yrd.Doç.Dr. Esra MANGUOĞLU, Yrd.Doç.Dr. Mahmut AKYOL, ve Yrd.Doç.Dr. Sezin YAKUT'a,

Yüksek lisans tez çalışmamda önerileri ile katkıda bulunan ve bana daima araştırma azmi veren, fikirlerimi tartışabildiğim, her zaman sabır ve anlayış gösteren Arş. Gör. Kamil SAVAŞ'a,

Yüksek lisans tez çalışmamda önerileri ile katkıda bulunan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, ailem kadar yakın hissettiğim PhD. Dr. Sevim KAHRAMAN DİRİCE'ye,

Yüksek lisans tez çalışmamda önerileri ile katkıda bulunan Arş. Gör. Gökhan GÖRGİŞEN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Yüksek lisans tez çalışmalarım sürecinde inançları ve göstermiş oldukları sabır ve destek için sevgili aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1 TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)	2
2.1.1 TRAIL’ın Genel Tanımı	2
2.1.2 TRAIL Reseptörleri	3
2.1.3 TRAIL ve Reseptör İlişkisinin Önemi	4
2.1.4 TRAIL’ın Apoptotik Rolü	5
2.1.5 TRAIL’ın Apoptoz Dışı Rolü	5
2.2 Tumor-Necrosis Factor (TNF)	7
2.3 İnterferon-gama (IFN-gama)	9
2.4 İnterlökin-1beta (IL-1B)	10
2.5 Tip 1 Diyabet’te (T1D) Beta Hücre Yıkımı	11

MATERYAL ve YÖNTEMLER	15
3.1 Hücre Kültürü	15
3.2 Sitokin Uygulamaları	16
3.2.1 Sitokinlerin Sulandırılması	16
3.2.2 Hücrelerin Sitokin Uygulamaları İçin Hazırlanması	17
3.2.3 Uygulanan Sitokin Konsantrasyonları	18
3.2.4 MTT Canlılık/Proliferasyon Testi	18
3.2.5 Western Blot Analizi	19
3.2.6 İstatistiksel Analiz	22
BULGULAR	23
4.1 TRAIL, NIT-1 hücrelerinde 24 ve 48. saatlerde canlılıkta orta şiddette azalmaya yol açtı.	23
4.2 TNF uygulaması sonrası NIT-1 hücre canlılığında belirgin azalma gözlemlendi.	25
4.3 IFN-gama ile 24 ve 48 st muamele sonrası NIT-1 hücre canlılığında düşük oranda azalma gözlemlendi.	27
4.4 IL-1beta uygulaması sonrası NIT-1 hücre canlılığında azalma gözlemlendi.	29
4.5 TNF, IFN-gama, ve IL-1beta'nın ikili ve üçlü uygulamaları, NIT-1 hücrelerinde farklı düzeylerde ölüme yol açtı.	31
4.6 Proinflamatuvar sitokinlerle birlikte sTRAIL uygulaması, NIT-1 hücrelerinde 24. saatte canlılık oranlarında azalmaya neden olurken, 48. saatte ek sitotoksiste gözlenmedi.	33
4.7 NIT-1 hücrelerinin TRAIL ligand ve reseptör sentez profili belirlendi.	35
4.8 Sitokin uygulamaları, NIT-1 hücrelerinde 24. ve 48. saatlerde TRAIL ligand ekspresyonunu, 48. saatte ise DR5 ekspresyonunu baskıladı.	36

TARTIŞMA	41
SONUÇLAR	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ASH	:	Antijen Sunan Hücre
BID	:	BH3-Interacting Domain
B-KLL	:	B hücreli Kronik Lenfositik Lösemi
cIAP	:	cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins
DISC	:	Death-Inducing Signaling Complex
ERK	:	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FADD	:	Fas-Associated Death Domain
FasL	:	Fas Ligand
FBS	:	Fetal Bovine Serum
IFN-gama	:	İnterferon
IL-1beta	:	Interleukin-1 beta
IRAK	:	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
JNK	:	c-Jun N-Terminal Kinase
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
MTT	:	Methyl thiazol-diphenyl-tetrazolium bromide
MYD88	:	Myeloid differentiation primary response gene 88
NK hücreler	:	Natural Killer (Doğal Öldürücü) Hücreler
NOD	:	Non-Obese Diabetic (Obez Olmayan Diyabetik)
PBMC	:	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PVDF	:	Polyvinylidene DiFluoride
RANKL	:	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
RIP-1	:	Receptor-Interacting Protein-1
TAK-1	:	TGF-Beta Activated Kinase-1
THR	:	T Hücre Reseptörü
TNF	:	Tumor-Necrosis Factor
TR	:	TRAIL Receptor
TRADD	:	TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAF-2	:	TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAF-6	:	TNF Receptor-Associated Factor 6
TRAIL	:	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

sTRAIL : soluble (çözülebilir) TRAIL
STH : Sitotoksik T Hücresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	TRAIL proteininin yapısı	2
2.2.	TRAIL geninin organizasyonu	3
2.3	İnsanda ve farede TRAIL reseptörleri	4
2.4	TRAIL'ın apoptotik sinyal yolağı	5
2.5	TRAIL aracılı NFkB aktivasyonu	6
2.6	TRAIL aracılı PI3K ve MAPK aktivasyonu	7
2.7	TNF aracılı apoptoz modeli	8
2.8	TNF aracılı gen ekspresyon modeli	9
2.9	IFN-gama aracılı sinyal iletimi	10
2.10	IL-1 beta aracılı sinyal iletimi	11
2.11	T1D gelişiminde insülitis süreci ve CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin sitotoksik T hücrelerine (CTL) dönüşümü	12
2.12	T1D'te beta hücre yıkımı	13
3.1	Hücre sayımı.	17
4.1	L929 hücrelerinde farklı dozlarda sTRAIL uygulamasının hücre canlılığına etkisi	23
4.2	NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda sTRAIL uygulamasının hücre canlılığına etkisi.	24
4.3	NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda TNF uygulamasının hücre canlılığına etkisi	26
4.4	NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda IFN uygulamasının hücre canlılığına etkisi	28
4.5	NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda IL-1beta uygulamasının hücre canlılığına etkisi	30
4.6	NIT-1 hücrelerinde ikili ve üçlü sitokin uygulamalarının hücre canlılığına etkisi	32
4.7	NIT-1 hücrelerinde ikili ve üçlü sitokin kombinasyonlarının sTRAIL ile birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi	34
4.8	NIT-1 hücrelerinde belirlenen TRAIL ligand ve reseptör profili	35

4.9	NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası TRAIL ligandı ekspresyon oranları	37
4.10	NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası DR5 ölüm reseptörü ekspresyon oranları	38
4.11	NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası mDcR1 reseptörü ekspresyon oranları.	39
4.12	NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası mDcR2 reseptörü ekspresyon oranları.	40

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1	Western Blot için hazırlanan alt jel	20
Tablo 3.2	Western Blot için hazırlanan üst jel	20

GİRİŞ VE AMAÇ

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand'ın (TRAIL) beta hücre yıkımında rol oynayabileceği ileri sürülmektedir. Ancak Tip 1 Diyabet (T1D) gelişiminde TRAIL'ın yıkıcı rolüne işaret eden bulgular yanında, koruyucu rolüne işaret eden bulgular da mevcuttur. Dolayısıyla TRAIL'ın beta hücre yıkımında, ve genel olarak T1D oynadığı rol henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

T1D'te hücre ölümünün özellikle FasL, TNF, IFN-gama, ve IL-1beta sitokinlerinin NO moleküllerinin, ve serbest oksijen radikallerinin etkisi ile gerçekleştiği bilinmektedir. Proinflamatuvar siokinlerden TNF, IFN-gama, ve IL-1beta'nın insülitis sürecinde özellikle birarada etkilerinin beta hücrelerini T hücre aracılı yıkıma daha hassas hale getirdiği ileri sürülmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, TRAIL'ın T1D gelişiminde farklı şartlarda, ve insülitis sürecinde etkili olan diğer moleküllerin etkisiyle farklı etkiler gösterebileceği hipotez edildi. Bu hipotezimiz, glukoza duyarlı insülin salınımı gerçekleştirebilen NIT-1 fare beta hücre hatlarında araştırıldı. Bu çerçevede, TRAIL'ın NIT-1 hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması, bunun yanında insülitis sürecinde beta hücreleri üzerinde direk sitotoksik etkilerinin yanısıra beta hücrelerini ağırlıklı olarak T hücre aracılı yıkıma hassas hale getirdikleri düşünülen TNF, IFN-gama, ve IL-1beta proinflamatuvar sitokinlerin varlığında TRAIL'ın beta hücreleri üzerindeki etkisinde gözlenebilecek olası farklılıkları ortaya koymayı amaçladık.

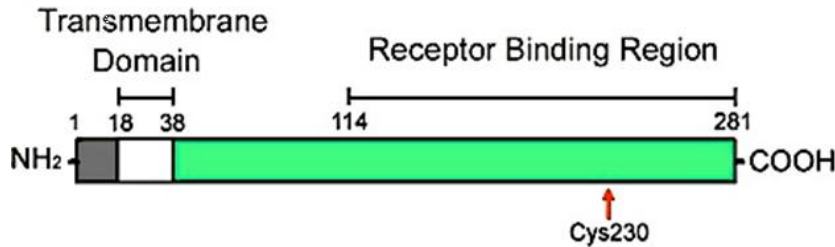
GENEL BİLGİLER

2.1 TRAIL

2.1.1 TRAIL'ın Genel Tanımı

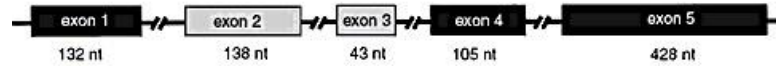
TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TNF ile ilişkili, Apoptoz İndükleyici Ligand: TRAIL/Apo2L/TNFSF10/CD253), 1995 yılında 2 ayrı araştırma grubu tarafından tanımlanmış olan, Tumor Necrosis Factor (TNF) ligand ailesi üyesi bir sitokindir. TRAIL, ekstraselüler biriminin FasL'a %28 oranında, ve TNF'e %23 oranında homoloji göstermesi ile tanımlanmış ve klonlanmıştır. Bir Tip 2 transmembran protein olan TRAIL'ın ekstraselüler karboksi-terminal birimi, sistein proteazlar ve matris metalloproteinaz-2 (MMP-2) tarafından proteolitik olarak kesilebilir, ve çözülebilir formda da salınabilir (sTRAIL) [1-4].

TRAIL proteini 281 amino asit uzunluğunda ve 32 kDa ağırlığındadır (Şekil 2.1). TRAIL, sitokinler, büyüme faktörleri, viral enfeksiyon, kromatin modifikasyonu, ve Sp1, Stat1, NF-kB, Egr-2/3 ve IRF-1/3/7 gibi bir dizi transkripsiyon faktörü tarafından regüle edilir. İnsanda varyantları tanımlanmıştır, ancak bu varyantların biyolojik önemi bilinmemektedir [5]. TRAIL'ın membran bağımlı ve çözülebilir formlarının birçok tümör ve kanser hücresinde seçici olarak apoptozu indükleyebildiği bilinmektedir. Normal hücreler ise genellikle TRAIL'ın sitotoksik etkilerine karşı dirençlidir [5]. Kristalografi çalışmaları ile, TRAIL proteini üzerinde trimer oluşturmak için kullanılan bölgede, fonksiyonel yapının, stabilitenin, ve biyolojik aktivitenin korunmasında önemli bir çinko bağlama bölgesi (Cys 230) tanımlanmıştır (Şekil 2.1) [6, 7]. Öyle ki, Cys 230 amino asiti alanin veya serin ile değiştirildiğinde, TRAIL'ın apoptozu indükleme kapasitesi önemli derecede etkilenmiştir [8]. TRAIL geni, 3 no.lu kromozomda 3q26'da lokalizedir ve 1769 bp uzunluğundadır (Şekil 2.2). Genin 5 ekzonu bulunur, ve cDNA'sının uzunluğu 1042 bp'dir [9].



Şekil 2.1 TRAIL proteininin yapısı [8].

Membran bağımlı TRAIL, NK hücreleri, T hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi aktif immün hücreler üzerinde yoğun olarak eksprese edilirken, çözülebilir TRAIL normal bireylerin serumunda tespit edilebilir, ve farklı hastalık durumlarında serumda seviyeleri değişebilir. Bunun yanında, TRAIL transkriptleri, timus, dalak, PBMC, prostat, over, ince barsak, kolon ve plasenta gibi farklı dokularda önemli miktarda tespit edilmiş, ancak beyin dokularında TRAIL transkriptine rastlanmamıştır. TRAIL'ın farklı varyantları olduğu bilinse de, fonksiyonları tam olarak açığa çıkarılamamıştır [10, 11].



Şekil 2.2 TRAIL geninin organizasyonu [8].

2.1.2. TRAIL Reseptörleri

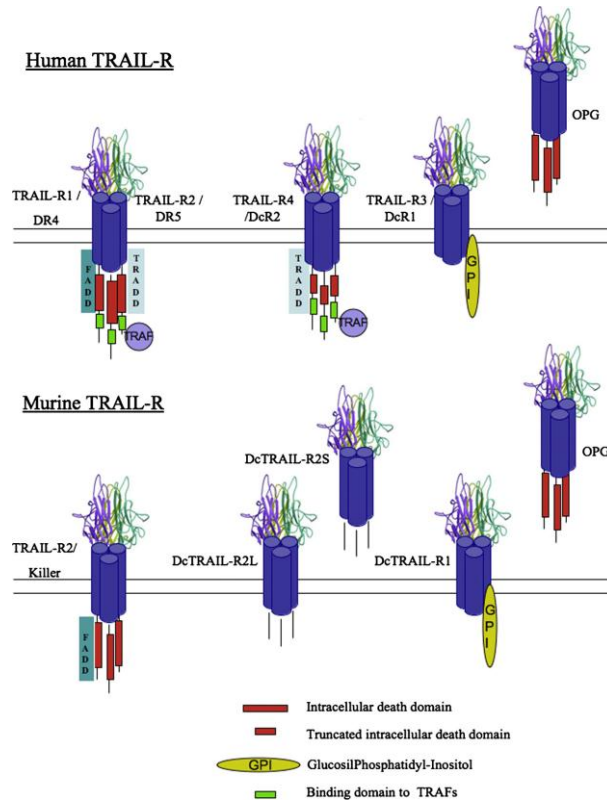
TRAIL, TNF ailesi üyesi olan diğer ölüm ligandlarından farklı olarak, birçok kanser hücresinde seçici olarak apoptozu indükleyebilen bir moleküldür. Bu özelliği nedeniyle, ilk tanımlandığı yıllarda TRAIL ile ilişkili araştırmalar genellikle yoğun olarak kanser üzerine sürdürülmüştür. Ancak elde edilen bulgular, bu molekülün normal hücreler üzerinde de apoptotik olmayan kompleks fonksiyonları olabileceğini göstermiştir [5]. Buna uygun olarak, ekspresyonları sıkı regülasyon altında tutulan TNF ailesi üyesi diğer sitokinlerin aksine TRAIL ligand ve reseptörleri, normal dokularda yaygın olarak ifade edilmektedir. Bunun yanında, diğer TNF ailesi üyelerinin genellikle 1 veya 2 reseptörü bulunmasına rağmen, insanda TRAIL'ın bağlanabildiği 5 farklı reseptör tanımlanmıştır (Şekil 2.3). Çoğu TNF ailesi üyesi molekül gibi, TRAIL, homotrimer oluşturmuş olan ilgili reseptörüne, yine homotrimer oluşturarak bağlanır [12]. TRAIL'ın apoptozu indükleyebilmesi için, sitoplazmik bölgelerinde ölüm birimi bulunduran agonistik TR1/DR4 ve TR2/DR5 transmembran ölüm reseptörlerine bağlanması gerekir [8]. TRAIL'ın bağlanabildiği diğer iki transmembran reseptör olan TR3/DcR1 ve TR4/DcR2 ise hücrede apoptotik yolu başlatamaz ve antagonistik/regülatör/yalancı reseptör olarak tanımlanırlar. TRAIL aynı zamanda, çözülebilir bir reseptör olan osteoprotegerine de bağlanabilir. Osteoprotegerinin asıl ligandı, RANKL molekülüdür, ve osteoklastogenezde rol aldığı düşünülmektedir [4, 7]. Farelerdeki tek TRAIL ölüm reseptörü olan mDR5, insandaki özellikle DR5 reseptörlerine %60 homoloji gösterir (Şekil 3). Farede aynı zamanda insandaki TRAIL antagonistik reseptörlerine homoloji gösteren transmembran mDcR1 ve mDcR2 yalancı reseptörleri yanında, mDcR2'nin çözülebilir bir izoformu da bulunur [13]. DR4 ve DR5 reseptörleri ile optimum sinyal iletiminin, reseptörlerin kümelenip lipid raftlar içinde agregasyonu ile gerçekleştiği bildirilmiştir [14].

2.1.3 TRAIL ve Reseptör İlişkisinin Önemi

TRAIL reseptörlerinin ilgili hücre yüzeyinde ekspresyon oranının, TRAIL'ın normal ve kanser hücrelerinde apoptoz, sağkalım, proliferasyon gibi farklı biyolojik etkilerini gerçekleştirebilmesinde önemli olduğu birçok araştırmacı tarafından

gösterilmiştir. Örneğin TRAIL dirençliliği gözlenen akciğer kanser hücrelerinde yüksek oranda ekprese edildiği gözlenen DcR2 reseptörü siRNA ile baskılandığında, hücrelerin TRAIL'a duyarlı hale geldiği gözlenmiştir [15, 16]. TRAIL'ın DcR2 reseptörüne bağlanması ile hücre içi anti-apoptotik NF- κ B yolunun aktive olabildiği gösterilmiş, sonraki çalışmalarla ölüm reseptörleri olarak bilinen DR4 ve DR5 de dahil olmak üzere her dört TRAIL reseptörünün de NF κ B aktivasyonu gerçekleştirebildiği gözlenmiştir [17-21].

Pankreatik beta hücreleri üzerinde sentezlenen TRAIL reseptör profili de, TRAIL'ın beta hücrelerinde indükleyebildiği sinyal yolları açısından önem kazanmaktadır. NOD farelerde diyabet gelişimi öncesinde, beta hücrelerinin %80 oranında temsil edildiği pankreatik adacıklarda DR5 ölüm reseptörünün yanısıra, koruyucu DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin de önemli miktarda ekprese edildiği gözlenmiştir [22]. Bu nedenle, TRAIL'ın beta hücreleri üzerindeki apoptotik ve diğer etkilerinin değerlendirilmesinde, hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyon profili de önem kazanmaktadır.

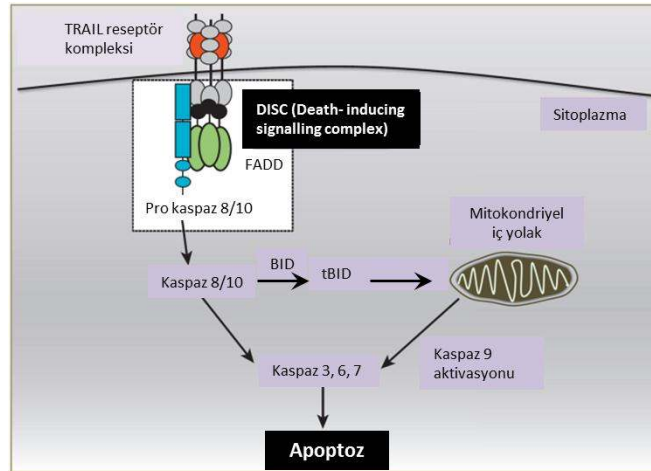


Şekil 2.3 İnsanda ve farede TRAIL reseptörleri [23].

2.1.4 TRAIL'ın Apoptotik Rolü

TRAIL'ın apoptotik etkisini gösterebilmesi için, DR4 veya DR5 ölüm reseptörlerine bağlanması gerekir [5] (Şekil 2.4). TRAIL'ın üçlü homodimer halinde bu reseptörlere bağlanmasını takiben, reseptör trimerizasyonu gerçekleşir ve sitoplazmik kısımda DISC (Death-Inducing Signaling Complex) oluşur [24]. Bu kompleksin içindeki FADD (Fas-Associated Death Domain) proteini aracılığıyla

prokaspaz-8 veya -10 bu kompleks ile bağlantıya geçebilir, ve otokatalitik aktivasyon gerçekleşir ve apoptoz tetiklenir [25]. Burada tarif edilen dış apoptotik yolak tip 1 hücrelerde apoptozu başlatmak için yeterlidir. Ancak tip II hücrelerde, apoptozun tamamlanabilmesi için DISC oluşumunu takiben proapoptotik BID (BH3 Interacting-Domain) proteininin kesimi ve bu yolla mitokondriyel iç yolağın da aktivasyonu gerçekleşir. Böylece apoptotik sinyal çoğaltılır ve apoptoz tetiklenir [5].



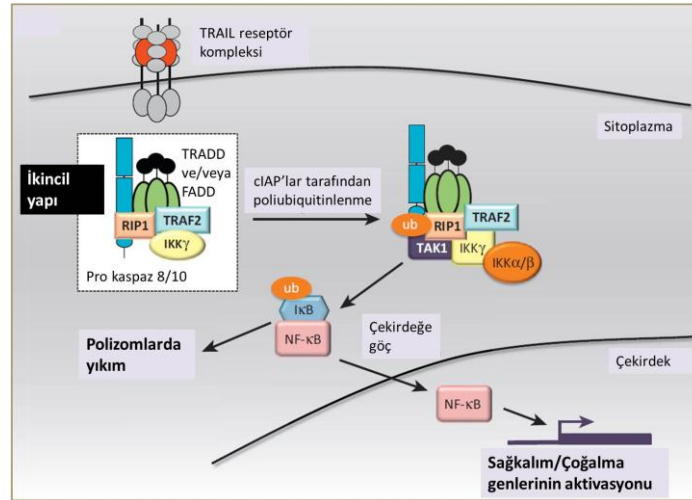
Şekil 2.4. TRAIL’in apoptotik sinyal yolağı. TRAIL’in, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanmasını takiben, sitoplazmik kısımda FADD, prokaspaz-8/prokaspaz-10 ile bir araya gelir ve DISC oluşur. Kaspaz aktivasyonu ile hücre ölümü başlatılır, ve tip I hücrelerde apoptoz tamamlanır. Tip II hücrelerde ise BID proteininin kesilmesi ve apoptotik sinyalin artırılması gerekir. Bu yolla mitokondriyel iç yolağın da aktivasyonu gerçekleşir [5, 26].

2.1.5 TRAIL’in Apoptoz Dışı Rolü

Diğer FADD bağlayan ölüm reseptörlerinin indüklediği sinyallerde görüldüğü gibi, TRAIL’in da apoptoz dışında, NF- κ B, MAP kinazlar, ve Akt aktivasyonu yoluyla hücrelerde büyümeyi, sağkalımı, proliferasyonu tetikleyebildiği gösterilmiştir [5]. TRAIL’in bazı tümörlerde anti-apoptotik etki gösterip tümör hücrelerinin sağkalımını/proliferasyonunu dahi tetikleyebileceği de bildirilmiştir [27]. Buna örnek olarak, B hücreli kronik lenfositik lösemide (B-KLL), lenfositlerle karşılaştırıldığında lösemi hücrelerinin yüzeyinde TRAIL ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlenmiş, buna bağlı olarak B-KLL hücrelerinin bir kısmının yaşam süresinin uzadığı ileri sürülmüştür [28, 29].

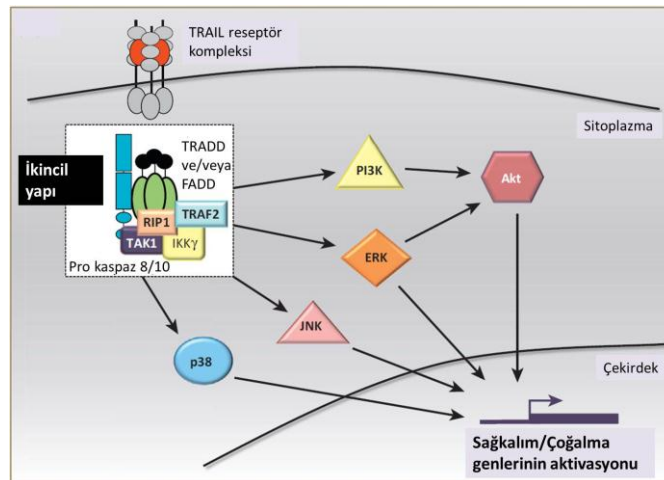
TRAIL’in apoptotik olmayan etkilerinin gözlemlendiği süreçte, reseptörüne bağlanmasını takiben ortaya çıkan DISC dışında, “ikincil yapı” (ikincil kompleks) adı verilen ikinci bir kompleksin de oluştuğu gösterilmiştir [5]. İkincil yapıda, DISC içinde de yer alan FADD proteini ve kaspaz 8/10 moleküllerinin yanı sıra, TRADD (TNF Receptor-Associated DD) ve TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor-2) ve RIP-1 (Receptor-Interacting Protein-1) proteinleri bulunur (Şekil 2.5). RIP1’in cIAP’ler (cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins) tarafından poliubiquitasyonu sonrası RIP1, TAK1 (TGF-beta activated kinase-1) ile etkileşime girer. TAK1 daha sonra IKK kompleksi inhibitörünü aktive ederek İ κ B’nin polizomal degradasyonuna ve NF-

kB'nin salınıp nukleusa giderek hücre çoğalması/sağkalım ile ilgili genlerin transkripsiyonuna olanak tanır [5].



Şekil 2.5. TRAIL aracılı NFκB aktivasyonu. TRAIL'in ilgili reseptörüne bağlanmasını takiben, DISC kompleksi dışında ikincil bir kompleks oluşumu gerçekleşir. İkincil yapıdaki etkileşimler sonucu çoklu ubiquitinasyona uğrayan RIP1 molekülünün ve TAK1 molekülünün aktivasyonları ve sonrasındaki süreç sonucunda, NF-κB'nin nukleusa göçü gerçekleşir. Çekirdeğe göçen NFκB, hücre sağkalımı/çoğalması ile ilgili genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir [5, 26].

TRAIL'in indüklediği sinyal yolları aynı zamanda ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), ve p38 gibi MAP kinazların aktivasyonunu da sağlayabilir, PI3K aktivasyonu ile Akt fosforilasyonu indüklenebilir (Şekil 2.6) [5]. Akt'nin NFκB'yi de aktive edebildiği, ve NFκB'nin sağkalım ve çoğalmanın yanında hücre ölümünü de tetikleyebildiği bilinmektedir [30, 31]. Bu nedenle, TRAIL sinyal yolağında oluşan ikincil kompleksin, sadece hücre sağkalımı ve çoğalmasını etkilemediği, hücre ölümünü de tetikleyebileceği ileri sürülmektedir.



Şekil 2.6. TRAIL aracılı PI3K ve MAPK aktivasyonu. TRAIL sinyal yolağında oluşan sekonder kompleks, PI3K ve MAPK sinyal yollarını da tetikleyebilir [5, 26, 32].

Yakın tarihli çalışmalarla, TRAIL'in apoptoz dışı etkilerine önemli bir örnek olarak, inflamasyon ile ilişkisi belirlenmiştir [5, 27]. Bulgular, TRAIL'in immun sistemde, enfeksiyonda, ve otoimmun hastalıklarda homeostazı sağladığı yönündedir, ki bu durumların tümü inflamasyon ile ilişkilidir. Öyle ki, TRAIL'in diyabet, obezite, ve metabolik hastalıklar ile ilişkili olarak tanımlanan fonksiyonlarının, kanser, obezite, diyabet, ve inflamasyon arasında muhtemel bir ilişkiye işaret ettiği düşünülmektedir [5, 33, 34]. Ayrıca, TRAIL'in endotel hücre proliferasyonunu tetikleyebildiği, vasküler düz kas hücrelerinde ise pro-inflamatuar sitokinlerce tetiklenen apoptoza karşı sağkalımı, migrasyonu ve proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir [35, 36]. Bunların yanında, immun sistemin önemli bir komponenti olan TRAIL'in otoimmun diyabet gelişim sürecinde de rol aldığı düşünülmektedir. Bu rolün açığa çıkarılabilmesi için yürütülen çalışmalardan bir kısmı, TRAIL'in pankreatik beta hücreleri üzerinde yıkıcı rol oynayabileceğine işaret etmiş, ancak TRAIL'in bu hücreler üzerinde koruyucu etkisi olabileceğine dair sonuçlar da bildirilmiştir. Bugün bulgular ağırlıklı olarak koruyucu role işaret etmektedir.

2.2 Tumor-Necrosis Factor (TNF)

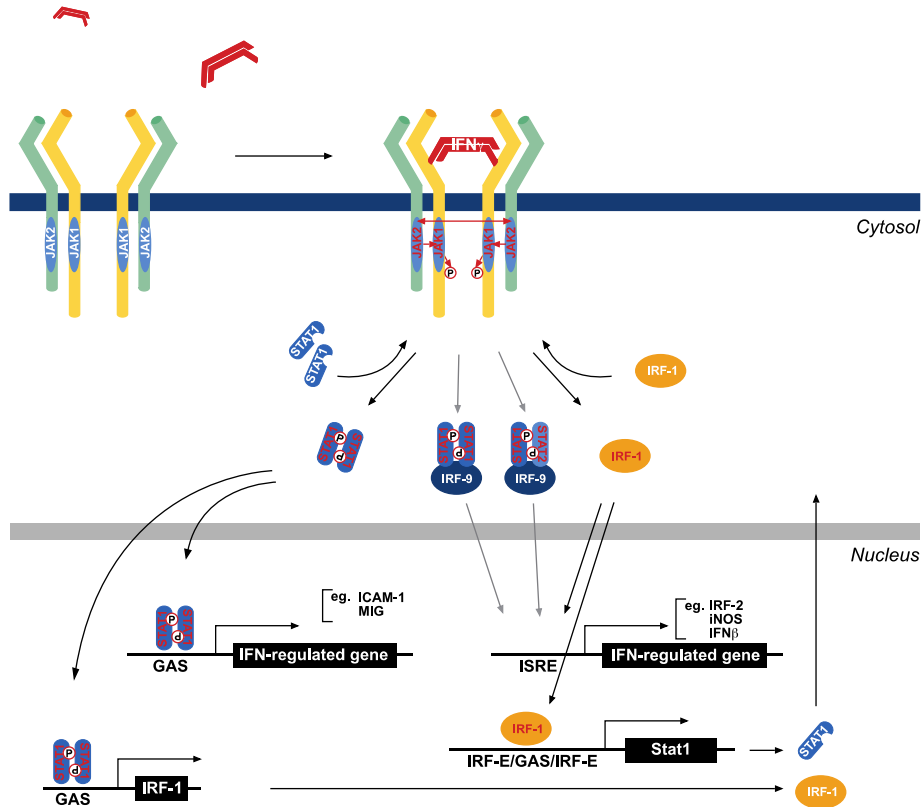
TNF, birçok tümör hücre hattı üzerinde önemli sitotoksositeye neden olduğu gözlenen, immun sistemin aktivasyonu sonrasında makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilen çözülebilir bir sitokin olarak tanımlanmıştır [37]. TNF genel olarak makrofajlar tarafından salınsa da, lenfoid hücreler, mast hücreleri, endotel hücreler, fibroblastlar, ve nöronal dokuda da TNF salgılandığı bilinmektedir. Intraselüler patojenlerin tespit edilmesini takiben, doku makrofajları ve T hücreleri, membran-ilişkili TNF (mTNF) veya proteolitik olarak üretilen çözülebilir TNF (sTNF) salgılar. TNF, kemokin ve sitokinlerin lokal ekspresyonunu tetikler, ve lökositlerin adhezyonunu, extravazasyonunu, ilgili bölgeye çekimini, ve aktivasyonunu indükler. Bunu takiben TNF, doğal immuniteden kazanılmış immuniteye geçişi, antijen sunumunu ve T hücre kostimülasyonunu kolaylaştırır. TNF'in yüksek konsantrasyonları şok benzeri semptomlara yol açarken, düşük konsantrasyonlarda uzun süreli ekspresyonu, kas ve yağ dokusunun kaybı ile karakterize olan kaşeksi durumuna neden olur [37].

Memelilerde TNF, iki ayrı hücre yüzey reseptörü aracılığıyla ilgili hücre içi sinyalleri başlatabilir: TNFR1, sTNF için primer reseptör iken, TNFR2, mTNF için temel reseptördür [38]. Hücrelerin büyük çoğunluğunda, TNFR1 TNF sinyalinin anahtar aracı reseptörü olarak ortaya çıkarken, TNFR2'nin lenfoid sistemde önemli rol oynadığı bilinmektedir [37]. Bu reseptörlerin indüklediği sinyal yolları arasında, I κ B kinaz, c-Jun N-terminal kinaz (JNK), p38 veya p42/44 mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) yolları sayılabilir. Bu yollar, NF κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gen ekspresyonunun kontrolünü sağlar [38].

TNF homotrimerik şekilde, yine trimerize haldeki TNFR1 reseptörüne bağlandığında, TRADD (TNFR-associated DD) molekülü, reseptörün sitoplazmik ölüm birimine (DD) bağlanır. Bunu takiben, sekonder adaptörler RIP1, TRAF2, veya TRAF5'i çeker. Bu bağlanma, IKK komplekslerinin aktivasyonuna yol açar. IKK kompleksi, IKK α , IKK β , ve NEMO'dan oluşur (Şekil 2.7). IKK, NF κ B inhibitörü olan ve NF κ B'nin sitoplazmada kalmasını sağlayan I κ B molekülünün fosforilasyonu ve degradasyonunu indükler, ve NF κ B aktivasyonu gerçekleşir. TNFR1'in tersine, TNFR2, TRAF2'ye direk olarak bağlanır, ve IKK ve JNK moleküllerini aktive eder.

farklı bir reseptöre bağlanır, ve kromozom üzerinde farklı bir bölgede kodlanır. Önceleri, sadece CD4⁺ tip 1 T helper (Th1) lenfositlerin, CD8⁺ sitotoksik lenfositlerin, ve NK hücrelerinin IFN-gama salgıladığı düşünüldüyse de, yapılan çalışmalar, B hücreleri, NKT hücreleri, ve profesyonel antijen-sunan hücrelerin de IFN-gama salgıladığını göstermiştir. NK hücreleri ve ASH'ler tarafından salgılanan IFN-gama molekülleri, enfeksiyona karşı erken konakçı savunmasında önemli iken, adaptif immun cevapta IFN-gama salgılayan temel hücreler T lenfositlerdir [40].

IFN-gama, iki IFNGR1 ve IFNGR2 zincirinden oluşan IFNGR reseptörüne bağlanır. IFN-gama'nın reseptörüne bağlanması ile, reseptörde meydana gelen konformasyonel değişiklik sonucu inaktif Jak2 kinaz otofosforilasyon geçirerek aktive olur. Jak2 daha sonra Jak1 trans-fosforilasyonunu gerçekleştirir. Aktive olan Jak1, her bir IFNGR1 zincirinde Tyr440'ları fosforiller ve Stat1'in Src homoloji domainleri (SH2) için bağlanma bölgeleri ortaya çıkar. Reseptöre gelen ikili Stat1 molekülleri, fosforilasyonla homodimerler olarak ayrılır, nükleusa gider, ve IRF-2, iNOS, ve IFN-beta gibi, IFN-gama ile regüle edilebilen genlerin transkripsiyonunu indükler veya baskılar.



Şekil 2.9 IFN-gama aracılı sinyal iletimi [40].

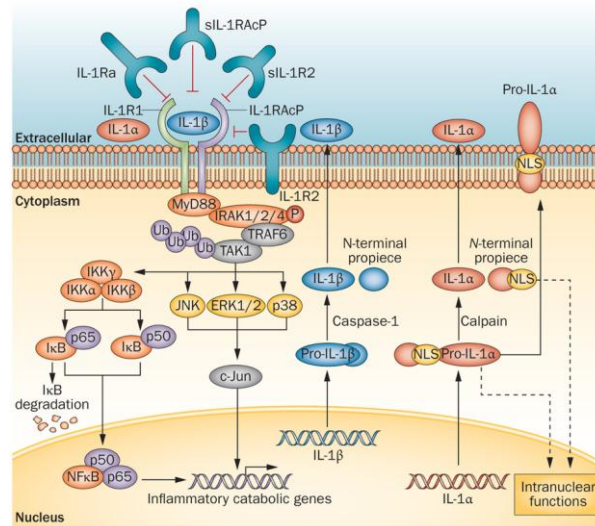
2.4 İnterlökin-1beta (IL-1B)

IL-1, 1940'larda aktive lökositler tarafından salınan, ateş yükselmesini indükleyen bir molekül olarak tanımlanmıştır [41]. IL-1alfa ve IL-1beta olmak üzere iki tipi vardır. Amino asit dizisi homolojileri %27 civarında olsa da, IL-1alfa ve IL-1beta'nın benzer üç boyutlu yapıları vardır. Her ikisi de stimüle olmuş monositler ve

makrofajlar tarafından üretilir, ancak nötrofiller, keratinositler, epitel ve endotel hücreler, lenfositler, düz kas hücreleri ve fibroblastlarda daha düşük seviyelerde IL-1 alfa veya IL-1beta salgılayabilir [42, 43]. İki proteinin hücresel lokalizasyon paternleri, ve olgunlaşma ve sekresyon süreçleri farklıdır. IL-1beta, hücrelerde kaspaz 1 aracılığıyla işlenir ve salınır.

IL-1beta, tıpkı IL-1alfa gibi, biyolojik etkilerini gerçekleştirebilmek için IL-1 reseptör tip 1'e bağlanır (IL-1RI). Bu reseptör, birçok hücre tipinin yüzeyinde eksprese edilir. IL-1beta, bu reseptöre bağlandıktan sonra ikinci bir reseptör zincirinin bağlanmasını takiben, bir dizi intraselüler adaptör molekül buraya çekilir. Bu moleküller arasında, miyeloid farklılaşma faktörü 88 (MYD88), IL-1R ile ilişkili kinazlar (IRAK), ve TNF-receptor-associated factor 6 (TRAF6) bulunur. Bu sinyal yolağı sonrasında NFkB, p38, c-Jun N-terminal kinazlar (JNK), ERK, ve MAPK proteinleri aktive olur.

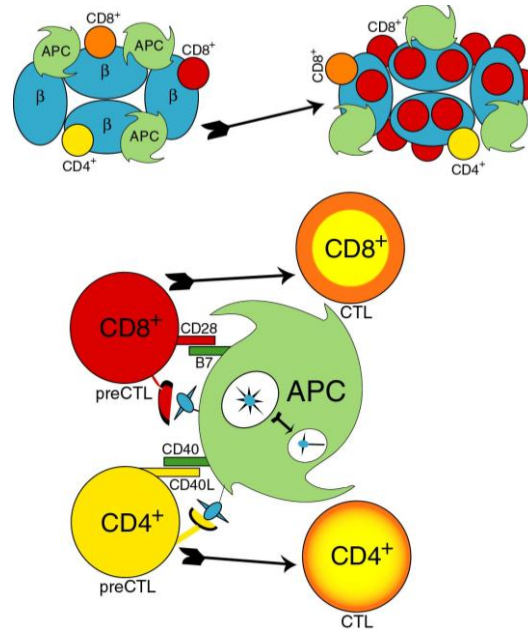
IL-1beta, yine IL-1alfa gibi bir proinflamatuvar sitokindir. Hem lokal hem de sistemik cevapları stimüle eder. Kronik inflamatuvar hastalıklar ve septik şok gibi durumlarda etkisi yıkıcı olabilir. Ancak, IL-1beta'nın etkisi enfeksiyon kontrolünde de esansiyeldir. Endotel hücreler üzerinde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyerek, ve stromal hücreler tarafından fosfolipaz A2, siklooksijenaz 2, ve iNOS sentaz gibi kemokin salınımını tetikleyerek inflamatuvar hücrelerin inflamasyon sahasına gelmesini indükler. Bu süreç sonucunda, inflamatuvar aracı moleküller olan prostaglandin E2 ve NO salınır, bu da lokal ve sistemik cevaplara katkıda bulunur. Sistemik etkileri arasında hipotansiyon, ateş, nötrofili, ve trombositoz sayılabilir. Bu etkilerin bazıları, diğer sitokinler ve inflamatuvar aracı moleküllerin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirilir. IL-1beta, adaptif immun cevabın regülasyonunda da göreve alır.



Şekil 2.10 IL-1beta aracılı sinyal iletimi [44].

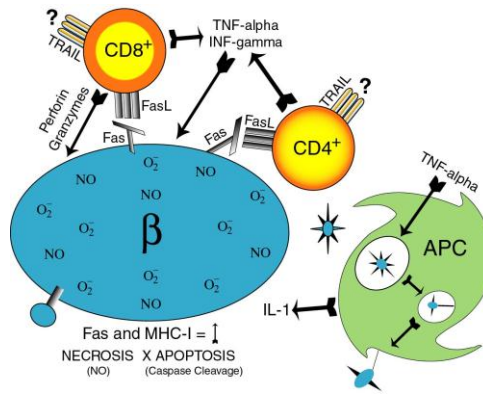
2.5 Tip 1 Diyabet'te (T1D) Beta Hücre Yıkımı

Tip 1 diyabet (T1D), pankreatik beta hücrelerine karşı ortaya çıkan otoimmün saldırının sonucu olarak beta hücre kaybı ve insülin yetersizliği ile karakterizedir. Bu süreçte insülitis (adacıkların immün sistem hücreleri tarafından kuşatılması ve işgal edilmesi), ve spesifik olarak adacıklardaki beta hücrelerinin yıkımı gerçekleşir. T1D'in patogenezi, Şekil 2.12'de özetlenmiştir [45]. T1D'te bugün bilinen bilgilerin önemli bir kısmı, T1D'e yakın hayvan modelleri olarak bilinen, ve insandaki T1D patogenezinin çok yakın bir hastalık süreci sergileyen Non-Obez Diyabetik farelerden (NOD fareler) elde edilmiştir. Bu fare modellerinde insülitisin, hayvanın sütten kesilmesinden sonra başladığı, bölgeye öncelikle makrofajların geldiği ve sonrasında T ve B lenfositlerinin varlığının belirginleştiği, ve immün reaksiyonun beta hücre yıkımına dek sürdüğü gözlenmiştir. Beta hücrelerine karşı immün reaksiyonun, self-tolerans bozukluğunun yanı sıra, Antijen Sunan Hücreler'i (ASH) ve lenfositleri adacıklara çeken çeşitli sinyaller aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir. Sitokinler ve kemokinler, oto-reaktif hücrelerin adacıklara çekilmesinde, burada tutulmasında ve otoimmün cevabın artırılmasında etkilidir [46]. NOD farelerde otoimmunitenin ilk sinyalleri, Langerhans adacıklarının periferinde makrofaj ve dendritik hücre varlığı ile ortaya çıkar. Bu süreç, diyabet gelişiminde "1. kontrol noktası" olarak tanımlanmıştır. Uzun insülitis süreci sonrasında, üzerlerinde yüksek afiniteli T hücre reseptörleri (THR) bulunduran otoreaktif CD8⁺ sitotoksik T hücreleri (STH) selektif olarak çoğalırlar. Lokal ASH'lerin yüzeyindeki peptit-MHC1 kompleksleri THR'ler tarafından tanınır, ve yüksek afiniteli CD8⁺ STH öncülleri, STH'ne farklılaşır (Şekil 2.11). Bu süreçte lökositlerin periferik birikimleri ve muhtemelen değişen kemokin ekspresyonları ile insülitis peri-insular alandan adacıkların iç kısımlarına kayar. Periferik insülitisten invaziv insülitise değişim, beta hücre kitlesinin yıkımının başlangıcı kabul edilen "2. kontrol noktasını" temsil eder [46].



Şekil 2.11. T1D gelişiminde insülitis süreci ve CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerin sitotoksik T hücrelerine (CTL) dönüşümü [45].

Beta hücre yıkımında birçok farklı faktörün birlikte etki gösterdiği kabul edilmektedir (Şekil 2.12). Bu modele göre, Fas/FasL etkileşimi, TNF, IL1-beta, IFN-gama, ve Nitrik Oksit (NO) gibi efektör moleküller, beta hücre ölümüne katkıda bulunan faktörler arasındadır [47-49]. Bunun yanında, adacıklara infiltrate olan sitokin kaynağı CD4+ ve CD8+ T hücreleri, özellikle güçlü bir makrofaj aktivatörü olan interferon gama (IFN-gama) salgılar. IFN-gama'nın beta hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin, IL-1beta ve TNF aracılığıyla açığa çıktığı gösterilmiştir. Beta hücrelerinde NF-kB aktivasyonu sonrası indüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz'ın (iNOS) arttığı gösterilmiştir. Rat adacıklarında, IL-1beta'nın tek başına iNOS ekspresyonunu artırabildiği, ancak hem insan hem de fare adacıklarında IL-1 ve IFN-gama birlikte etki etmediği sürece iNOS'un ekspresyonunun olmadığı gözlenmiştir [46]. Pro-inflamatuar sitokinlerin, T1D patogenezi sırasında beta hücreleri üzerindeki direk yıkım etkisi yanında, bu hücreleri sitotoksik T hücreleri tarafından yıkıma duyarlı kıldığı düşünülmektedir [50]. Bu konudaki veriler bütün olarak değerlendirildiğinde, spesifik olarak TNF, IL1-beta, ve IFN-gama'nın pankreatik beta hücrelerini otoimmün yıkıma daha hassas hale getirdikleri kabul edilmektedir [51]. Ancak proinflamatuar sitokinlerin beta hücre yıkımına nasıl sebep olduğu henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır [46]. Bu sitokinlerin beta hücreleri üzerindeki etkilerinin tam olarak bilinmesi, hem hastalık oluşum mekanizması hakkında daha fazla bilgi sağlayacak, hem de yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.



Şekil 2.12 T1D'te beta hücre yıkımı [45].

İmmün sistemin önemli bir komponenti olan TRAIL'in da beta hücre yıkımında rol alıyor olabileceğine yönelik bulgular bildirildi. Örneğin insan normal pankreas dokusunda yüksek TRAIL ekspresyon seviyelerinin beta hücre ölümü ile korelasyon gösterdiği bulundu [52]. Bunun yanında, NOD farelerde STZ ile hızlandırılan diyabette yıkıcı insülitis gelişimine paralel olarak pankreatik beta hücrelerinde TRAIL ligandının ve DcR1 yalancı reseptörünün ekspresyonunda önemli artış olduğu gözlemlendi [22]. Mi ve ark. da, NOD farelerin pankreatik adacıklarında TRAIL ekspresyonunun, kontrol olarak kullanılan 13 haftalık NOD.SCID farelere ve 8-9 haftalık NOD farelere (insülitis safhası) göre yıkıcı insülitis safhasında (15 haftalık NOD farelerde) artış gösterdiğini bildirmiştir [53]. Bunun yanında, beta hücresi antijenine spesifik CD4⁺ ve CD8⁺

sitotoksik T hücre klonlarında TRAIL ekspresyonu gözlenmiştir. Bu gibi bulgular, TRAIL'ın beta hücre eliminasyonunda rol alabileceğini düşündürmüştür.

Ancak ilk bakışta TRAIL'ın beta hücrelerindeki apoptotik ölümlere aracılık ediyor olabileceği şeklinde yorumlanabilecek olan bu bulgular, özellikle yıkıcı insülitis sürecinde aktive edilen ve özellikle sitotoksik T lenfositlerine karşı geliştirilen TRAIL aracılı bir savunma sisteminin de göstergesi olabilir. Nitekim, 3 haftalık NOD farelerden izole edilen adacıklar farklı konsantrasyonlarda rekombinant çözülebilir TRAIL ile muamele edildiğinde apoptotik etkiye rastlanmamıştır. Bu durum, TNF ve IFN-gama ile gözlenenin aksi bir sonuçtur [53]. Tip 1 diyabette (T1D) TRAIL'ın fonksiyonunun belirlenmesine yönelik bir başka çalışmada, TRAIL eksprese etmeyen C57BL/6 fareler kullanılmış, ve çoklu düşük doz STZ uygulamasını takiben, bu farelerde normal farelere oranla T1D'in çok daha erken dönemde ve şiddetli olarak geliştiği gösterilmiştir [54]. Bunun yanında, TRAIL-/- farelerde, diyabet ile ilişkili birçok komplikasyon geliştiği bildirilmiştir [55]. Ayrıca, insan ve fareden izole edilen periferik mononükleer hücrelerde rekombinant TRAIL uygulaması, STZ aracılı T1D'in şiddetini azaltmıştır [56]. Bunun yanında, adenoviral vektörlerle yüksek TRAIL ekspresyonu sağlanmış olan rat pankreatik adacıklarının diyabetik ratlara transplantasyonu sonrasında, insülitis şiddetinin azaldığı, ve allograft ömrünün uzatılıp fonksiyonunun güçlendiği gözlenmiştir [57]. Diyabet indükleyici ajan Siklofosamid'in (CY) TRAIL molekülünün ekspresyonunu güçlü oranda baskıladığı da görülmüştür [22]. Siklofosamid'in diyabet indükleyici etkisi, Treg hücrelerinin fonksiyonlarının baskılanmasına dayanır. Bu özelliği yanında TRAIL molekülünü de baskılaması, bu ajanın etki mekanizması hakkında önemli bir ek bulgu sağlamasına ek olarak, TRAIL baskılanmasının diyabeti hızlandırdığına dair de önemli bir gösterge niteliğindedir.

Tüm bu çalışmalar, bugün TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki etkisini tam olarak açığa çıkaramamıştır. Bu etkinin, farklı koşullarda ve hastalık gelişim sürecinde farklı basamaklarda değişebileceği de düşünüldüğünde, bu konuda yapılacak aydınlatıcı ek çalışmalar, hem diyabetin mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilecek, hem de diyabette terapötik etkisi dahi olabileceği düşünülen TRAIL molekülünün bu olası potansiyeli daha iyi anlaşılabilir. Aslında TRAIL'ın insanda diyabet gelişiminde yıkıcı rol oynayabileceğinin düşünülmesi, büyük oranda, diyabetin ilerleyen evrelerinde TRAIL miktarında gözlenen artışa dayanmaktadır. Çünkü primer insan beta hücrelerinin genel olarak TRAIL'ın apoptotik etkisine karşı dirençli olduğu bilinmektedir [58]. Bununla bağlantılı olarak, TRAIL ölüm yolunun aslında insan adacık beta hücrelerinde mevcut ve fonksiyonel olduğu, ancak normal adacık hücrelerinde TRAIL ölüm yolunu inhibe eden tanımlanmamış inhibitörler olduğu vurgulanmıştır. TRAIL ligandının ve bu liganda ait tüm transmembran reseptörlerinin insan beta hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu aşamada akla başka bir soru gelmektedir. Normalde insan primer beta hücrelerinde inaktif durumda bulunduğu varsayılan TRAIL ölüm yolu, farklı şartlar altında TRAIL hücre yüzey reseptörlerinin veya hücre içi bazı apoptotik inhibitörlerin ekspresyon oranlarının değişmesi ile aktive olabilir mi? Öyle ki, insulinoma kökenli CM ve HP62 insan beta hücre hatlarında TRAIL'ın FasL, TNF, Lta1b2, Lta2b1, ve IFN-gama'dan çok daha fazla sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir [58]. Bu hücrelerin TRAIL reseptör antagonistleri ile muamelesi, TRAIL'ın sitotoksikitesini bloke edebilmiştir. Bu gibi çalışmalarla, farklı özelliklere sahip beta hücre hatlarında yapılan çalışmalardan önemli bilgiler elde edilebilmektedir. Ticari olarak ulaşılabilen, ve insülin eksprese eden sınırlı sayıda beta hücre hattı bulunmaktadır. Bunlara bir örnek teşkil eden insulinoma kökenli

Min 6 fare beta hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, TRAIL'ın bu hücrelerde apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Bunun yanında, TNF ve IFN-gama ile muamele edilen Min 6 hücrelerinde TRAIL ekspresyonunun artışı dikkat çekmiştir [53]. TRAIL'ın apoptotik etkisinin daha fazla sayıda beta hücre hattında test edilmesi, farklı özelliklerin bu etkiyi nasıl değiştirdiğinin anlaşılması için önemli olacaktır.

Bu tez çalışmasında, hipotezimizi bu çerçevede kurduk ve NIT-1 insülinoma kökenli hücre hatlarında TRAIL'ın apoptotik etkisini ve TNF, IFN-gama, ve IL-1beta moleküllerinin etkisiyle TRAIL ekspresyonunda meydana gelebilecek olası değişiklikleri araştırdık.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Hücre Kültürü

NIT-1 Hücreleri:

NIT-1 hücreleri ATCC'den temin edildi ve %5 CO₂ ve %95 nem bulunan ortamda, 37°C sıcaklıkta T25 flasklarda üretildi. NIT-1 hücreleri, on haftalık dişi NOD farelerin pankreatik Langerhans adacıklarından elde edilen insulinoma kökenli adheren hücrelerdir.

L929 Hücreleri:

L-929 hücreleri ATCC'den temin edildi ve %5 CO₂ ve %95 nem bulunan ortamda 37°C sıcaklıkta T25 flasklarda üretildi. L-929 hücreleri, 100 günlük 3CH/An erkek farelerin subkutan bağ dokusundan elde edilen, kültüre edildiklerinde fibroblastik ve adheren özellik gösteren hücrelerdir. TRAIL'in apoptotik etkisine duyarlı oldukları bilinmektedir.

Kullanılan Solusyonlar:

F12-K Ham's Besiyeri:

NIT-1 hücrelerinin kültüründe kullanıldı. Bir şişe toz besiyeri (Sigma, N3520) 900 ml distile su içinde içine karıştırıcı atılarak çözüldü. Çözölmeye devam ederken içine 2,5 g sodyum bikarbonat (NaHCO₃; Sigma S5761) eklendi ve pH'sı 7.2'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı. Besiyeri steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirildi ve final konsantrasyonu %10 oranında olacak şekilde 100 ml inaktif FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom AG; S0115) ve final konsantrasyonu %1 olacak şekilde 10 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin solüsyonu (Biological Industries) ilave edildi.

DMEM Besiyeri:

L929 hücrelerinin kültüründe kullanıldı. Hazırlanması için bir şişe toz besiyeri (Sigma D5648; 4,5 g/l glukoz ve L-glutamin) ve 3,6 g sodyum bikarbonat 900 ml distile su içerisinde çözüldü ve 1 litreye tamamlandı. Steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirildikten sonra, final konsantrasyonu %1 olacak şekilde 10 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin solüsyonu (Biological Industries) eklendi. Serumlu DMEM için %10 oranında 100 ml inaktif FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom AG; S 0115) ilavesi yapıldı.

Phosphate Buffer Saline (PBS) Solüsyonu:

8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartıldı ve 800 ml distile su içinde çözüldü. Solüsyonun pH'sı NaOH ile 7.4'e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon steril kabinde 0,22 µm vakumlu filtreden geçirildi.

Tripsin-EDTA Solüsyonu:

10X Tripsin-EDTA solüsyonu (Biochrom AG; L2153), PBS ile 10 kat seyreltilerek 1X konsantrasyonda kullanıldı.

Hücrelerin Pasajlanması:

T25 flasklarda üretilen hücreler, flask yüzeyinin yaklaşık %80'ini kapladıklarında pasajlandı. Bunun için, besiyeri çekilerek atıldıktan ve 5 ml PBS ile yıkandıktan sonra, 1 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 3-5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler yüzeyden ayrılmaya başlayınca 5-10 ml serumlu besiyeri ile süspanse edilerek santrifüj tüpüne alındı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve çökelti 20 ml serumlu besiyerinde homojenize edilerek 4 adet T25 flaska dağıtıldı. NIT-1 hücrelerinin besiyeri her 3 günde bir tazelandı. L929 fibroblastik hücre hattı çok hızlı ürettiğinden dolayı hergün besi yeri değiştirilerek yaklaşık 2 günde 1 pasaj yapıldı.

Hücrelerin dondurulması:

T25 flaskların yüzeyini yaklaşık %80 oranında kaplayan hücreler, PBS ile yıkanıp Tripsin-EDTA solüsyonunda 3 ila 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra serumlu besiyeri ile süspanse edildi ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra çökelti, %10 DMSO ve FBS karışımıyla süspanse edilerek Cryo.s™ tüplere bölündü (1 T25 flasktan yaklaşık 3 adet). Alkol kaplarında 1 gece -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2 Sitokin Uygulamaları**3.2.1 Sitokinlerin Sulandırılması****sTRAIL:**

Liyofilize halde satın alınan fare çözülebilir aktif TRAIL proteini (sTRAIL) (Peprotech, 315-19), 100 µl steril su eklenerek, final konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Elde edilen stok, 10'ar µl alikotlandı. Alikotlardan biri uygulama için ayrılıp final konsantrasyonu 100 ng/µl olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı ve uygulamalar süresince +4°C'de tutuldu. Diğer alikotlar -20°C'de saklandı.

TNF (50 µg):

Liyofilize haldeki fare aktif TNF proteini (Abcam, ab157351), 50 µl steril su eklenerek final konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Elde edilen stok, 10'ar µl alikotlara ayrıldı ve uygulamalar süresince +4°C'de tutuldu. Alikotlardan biri uygulama için ayrılıp, final konsantrasyonu 100 ng/µl olacak şekilde %5 calf serum içeren besi yeriyle 10 kat sulandırıldı. Diğer alikotlar -20°C'de saklandı.

IFN-gama (100 µg):

Liyofilize haldeki fare aktif IFN-gama proteini (Abcam, ab9922), 100 µl sodyum fosfat (pH 8) eklenerek 1mg/ml final konsantrasyonu elde edildi. Elde edilen stok, 10'ar µl alikotlara ayrıldı ve uygulamalar süresince +4°C'de tutuldu. Alikotlardan biri uygulama için ayrılıp, final konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde steril su ile 20 kat sulandırıldı. Diğer alikotlar -20°C'de saklandı.

IL-1beta (10 µg):

Liyofilize haldeki fare aktif IL-1beta proteini (Abcam, ab9723), 100 µl steril suda çözülerek 0,1mg/ml final konsantrasyonu elde edildi. Elde edilen stok, 10'ar µl alikotlara ayrıldı ve uygulamalar süresince +4°C'de tutuldu. Alikotlardan biri uygulama için ayrılıp, final konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde steril su ile 10 kat sulandırıldı. Diğer alikotlar -20°C'de saklandı.

Sodyum fosfat (Na₂PO₄) hazırlanması (Sigma, 042276) :

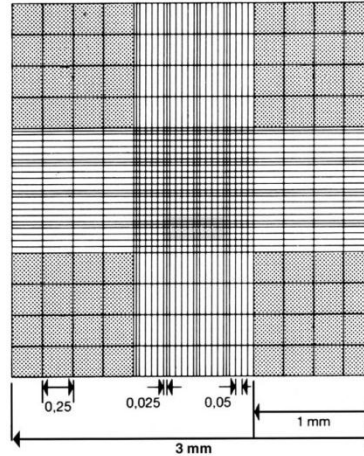
100 ml steril suda 1,419 gr Na₂PO₄ çözüldü ve 0,22 µm filtreden geçirildi. Elde edilen stok solusyondan 10 µl alınarak 90 µl steril suda çözündürülerek 10 mM Na₂PO₄ hazırlandı.

3.2.2. Hücrelerin Sitokin Uygulamaları İçin Hazırlanması

Hücre Sayımı:

Thoma lamında hücre sayımına hazırlık olarak hücreler tripsinle kaldırılarak besiyerinde süspanse edildi. Bu süspansiyondan 100 µl alınarak 1 ml endorf içinde 100 µl Trypan Blue ile karıştırıldı ve pipetaj yapıldı. Canlı hücreler Trypan Blue solüsyonunu geçirmez. Hücre zarının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde kullanılan boya hücre içerisine girer ve sitoplazmayı boyar. Mikroskopta canlı hücreler parlak sarı renkte, ölü hücreler ise mavi renkte görülür.

Hücre sayısının belirlenme formülü: $Hs \times Do \times Ss$ (s: Hücre sayısı, Do: Dilüsyon oranı, Ss: 0,1 mm³ de gerçekleştirilen sayımın 1 ml hacimdeki karşılığının bulunması ve standart sonuç elde edilmesi amacıyla kullanılır. Sabit sayı 10.000'dir).



Şekil 3.1 Hücre sayımı. Thoma lamında 0,1 mm³ hacimde sayım yapılır. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = 0,005 mm x 0,05 mm x 0,1 mm = 0,00025 mm³ = 1/4.000 mm³'tür. Bir sayım alanında 16 x 25 = 400 küçük kare olduğuna göre toplam sayım hacmi = 0,00025 mm³ x 400 = 0,1 mm³'dür.

Hücrelerin 96 Kuyulu Kültür Kaplarına Ekimi:

Yukarıda verilen hücre sayım metodu uygulanarak NIT-1 hücreleri yaklaşık 50.000 hücre/kuyu, ve L929 hücreleri 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde uygun şekilde pipetajlanarak multipipet ile ekim yapıldı. Mikroskopta genel dağılım kontrol edildikten sonra hücreler ve %5 CO₂ ve %95 nem bulunan ortamda, 37°C sıcaklıkta muhafaza edildi. Ekim sonrası, sitokin uygulamaları öncesinde hücrelerin tutunup toparlanabilmeleri için 1 gün beklendi.

3.2.3. Uygulanan Sitokin Konsantrasyonları

Doz denemeleri:

sTRAIL

NIT-1 ve L929 hücrelerine, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml konsantrasyonlarında sTRAIL uygulandı.

TNF

NIT-1 ve L929 hücrelerine, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle 40 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml ve 1000 ng/ml dozlarda sTRAIL uygulandı.

IFN-gama

NIT-1 ve L929 hücrelerine, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle 40 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml ve 1000 ng/ml dozlarda IFN-gama uygulandı.

IL-1beta

NIT-1 ve L929 hücrelerine, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle 20 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, ve 100 ng/ml dozlarda IL-1beta uygulandı.

Birlikte uygulamalar:

İkili uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, ve IL-1beta 100 ng/ml uygulandı. Bu ikili uygulamalar ile birlikte hücrelere sTRAIL de verildiğinde, 50 ng/ml doz kullanıldı.

3.2.4. MTT Canlılık/Proliferasyon Testi

MTT Testi

Methyl thiazol-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) testi, hücre canlılığını ve proliferasyonunu test etmek için kullanılan testlerden biridir. Testin temeli, canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölçümüne dayanır. Canlı hücreler, ortamdaki MTT'yi renkli formazan kristallerine dönüştürür. Ortaya çıkan formazan kristallerinin miktarı, çözümlerini takiben 540 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntem hücre canlılığını ve sitotoksiteyi ölçmenin yanında, hücre proliferasyon oranına da işaret eder. Suda çözünen bir tetrazolium tuzu olan MTT, tuz solüsyonları ile hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon halindedir. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli, çözünebilir formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla gerçekleşir. Oluşan bu formazan bir çözücü yardımıyla çözülür ve ortaya çıkan kolorimetrik reaksiyon spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılır.

MTT (5 mg/ml):

(Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, AppliChem, A2231) 5 mg tartıldı ve 10 ml PBS içinde çözüldü. Steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek karanlıkta muhafaza edildi.

MTT testi için, 96 kuyulu kültür kabındaki kültüre edilmiş olan hücrelere, 100 µl besiyeri varlığında 20 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi ve 4 saat 37°C'de

tutuldu. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl DMSO (Sigma) eklendi, 5-10 dakika çalkalandıktan sonra spektrofotometrik ölçüm yapıldı (test dalga boyu 540 nm, referans dalga boyu 690 nm).

3.2.5. Western Blot Analizi

Triton-X Lizis Tamponu:

100 mM Sodyum Florür (NaF), 50 mM HEPES, 150 mM Sodyum Klorür (NaCl), %10 Gliserol, %1,2 Triton-X 100, 1 mM Magnezyum Klorür (MgCl₂), 1 mM proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 11 836 145 001) karıştırılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı.

Resolving (Ayrıştırma) Tamponu:

1 litre tampon hazırlamak için 1,5 M Tris Base'den (Vivantis, PR0612) (pH:8,8), 181,64 gr tartıldı ve bidistile H₂O'da çözüldü. 0,22 µm filtreden geçirildi.

Stacking (Yükleme) Tamponu:

1 litre tampon hazırlamak için 0,5 M Tris Base'den (Vivantis, PR0612) (pH: 6,8) 60,5 gr tartıldı ve bidistile H₂O'da çözüldü. 0,22 µm filtreden geçirildi.

Running (Yürütme) Tamponu (10X):

15 gr Tris Base, 94 gr glisin (Vivantis, PRO0608), 50 ml %10 SDS karışımı bidistile H₂O ile 1 litreye tamamlandı.

PBST :

1 litre 1X PBS solüsyonuna 1 ml Tween20 ilave edilerek hazırlandı.

SDS Yükleme Tamponu:

1 ml gliserol, 3 ml %10 SDS, 1,25 ml 1 M Tris- HCl (pH 6,7), ve 1-2 µg bromofenol mavisi karıştırıldı, 0,22 µm filtreden geçirildi. Kullanılmadan önce 1 ml'ye 50 µl β-merkaptoetanol ilave edildi.

%10 Amonyum persülfat (APS):

0,1 gr APS (Sigma, A3678) bidistile H₂O'da çözüldü. Deneylerden hemen önce taze olarak hazırlandı. +4 °C' de saklandı.

Transfer Tamponu:

3,75 gr glisin ve 7,25 gr Tris Base 1 litre bidistile H₂O'da çözülerek üzerine 250 ml metanol (Sigma, 24229) ilave edildi.

Akrilamid/Bisakrilamid (29/0,8):

29 gr akrilamid ve 0,8 gr bisakrilamid 100 ml bidistile H₂O'da çözüldü ve 0,22 µm filtreden geçirildi.

Hücre Lizatının Hazırlanması:

Kültürdeki hücrelerin besi ortamı uzaklaştırıldı, 5 ml soğuk 1XPBS ile yıkama yapıldı. Hücrelere 1 ml Triton-X Lizis tamponu uygulandı ve scraper ile kazındı. Dipte toplanan hücreler iki-üç kez pipetaj yapıp steril 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı. Örnekler buz üzerinde 10 dakika tutulduktan sonra 1 dakika vortekslendi ve 10.000

rpm’de santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni steril ependorf tüplerine aktararak örnekler deneye hazır hale getirildi, deney hemen yapılmayacaksa -80°C’ye kaldırıldı.

Protein Miktar Tayini:

Toplanan hücre lizatlarının protein miktarı Bradford (Bio-Rad, 500-0006) reaktifi kullanılarak BSA standardına karşı gerçekleştirildi. Stok BSA (10 mg/ml) solüsyonundan 1 µg/µl olacak şekilde solüsyon hazırlandı. Standart eğrinin çizilmesi için bu solüsyondan üçlü tekrarlar olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15’er µl konuldu. Hücre lizatları -80°C’den çıkarılarak buz üzerinde eritildi ve aynı 96 kuyulu kaba üçer tekrar olacak şekilde 1’er µl ilave edildi. BSA standardı ile örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Üçlü tekrarların ortalaması alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

Jel Hazırlanması:

Tablo 3.1 Western Blot için hazırlanan alt jel.

	%7	%10	%12	%15
Bidistile H₂O	15 ml	11,55 ml	10,5 ml	7,05 ml
Ayrıştırma Tamponu	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Akrilamid (29:0,8)	7,05 ml	10,5 ml	12 ml	15 ml
%10 SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
%10 APS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Toplam	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Tablo 3.2 Western Blot için hazırlanan üst jel.

	5 ml	10 ml
Bidistile H₂O	3 ml	6 ml
Yükleme Tamponu	1,25 ml	2,5 ml
Akrilamid (29:0,8)	0,625 ml	1,25 ml
%10 SDS	50 µl	100 µl
%10 APS	50 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl
Toplam	5 ml	10 ml

Örneklerin Jelde Yürütülmesi:

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 100 µg alınarak üzerine eşit hacimde β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu konuldu ve kaynayan suda 5 dakika bekletildi. Uygun pipet uçlarıyla, hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. Jele yüklenen örnekler yükleme jelini geçene kadar 120 voltta, ayırıştırma jelinde ise 150 voltta yürütüldü. Yürüme sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi:

Örnekler yürütüldükten sonra transfer için kullanılacak süngerler transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer aparatının siyah ve negatif yüklü olacak kısmına süngerlerden biri yerleştirildi. Üzerine transfer tamponunda ıslatılmış Whatman kağıdı (Bio-Rad, 1703956) yerleştirildi. Örneklerin yürütüldüğü jel, plakalar arasından dikkatlice çıkarılarak bunun üzerine kondu. Jel üzerine PVDF membran 0,45 µm (Millipore) metanolde aktive edildikten sonra jelin üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Bunun da üzerine yine transfer tamponuyla ıslatılmış Whatman kağıdı ve diğer sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Bekletilmeden, transfer tamponuyla doldurulan ve buz içerisine konulmuş transfer cihazına yerleştirildi. Örnekler gece boyu 40 voltta transfer edildi.

PVDF Membranın İşaretlenmesi:

Bloklama ve Antikor ile İşaretleme:

Transfer sonrası PVDF membran bloklama solüsyonu içine alındı. PBST-BSA'da (1XPBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) 2 saat bloklandı. Daha sonra membran PBST-BSA içinde hazırlanmış primer antikor solüsyonu içine alınarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Primer antikor olarak TRAIL (1:1000, R&D AF347), DR5 (1:1000, R&D AF721), DcR1 (1:1000, R&D AF630), ve DcR2 (1:1000, R&D AF633); yükleme kontrolü olarak β- aktin (1:2000, sc-81178), antikoru kullanıldı. Membran PBST ile iki kez 30'ar dakika yıkandı ve sekonder antikor (Anti-Goat) (Bio-Rad, 172-1034) solüsyonu içine alınarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Membran iki kez 30'ar dakika PBST ile yıkandı. ECL (Bio-Rad, 170-5060) solüsyonunda 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda fazla ECL uzaklaştırıldı. Kemilüminensa duyarlı film blot'un üzerine konularak karanlık odada 15 saniye, 30 saniye, 1 dakika, 15 dakika, ve 30 dakikalık bekletmeler sonucunda banyo edildi.

Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılabilmesi için "strip-off" işlemi uygulanarak membran yeniden işaretlemeye hazır hale getirildi. Strip-off solüsyonu hazırlandı (12,5 ml yükleme tamponu, 20 ml %10 SDS, 67,5 ml bidistile H₂O ve 704 µl β-merkaptoetanol), ve su banyosunda 55°C'ye getirildi. Membran yine 55°C'ye ısıtılmış çalkalamalı inkübatörde 30 dakika boyunca ağzı kapaklı bir kaptaki inkübe edildi. Bu aşama membranda önceden işaretleme için kullanılan antikorları membrandan sökmek için yapılan bir aşamadır. Süre sonunda PBST ile 10'ar dakika 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Ardından membran yükleme kontrolü olarak 1:2000 konsantrasyonda hazırlanan β-aktin antikoru (sc-81178) ile işaretlendi.

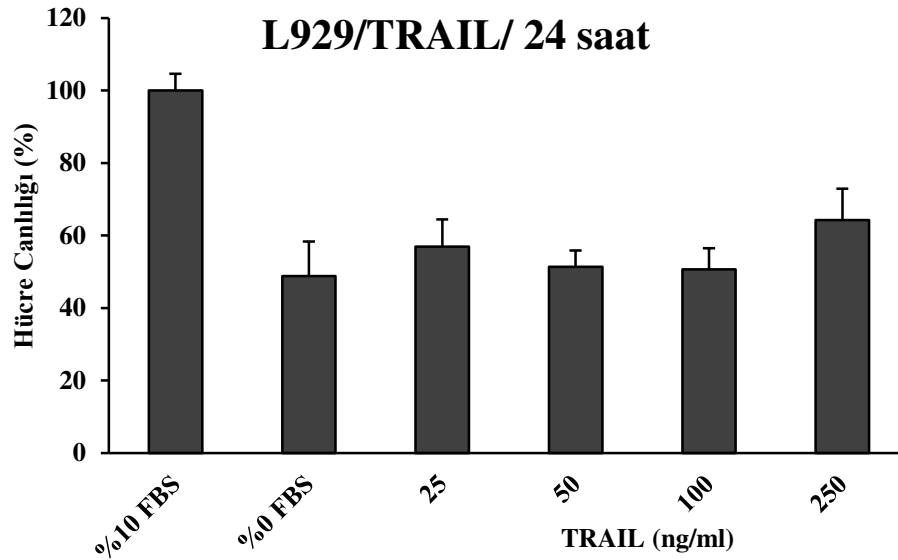
3.2.6 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için GraphPad (Prism) programı kullanıldı ve Student's t test ile istatistiksel analizler yapıldı. Hata payları SEM (Standard Error of Mean) değerleri ile belirlendi ve 0.05 p değerinin altı anlamlı olarak kabul edildi. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

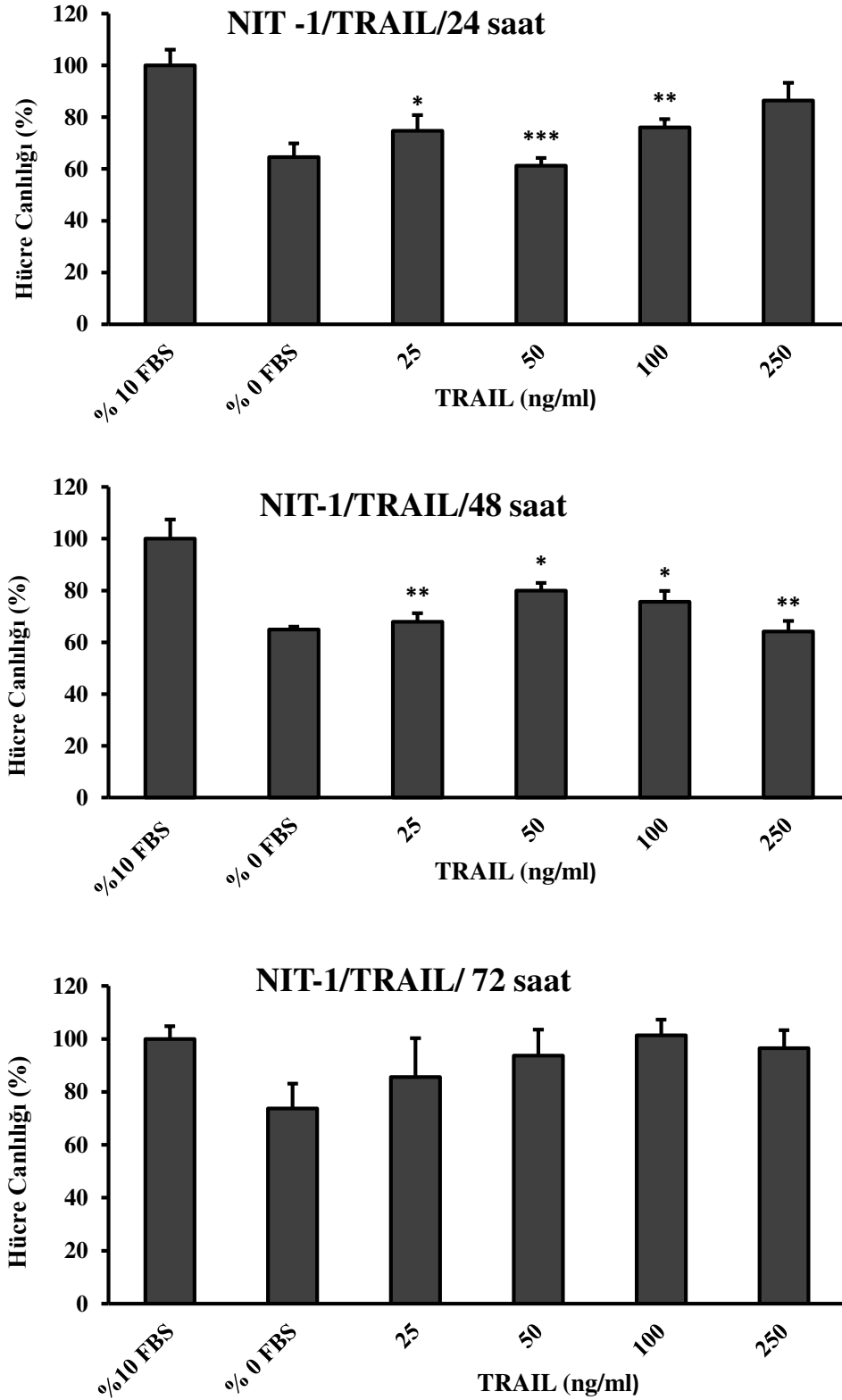
BULGULAR

4.1 TRAIL, NIT-1 hücrelerinde 24 ve 48. saatlerde canlılıkta orta şiddette azalmaya yol açtı.

Birçok kanser hücresinde apoptotik etki gösteren TRAIL molekülünün sağlıklı hücrelerde genellikle apoptozu indüklediği bilinmektedir. Fare [53] ve insan [58] primer pankreatik adacıklarının TRAIL'ın apoptotik etkisine dirençli olduğu gösterilmiştir. Ancak bazı pankreatik hücre hatlarının TRAIL uygulandığında ölüme gittiği de bildirilmiştir. Çalışmamızda, öncelikle TRAIL'a duyarlı olduğu bilinen L-929 fare fibroblast hücre hattına sTRAIL uyguladık (Şekil 4.1). Bu hücrelerde 24 saat sTRAIL uygulaması sonrası hücre canlılığının yaklaşık %45 oranında azaldığı gözlemlendi. NIT-1 fare pankreatik beta hücre hattının TRAIL'ın etkisiyle hücre ölümüne gidip gitmediğini gözleyebilmek için ise, NIT-1 hücrelerine 24, 48, ve 72 saat boyunca 25, 50, 100 ve 250 ng/ml dozlarda sTRAIL molekülü uygulandı. Süre sonunda MTT testi yapıldı (Şekil 4.2). Şekilde görüldüğü gibi, 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda, TRAIL'ın farklı dozlarının NIT-1 hücrelerinde %15-%40 arası ölüme yol açtığı gözlemlendi. Ancak 72 saatlik ölçümlerde, TRAIL'ın sitotoksik etkisinin azaldığı, hücrelerin proliferasyonunun devam ettiği gözlemlendi.



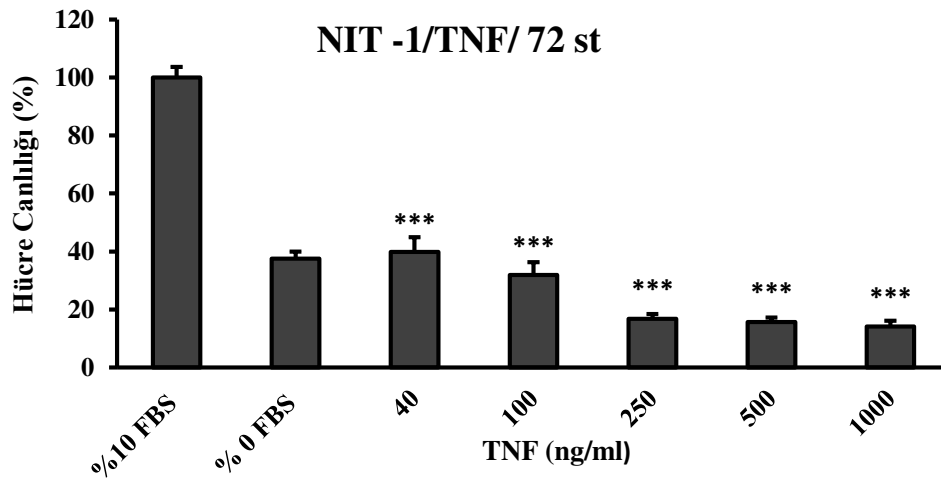
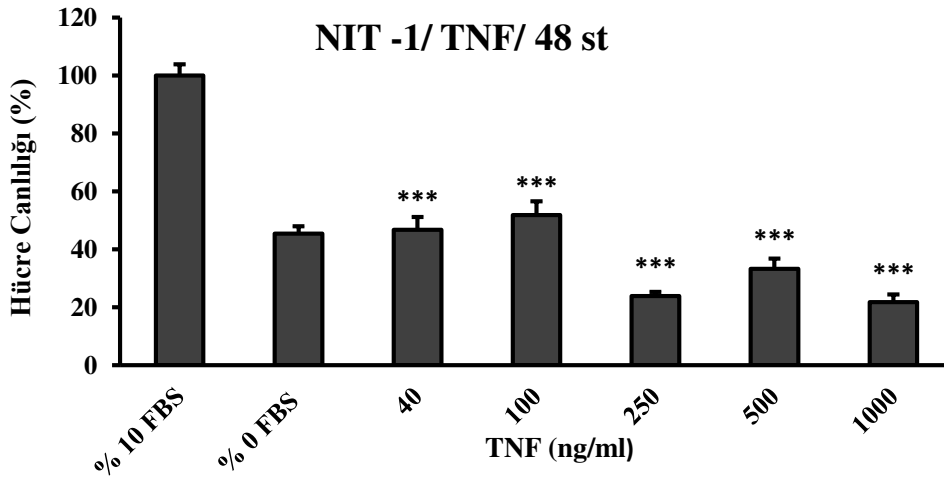
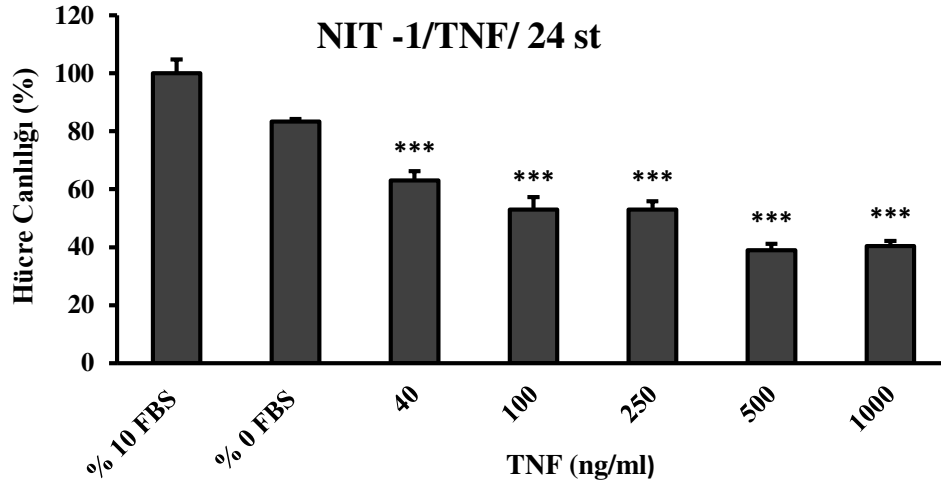
Şekil 4.1 L929 hücrelerinde farklı dozlarda sTRAIL uygulamasının hücre canlılığına etkisi. L929 hücreleri, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 24 saat süreyle 25, 50, 100, ve 250 ng/ml dozlarda sTRAIL uygulaması yapıldı. Sonuçlar 6 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalamasıdır.



Şekil 4.2 NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda sTRAIL uygulamasının hücre canlılığına etkisi. NIT-1 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 25, 50, 100, ve 250 ng/ml dozlarda sTRAIL uygulandı ve 24 (üst panel), 48 (orta panel), ve 72 saatlik (alt panel) hücre canlılık ölçümleri gerçekleştirildi. Sonuçlar 6 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalaması olarak verilmiştir. (Student's t test, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.2 TNF uygulaması sonrası NIT-1 hücre canlılığında belirgin azalma gözlemlendi.

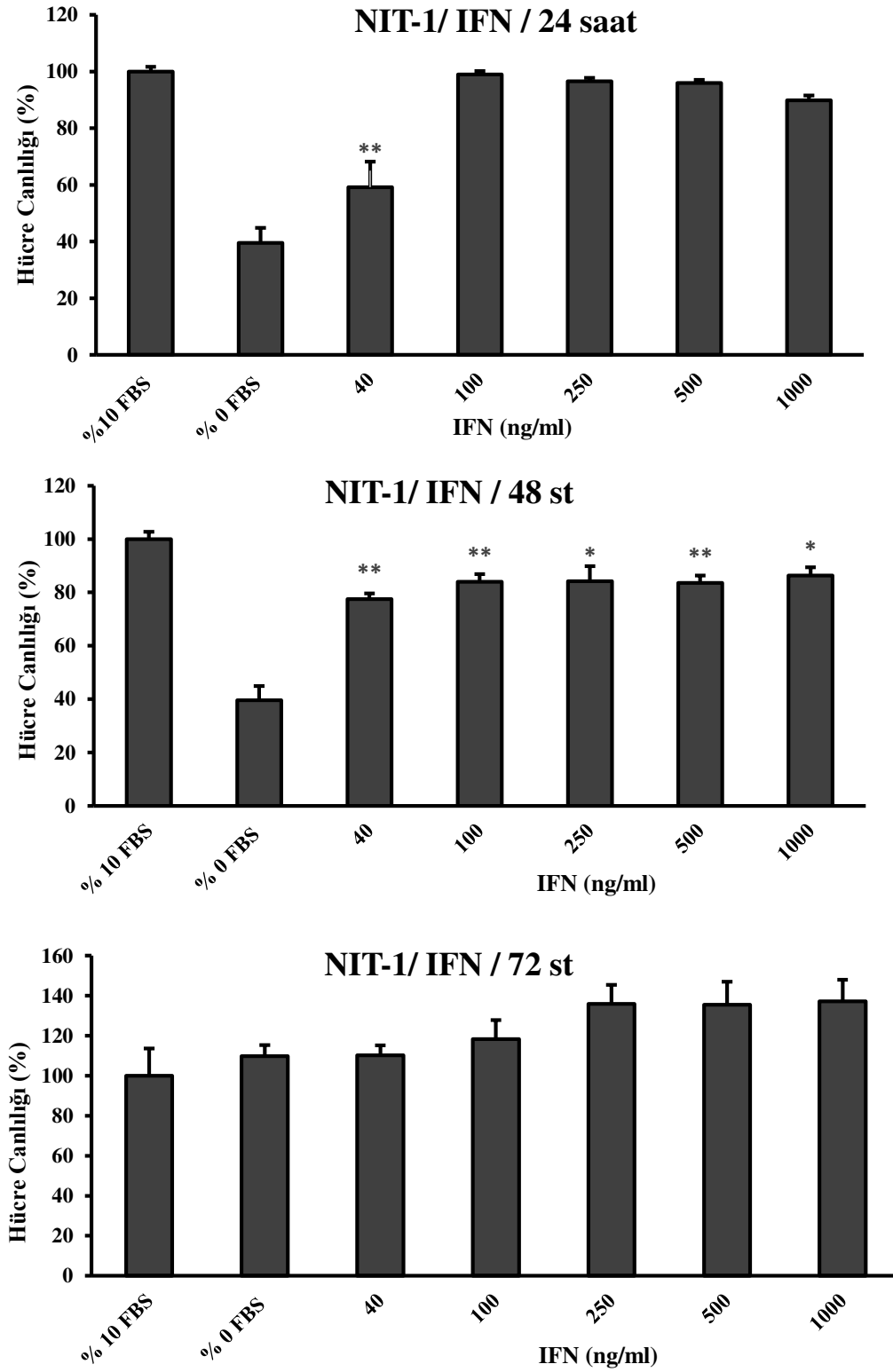
İmmün sistemin önemli bir komponenti olan TNF'in, patojen istilasına karşı kemokin ve sitokinlerin lokal ekspresyonunu tetiklediği, lökosit adhezyonunu, ilgili bölgeye çekimini ve aktivasyonunu indüklediği, bunların yanısıra birçok tümör hücre hattında sitotoksositeye neden olduğu bilinmektedir. Beta hücrelerinin ölüm mekanizmalarında da adı geçen TNF'in, NIT-1 hücrelerinde hücre ölümünü tetikleyip tetiklemediği, doz çalışmaları (40, 100, 250, 500, 1000 ng/ml) ile belirlendi. TNF molekülünün NIT-1 hücrelerinde önemli sitotoksositeye sebep olduğu, 72 saat uygulama sonrası 250-1000 ng/ml dozların hücrelerin %80'inin canlılığında azalma gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda TNF uygulamasının hücre canlılığına etkisi. NIT-1 hücreleri, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 40, 100, 250, 500, ve 1000 ng/ml dozlarda 24 saat (üst panel), 48 saat (orta panel) ve 72 saat (alt panel) boyunca TNF uygulaması yapıldı. Sonuçlar 6 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalamasıdır. (Student's t test, ***p<0.001).

4.3 IFN-gama ile 24 ve 48 saat muamele sonrası NIT-1 hücre canlılığında düşük oranda azalma gözlemlendi.

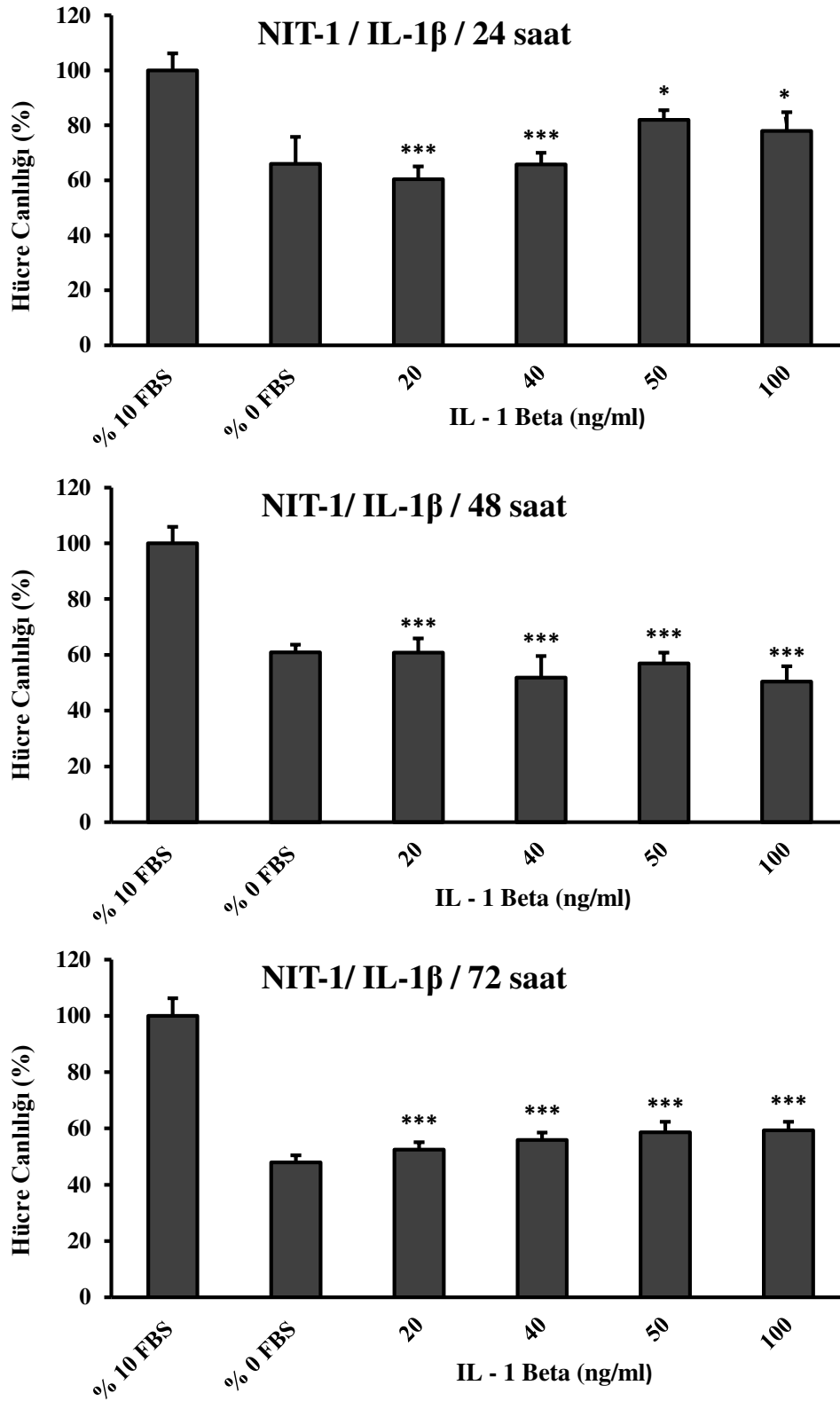
CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositlerin yanında, NK hücrelerinin, B hücrelerinin, NKT hücrelerinin, ve profesyonel antijen-sunan hücrelerin (ASHler) IFN-gama salgıladığını gösterilmiştir. İnsülitis sürecinde, adacıklara infiltre olan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin salgıladığı IFN-gama'nın da beta hücre ölümüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, IFN-gama'nın NIT-1 hücrelerinde direk sitotoksositeye neden olup olmadığının araştırılması amacıyla 40, 100, 250, 500, ve 1000 ng/ml dozlarda IFN-gama uygulaması yapıldı. 24 ve 48 saatlik uygulamalarda NIT-1 hücre canlılığında düşük oranda azalma gözlenirken, 72 saatlik IFN-gama uygulaması ile hücre proliferasyonunda artış görüldü (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda IFN uygulamasının hücre canlılığına etkisi. NIT-1 hücrelerine, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 40, 100, 250, 500, ve 1000 ng/ml dozlarda 24 saat (üst panel), 48 saat (orta panel) ve 72 saat (alt panel) boyunca IFN uygulaması yapıldı. Sonuçlar 6 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalamasıdır. (Student's t test, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

4.4 IL-1beta uygulaması sonrası NIT-1 hücre canlılığında azalma gözlemlendi.

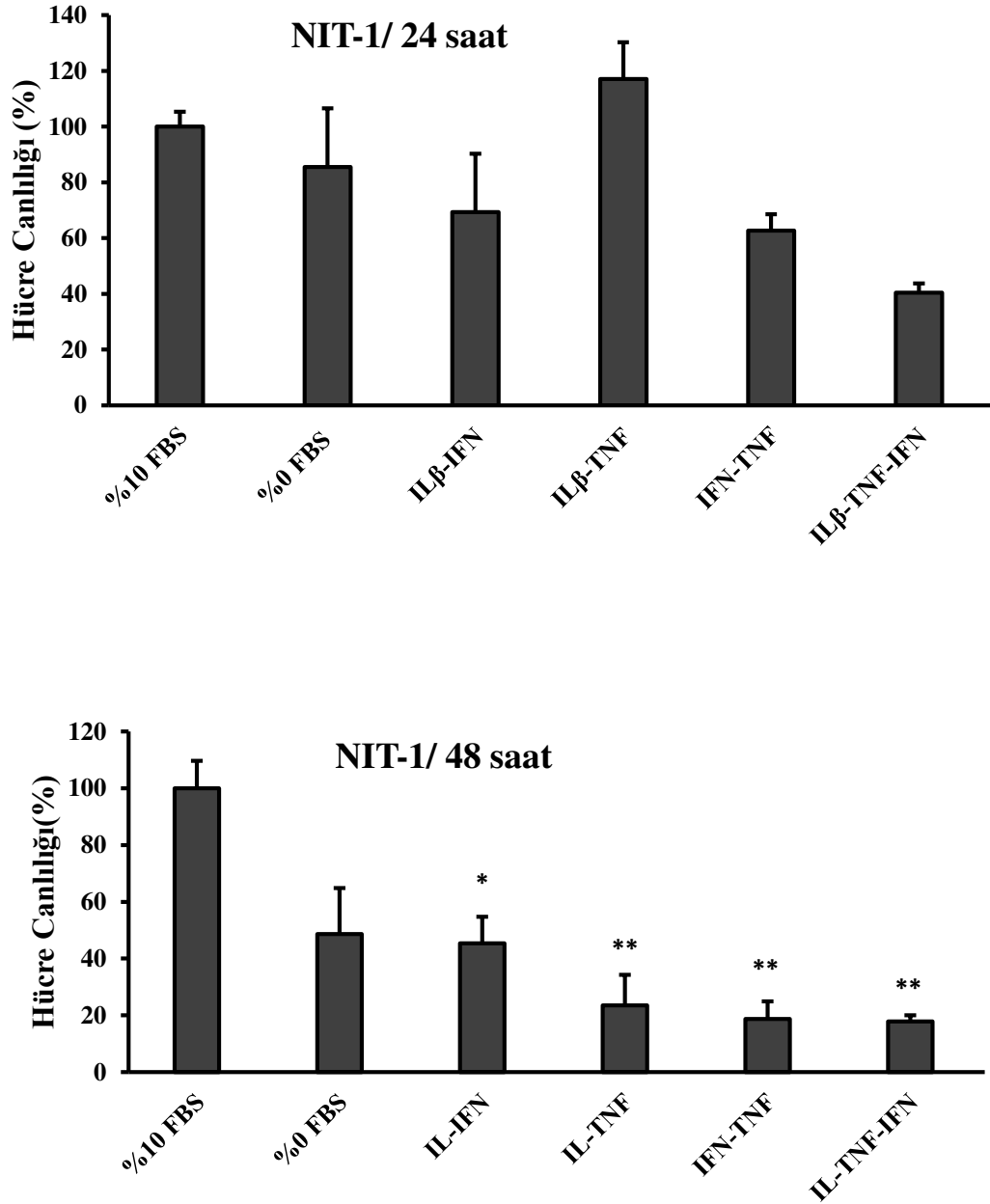
Özellikle stimüle olmuş monositler ve makrofajlar tarafından üretilen IL-1beta'nın, pankreatik beta hücrelerini sitotoksik T hücreleri tarafından yıkıma duyarlı kılan moleküllerden biri olduğu, ancak bunun yanında bu hücreleri direk ölüme götürebileceği de düşünülmektedir. NIT-1 hücrelerinde, IL-1beta'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisinin araştırılması için, bu hücreler literatürde sıklıkla kullanılan 20, 40, 50, ve 100 ng/ml dozlarında IL-1beta ile 24, 48, ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Bahsedilen dozlarda ve sürelerde IL-1beta'nın NIT-1 hücrelerinin canlılığında %20 ila %50 oranında azalmaya neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 NIT-1 hücrelerinde farklı dozlarda IL-1beta uygulamasının hücre canlılığına etkisi. NIT-1 hücreleri, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 24 saat (üst panel), 48 saat (orta panel) ve 72 saat (alt panel) boyunca 20, 40, 50, 100 ng/ml dozlarında IL-1beta uygulaması yapıldı. Sonuçlar 6 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalamasıdır. (Student's t test, *p<0.05, ***p<0.001).

4.5 TNF, IFN-gama, ve IL-1beta'nın ikili ve üçlü uygulamaları, NIT-1 hücrelerinde farklı düzeylerde hücre canlılığında azalma gözlemlendi.

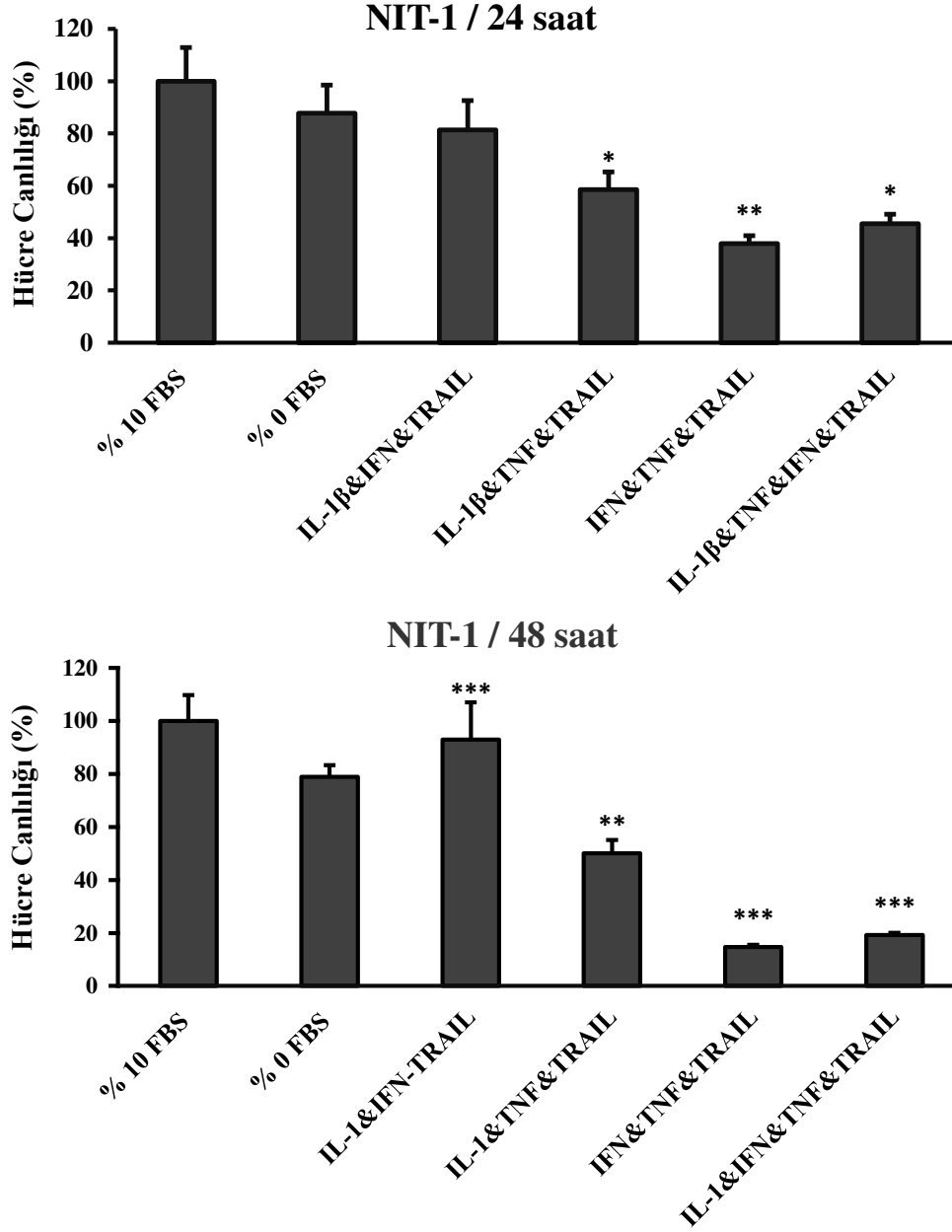
Pankreatik beta hücrelerinin otoimmün mekanizmalar ile ölüm sürecinde özellikle TNF, IFN-gama ve IL-1beta'nın birlikte etkilerinin rol aldığı düşünüldüğünden, NIT-1 hücrelerine bu sitokinler ikili ve üçlü şekilde uygulandı ve hücre ölüm oranları MTT testi ile gözlemlendi. IL-IFN kombinasyonu, 24 saatlik uygulama sonrasında hücre canlılığında azalmaya yol açmamasının yanında proliferatif etki sergiledi. Diğer uygulamalarda, en fazla üçlü sitokin uygulaması olmak üzere %20-%30 arası hücre canlılığında azalma gözlemlendi. 48 saatlik uygulama sonrasında ise, IL-IFN uygulamasında yaklaşık %50 ve diğer uygulamalarda %80'e kadar hücre canlılığında azalma gözlemlendi.



Şekil 4.6 NIT-1 hücrelerinde ikili ve üçlü sitokin uygulamalarının hücre canlılığına etkisi. NIT-1 hücrelerine, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 24 saat (üst panel), ve 48 saat (alt panel) süreyle farklı dozlarda sitokin uygulaması gerçekleştirildi. Uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, ve IL-1beta 100 ng/ml dozlarında kullanılmıştır. Sonuçlar 3 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalamasıdır. (Student's t test, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$).

4.6 Proinflamatuvar sitokinlerle birlikte sTRAIL Uygulaması, NIT-1 hücrelerinde 24. saatte canlılık oranlarında azalmaya neden olurken, 48. saatte ek sitotoksiste gözlenmedi.

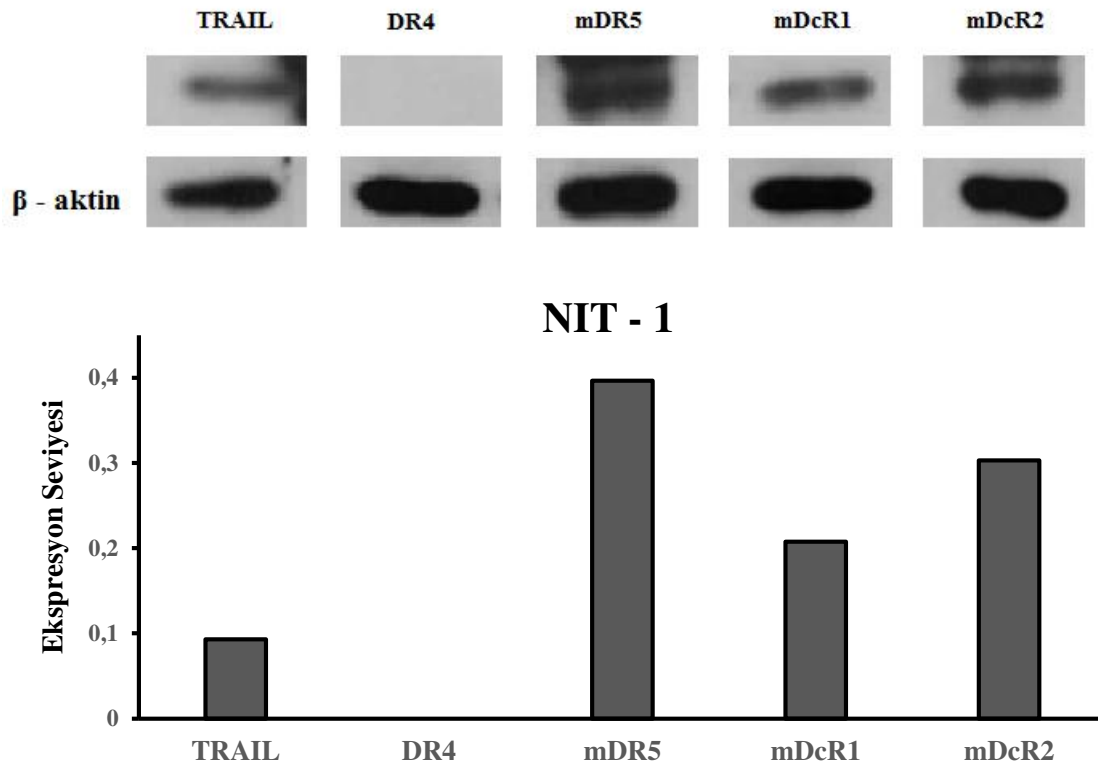
TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerinde yıkıcı etki mi yoksa koruyucu etki mi gösterdiği tam olarak açığa çıkarılamamıştır. TRAIL'ın yıkıcı etkisini, diğer sitokinlerle birlikte iken gösteriyor olabileceği düşünüldüğünden, proinflamatuvar TNF, IFN-gama ve IL-1beta molekülleri ile birlikte uygulandığında hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırıldı (Şekil 4.7). Hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarında büyütüldü ve farklı kombinasyonlarda sitokin uygulamaları gerçekleştirildi. TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, IL-1beta 100 ng/ml, ve sTRAIL 50 ng/ml dozda uygulandı. İkili ve üçlü proinflamatuvar sitokin uygulamalarında en fazla %40 oranında görülen hücre ölümlerinin, TRAIL ile birlikte gerçekleştirilen uygulamaların 24. saatinde %60'a kadar arttığı gözlemlendi. Ancak 48. saatte, özellikle TRAIL,IL-1beta ve IFN birlikteliğinde ve TRAIL, IL-1beta ve TNF birlikteliğinde, TRAIL'sız uygulamalara göre hücre ölümlerini azaltıcı yönde etki yaptığı gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 NIT-1 hücrelerinde ikili ve üçlü sitokin kombinasyonlarının sTRAIL ile birlikte uygulandığında hücre canlılığına etkisi. NIT-1 hücrelerine, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 1 gün sonra 24 saat (üst panel) ve 48 saat (alt panel) süreyle farklı dozlarda sitokin uygulaması gerçekleştirildi. Uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, IL-1 beta 100 ng/ml, ve sTRAIL 50 ng/ml dozlarında kullanılmıştır. Sonuçlar 3 farklı kuyucukta okunan değerlerin ortalamasıdır. (Student's t test, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

4.7 NIT-1 hücrelerinin TRAIL ligand ve reseptör sentez profili belirlendi.

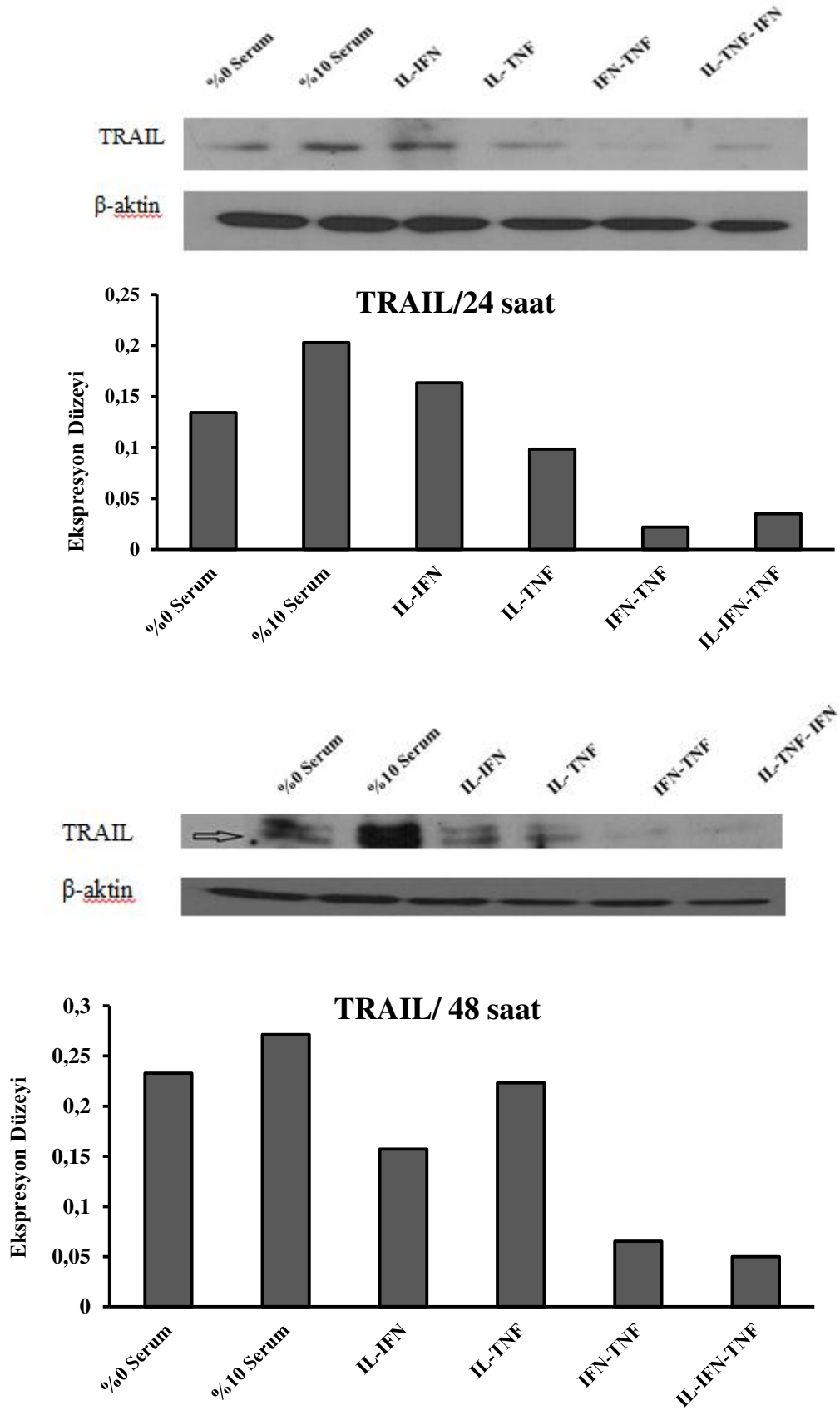
TRAIL'a duyarlılıkta direk etkili olabilen TRAIL reseptör ekspresyon profillerinin NIT-1 hücrelerinde belirlenmesi, ve TRAIL ligandının hücre yüzeyindeki ekspresyon oranının araştırılması için, western blot analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, DR5 reseptörünün hücre yüzeyinde en fazla eksprese olan reseptör olduğu, ancak DcR1 ve DcR2 reseptörlerinin de önemli oranda sentezlendiği gözlemlendi. TRAIL ekspresyon oranının ise düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 NIT-1 hücrelerinde belirlenen TRAIL ligand ve reseptör profili. Western blot yöntemi ile NIT-1 hücre yüzeyindeki TRAIL ligand ve reseptör profilleri belirlendi. Yükleme kontrolü olarak beta-aktin kullanıldı.

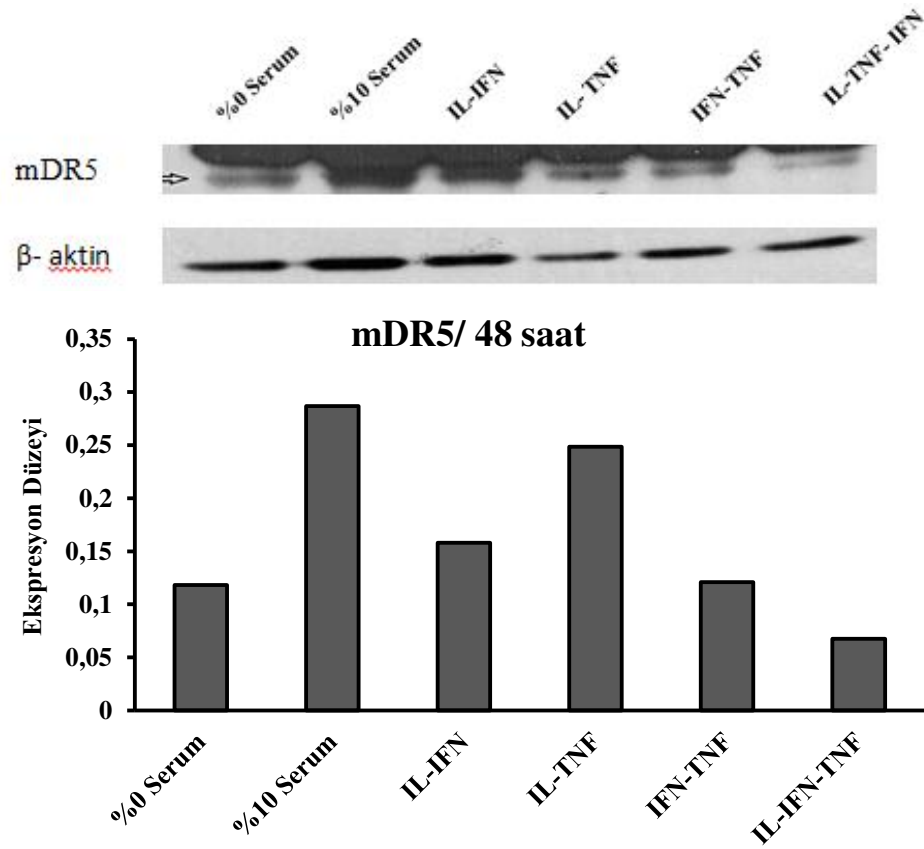
4.8 Sitokin Uygulamaları, NIT-1 Hücrelerinde 24. ve 48. saatlerde TRAIL ligand ekspresyonunu, 48. saatte ise mDR5 ekspresyonunu baskıladı.

Sitokin kombinasyonlarının NIT-1 hücre yüzeyindeki TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyonunda değişikliğe yol açıp açmadığının test edilebilmesi için, sitokin uygulamalarını takiben 24. ve 48. saatlerde western blot yöntemi uygulandı. 24. ve 48. saatlerde NIT-1 hücre yüzeyindeki TRAIL ligand ekspresyonunun baskılandığı gözlemlendi (Şekil 4.9). Bunun yanında, NIT-1 hücrelerinde 48. saatte özellikle IL1-beta ve IFN-gama, IFN-gama ve TNF'in, ve her üç sitokin de birlikte uygulandığı kombinasyonlarda mDR5 ölüm reseptörünün baskılandığı görüldü (Şekil 4.10)

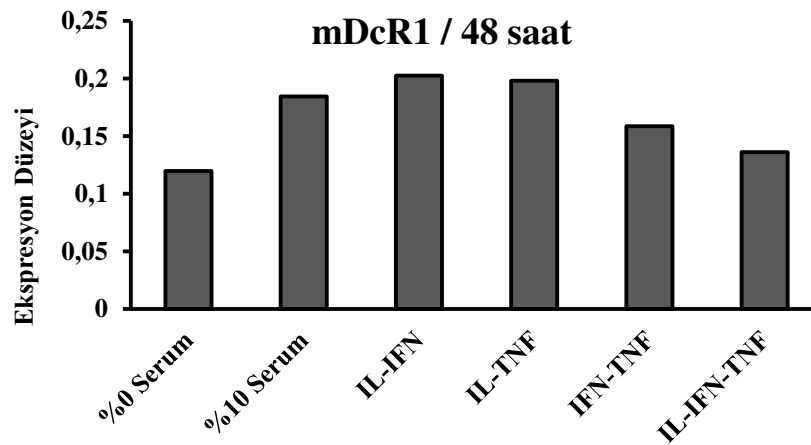
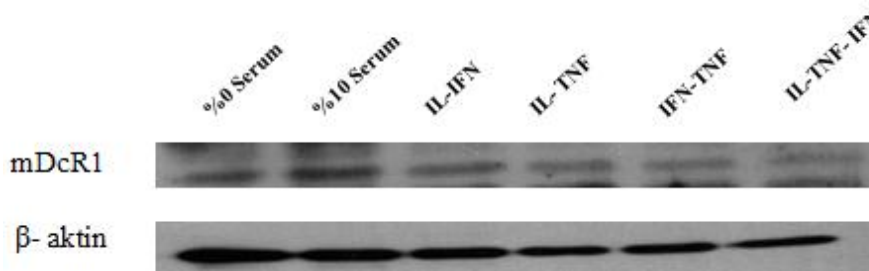
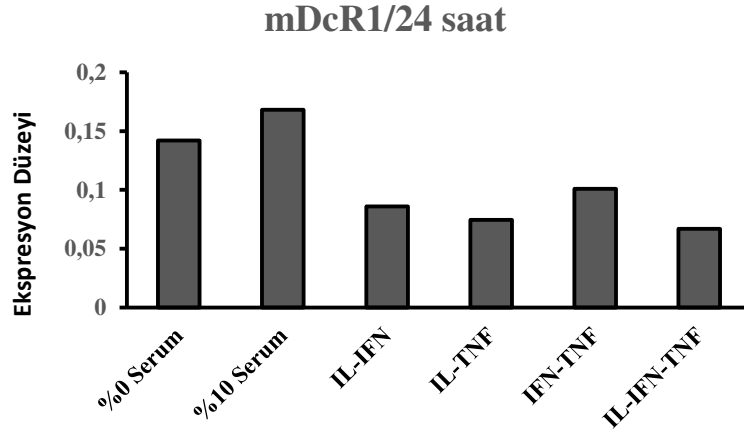
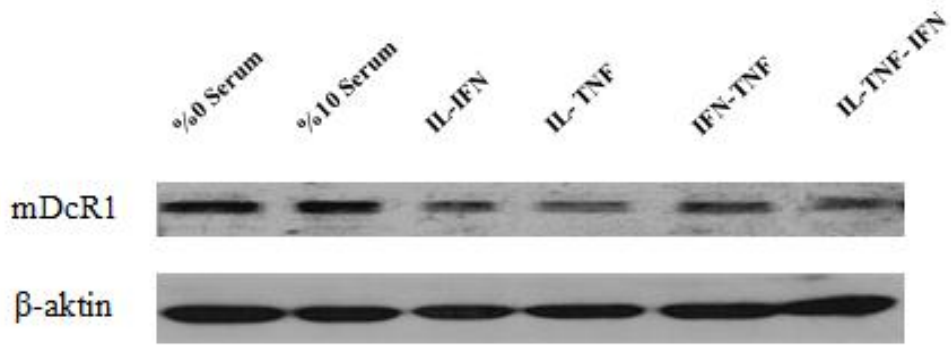


Şekil 4.9 NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası TRAIL ligandı ekspresyon oranları. Farklı sitokin kombinasyonlarının uygulanmasını takiben 24. saatte (üst panel) ve 48. saatte (alt panel) Western blot yöntemi ile NIT-1 hücre yüzeyindeki TRAIL ligand ekspresyon oranları

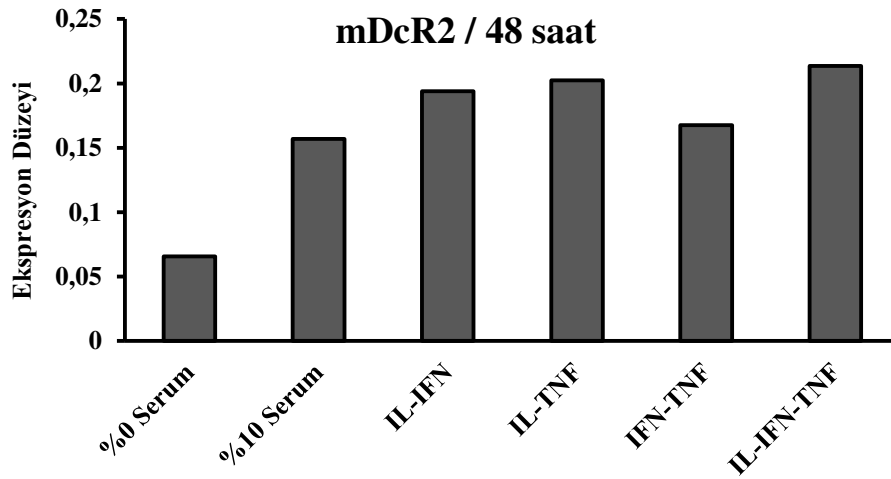
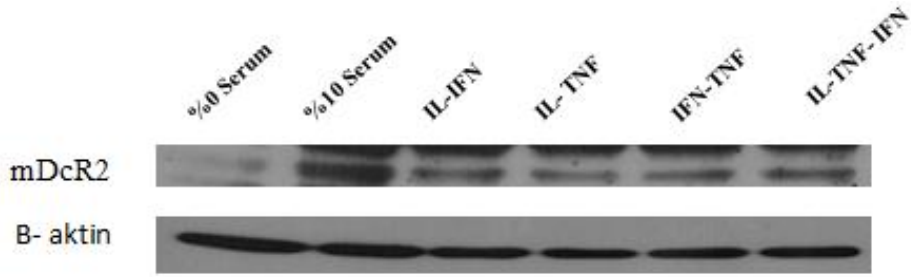
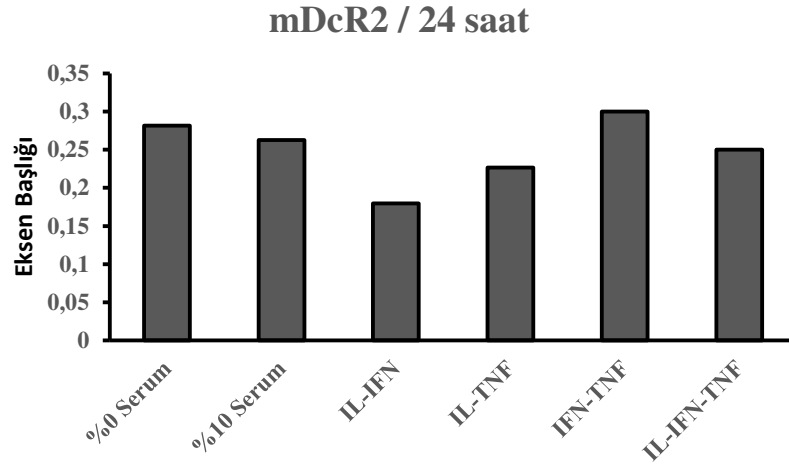
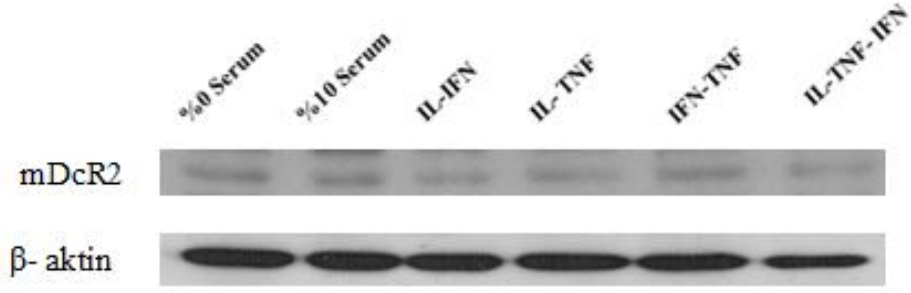
belirlendi. Yükleme kontrolü olarak beta-aktin kullanıldı. Uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, ve IL-1beta 100 ng/ml dozlarında kullanılmıştır.



Şekil 4.10 NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası mDR5 ölüm reseptörü ekspresyon oranları. Farklı sitokin kombinasyonlarının uygulanmasını takiben 48. saatte Western blot yöntemi ile NIT-1 hücre yüzeyinde belirlenen mDR5 ekspresyon oranları görülmektedir. Yükleme kontrolü olarak beta-aktin kullanıldı. Uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, ve IL-1beta 100 ng/ml dozlarında kullanılmıştır.



Şekil 4.11 NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası mDcR1 reseptörü ekspresyon oranları. Farklı sitokin kombinasyonlarının uygulanmasını takiben 24. saatte (üst panel) ve 48. saatte (alt panel). Western blot yöntemi ile NIT-1 hücre yüzeyinde belirlenen mDcR1 ekspresyon oranları görülmektedir. Yükleme kontrolü olarak beta-aktin kullanıldı. Uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, ve IL-1beta 100 ng/ml dozlarında kullanılmıştır.



Şekil 4.12 NIT-1 hücrelerinde sitokin kombinasyonları sonrası mDcR2 reseptörü ekspresyon oranları. Farklı sitokin kombinasyonlarının uygulanmasını takiben 24 saat (üst panel) ve 48. saatte (alt panel) Western blot yöntemi ile NIT-1 hücre yüzeyinde belirlenen mDcR2 ekspresyon oranları görülmektedir. Yükleme kontrolü olarak beta-aktin kullanıldı. Uygulamalarda TNF 40 ng/ml, IFN-gama 1000 ng/ml, ve IL-1beta 100 ng/ml dozlarında kullanılmıştır.

TARTIŞMA

Tip 1 diyabet (T1D), pankreasta bulunan Langerhans adacıklarındaki insülin üreten beta hücrelerinin progresif yıkımı ile karakterize olan multifaktöriyel bir otoimmün hastalıktır. Şiddetli insülin eksikliği, hiperglisemi, ve bunların neden olduğu sekonder komplikasyonlarla karakterizedir. Bu komplikasyonlar arasında kardiyovasküler hastalıklar, körlük, ve böbrek yetmezliği sayılabilir. Hastalık tedavi edilmediğinde progresif merkezi sinir sistemi hasarı, koma, ve ölüm ile sonuçlanabileceği bilinmektedir [59].

T1D'in klinik belirtileri ortaya çıktığında, çoğunlukla endokrin pankreastaki beta hücre popülasyonunun yaklaşık %60-90'ının yıkılmış olduğu kabul edilir [60]. Glukagon, somatostatin, ve pankreatik polipeptit salgılayan alfa, delta ve pankreatik polipeptit hücrelerinin ise bu süreçten genel olarak etkilenmemekle birlikte adacık içindeki dağılımlarının yeniden düzenlenebileceği bildirilmiştir [61]. Bu durum, pankreatik beta hücrelerinin T1D'te otoimmün saldırının direk hedefi olduğunun da göstergesidir. Yıkım sürecinde adacıklar, insülitis olarak isimlendirilen bir inflamatuvar reaksiyon ile mononükleer hücrelerin progresif istilasına uğrar. Süreç ilerledikçe beta hücre ölümleri devam eder. Bu ölümlerin, aktive olmuş makrofajlar ve T hücreleri ile direk temas sonucu ve/veya bu hücreler tarafından salınan sitokinler, nitrik oksit ve oksijen serbest radikalleri gibi aracı moleküller aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir [62]. Fas L ve TNF'in, beta hücre ölümünü direk olarak tetikleyebildikleri gösterilmiştir [50, 63]. Sonuçta genel olarak, proinflamatuvar sitokinlerin beta hücre yıkımına nasıl sebep olduğu henüz tam anlamıyla aydınlatılamamış olmasına rağmen, TNF, IL1-beta, ve IFN-gama'nın beta hücrelerini otoimmün yıkıma daha hassas hale getirdikleri düşünülmektedir [46, 51]. Bu sitokinlerin beta hücreleri üzerindeki etkilerinin tam olarak bilinmesi, hem hastalık oluşum mekanizması hakkında daha fazla bilgi sağlayacak, hem de yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.

TNF ailesinin nispeten yeni tanımlanan bir başka üyesi olan TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand'ın (TRAIL) ise, FasL ve TNF'ten farklı olarak, otoimmün süreci baskılayıcı rol oynayabildiği gösterilmiştir [53, 54]. Ancak TRAIL'ın bu süreçte yıkıcı rol oynayabileceğine dair bulgular nedeniyle, T1D gelişim sürecinde üstlendiği rol henüz tam olarak açığa kavuşmamıştır. TRAIL'ın TNF ailesi üyesi olan diğer ölüm ligandlarından farklı iki önemli özelliği bilinmektedir. Birincisi, TRAIL'ın seçici olarak birçok tümörijenik veya transforme hücrede hücre ölümünü indüklerken normal hücrelerde veya dokularda aynı etkiyi göstermemesidir. İkincisi ise, genel olarak TNF ailesi üyesi ligandların ekspresyonları sıkı regülasyon altında iken ve geçici olarak ifade edilirken, TRAIL mRNA'sının birçok dokuda yaygın olarak ifade ediliyor olmasıdır [1]. CD3 kros bağlama ve tip 1 interferon stimülasyonu sonrası insan T hücrelerinin TRAIL eksprese edilebildiği, ve T hücrelerinin aktivasyon-indüklü hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmiştir [64]. İnsan doğal öldürücü hücreleri (NK), B hücreleri,

monositler, ve dendritik hücrelerin de sitokin stimülasyonunu takiben membrana bağlı TRAIL ekspresyonu sergiledikleri bilinmektedir [65-68].

TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki etkisi henüz tam olarak açığa çıkarılmamış olmakla birlikte, bu etkinin, farklı koşullarda ve hastalık gelişim sürecinde farklı basamaklarda değişebileceği de göz önüne alınmalıdır. Örneğin normal şartlarda beta hücrelerinde inaktif olan TRAIL ölüm yolunun, farklı şartlar altında TRAIL transmembran reseptörlerinin veya hücre içi apoptotik inhibitörlerin ekspresyon oranlarında meydana gelebilecek farklılıklarla değişebileceği düşünülebilir. Bu nedenle, normal şartlarda beta hücreleri üzerinde apoptotik etki göstermeyen TRAIL molekülünün, insülitis şartlarında diğer sitokinlerle birlikte etki ettiğinde bu sonucun değişebileceğini hipotez ettik.

Birçok kanser hücresinde apoptotik etki gösteren TRAIL molekülünün sağlıklı hücrelerde genellikle apoptozu indüklemediği, fare ve insan primer beta hücrelerinde de hücre ölümüne yol açmadığı bilinmektedir [53, 58]. Ancak örneğin insulinoma kökenli CM ve HP62 insan beta hücre hatlarında FasL, TNF, Lta1b2, Lta2b1, LIGHT, ve IFN-gama'dan çok daha yüksek oranda sitotoksiste gösterdiği gözlenmiştir [58]. Min 6 fare beta hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, TRAIL'ın bu hücrelerde apoptozu indüklemediği gözlenmiştir [53]. Çalışmamızda, TRAIL'a duyarlılık derecesi bilinmeyen, ticari olarak satılan glukoz indüklü insülin sekresyonu yapabilen az sayıdaki beta hücre hattından biri olan NIT-1 hücreleri kullanıldı. TRAIL'ın NIT-1 fare pankreatik beta hücre hattında hücre canlılığı üzerine etkisini gözleyebilmek için, NIT-1 hücrelerine 24, 48, ve 72 saat boyunca 25, 50, 100 ve 250 ng/ml dozlarda çözülebilir TRAIL (sTRAIL) uygulandı. Süre sonunda uygulanan MTT testinin sonuçlarına göre, NIT-1 hücrelerinin TRAIL'a orta derecede duyarlı olduğu, uyulama süresi uzadıkça da bu sitotoksitenin kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 4.2). TRAIL'a duyarlı olduğu bilinen L929 hücrelerinde ise 24 saat sTRAIL uygulaması sonrası belirgin hücre ölüm oranları gözlemlendi (Şekil 4.1).

NIT-1 hücrelerinin TRAIL'a dirençli olduklarının belirlenmesini takiben, beta hücre yıkımında önemli rol oynadığı düşünülen üç proinflamatuvar sitokin olan TNF, IFN-gama, ve IL-1beta'nın NIT-1 hücre canlılığı üzerine tek başlarına gösterdikleri etki araştırıldı. TNF molekülünün 250-1000 ng/ml dozlarda ve özellikle uzun süreli uygulamada NIT-1 hücreleri üzerinde önemli oranda sitotoksik etki yaptığı gözlemlendi (Şekil 4.3). IFN-gama ise, 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonrasında NIT-1 hücrelerinde düşük oranda sitotoksiste gösterirken, 72 saatlik uygulama sonrasında hücre proliferasyonunda artışa neden oldu (Şekil 4.4). Öte yandan IL-1beta, NIT-1 hücrelerine tek başına farklı dozlarda uygulandığında %20 ila %50 oranında sitotoksisteye neden oldu (Şekil 4.5). Bu durumda, özellikle TNF'in ve IL-1beta'nın tek başlarına uygulamalarda dahi NIT-1 hücrelerinde ölüme neden olabildikleri gözlemlendi. Ancak pankreatik beta hücrelerinin insülitis şartlarında proinflamatuvar sitokinlerin toplu saldırısına uğradığı, ve sitokinlerin birarada uygulandıklarında birbirlerinin etkileri üzerinde farklılık ortaya koyabildikleri bilinmektedir. Proinflamatuvarların farklı kombinasyonlarda uygulanması sonucu, genellikle belirgin oranlarda hücre ölümü gözlenirken, IL-1beta ve IFN molekülünün birlikte 24 saat süreyle uygulamasının hücre canlılığında azalmaya yol açmadığı, tersine hücrelerin proliferasyonunu indüklediği gözlemlendi (Şekil 4.6). Bu bulgumuzla uyumlu olarak, IFN-gama'nın, farklı hücrelerde proliferasyonu inhibe edici etki gösterebildiği, ancak aynı zamanda proliferasyonu indükleyici etkisinin de olabildiği bilinmekte, bu etkisi "ikili

etki” olarak tanımlanmaktadır [69]. Çalışmamızda farklı sitokin kombinasyonları ile 48 saatlik uygulama ise %50 ila %80 oranında sitotoksosite ile sonuçlandı (Şekil 4.6). Bu aşamada, TRAIL’ın da farklı sitokin kombinasyonları ile birarada uygulanmasının etkileri önemlidir. Bu nedenle, farklı özelliklere sahip hücre hatlarında hem TRAIL’ın apoptotik etkisinin, hem de proinflamatuvar sitokinlerle birlikte uygulandığında bu etkinin nasıl değiştiğinin gözlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda sTRAIL, “IL-1beta ve IFN-gama”, “IL-1beta ve TNF”, “IFN-gama ve TNF” ve her üç sitokinin birlikte verildiği kombinasyonlar ile birarada uygulandığında, 24. saatte hücre canlılığında, proinflamatuvar sitokinlerin etkisinin üzerinde bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.7). Uygulamaların 48. saatinde ise, sTRAIL hücre canlılığında, diğer sitokinlerin yol açtığı azalmaya ek bir sitotoksositeye neden olmadı. Bunun yanında, IL-1beta, IFN-gama ve TRAIL’ın birlikte uygulaması, hücre canlılığında artış ile sonuçlandı. Bu durum, TRAIL’ın hücrelere proinflamatuvar sitokinlerle birlikte uygulanmasını takiben ilk aşamada hücre ölümlerine katkıda bulunduğunu, ancak sonradan bu katkının ortadan kalktığını, ve bazı şartlarda TRAIL’ın beta hücreleri üzerinde koruyucu etki gösterebildiğine işaret etmektedir.

TRAIL’ın, biyolojik önemi olan diğer moleküller gibi belli bir hücre tipi üzerindeki etkisini gerçekleştirebilmesi için hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ve ilgili yolları aktive edebilmesi gerekir. TRAIL’ın bir hücre tipi üzerindeki etkisinin değişmesi ise, yüzey reseptör ekspresyonlarında değişiklik ile paralellik gösterebilmektedir. Öncelikle, NIT-1 hücreleri üzerinde TRAIL yüzey reseptörlerinin ekspresyon oranlarını Western Blot analizi ile belirledik. Bu sonuçlara göre, fare DR5 ölüm reseptörü (mDR5), bu hücreler üzerinde en fazla eksprese edilen hücre yüzey reseptörüdür (Şekil 4.8). Farelerde bulunmadığı bilinen DR4 ölüm reseptörü ise, çalışmamızda da tespit edilmemiştir. DR5 ölüm reseptörü ekspresyonunun bu hücrelerde yüksek olması, ancak DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin de önemli oranda eksprese edilmeleri, bu hücrelerin TRAIL’ın sitotoksik etkisine orta derecede duyarlı olması ile uyumludur.

TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon oranlarının, farklı hücrelerde farklı şartlara bağlı olarak değişebildiği bilinmektedir. İnsülitis sürecinde tipik olarak salındıkları bilinen proinflamatuvar sitokinlerin, NIT-1 hücreleri üzerinde eksprese edilen TRAIL ligand ve reseptör oranlarını etkileyip etkilemediğinin test edilmesi için western blot analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarına göre, 24 ve 48 saat süreyle uygulanan proinflamatuvar sitokin kombinasyonlarının genel olarak TRAIL ligandının ekspresyonunu azaltıcı yönde etki ettiği gözlemlendi (Şekil 4.9). Bu bulgunun aksine, TNF ve IFN-gama ile muamele edilen Min 6 hücrelerinde TRAIL ekspresyonunda artış meydana geldiği bildirilmiştir [53]. Min 6 hücreleri ile NIT-1 hücreleri arasındaki farklılıkların, bu etkiden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgu yanında, uygulamaların 48. saatinde DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin ekspresyonlarında farklılık olmamasına rağmen DR5 ölüm reseptörünün ekspresyon oranının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum da, TRAIL’ın 48. saatteki uygulamalarda NIT-1 hücrelerinde sitotoksik etki yaratmaması ile uyumludur.

Sonuçlarımızın, TRAIL’ın insülitis sürecindeki rolünün aydınlatılmasında önemli katkı sağlayacağına inanıyoruz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, NIT-1 fare pankreatik hücre hattında, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) molekülünün ligand ve reseptör ekspresyon profilleri belirlenmiş, ve TRAIL molekülünün yanısıra TNF, IFN-gama, ve IL-1beta inflamatuvar sitokinlerin her birinin ve kombinasyon uygulamalarının bu hücrelerin canlılığı üzerine etkileri tanımlanmıştır. Kombinasyon uygulamalar ile, Tip 1 Diyabet (T1D) gelişiminde önemli rol oynayan insülitis sürecinde beta hücrelerinin yıkımına neden olan çoklu proinflamatuvar sitokin salınımının etkisi araştırılmıştır.

Sonuçlarımız, normal şartlarda fare beta hücrelerinde hücre ölümüne yol açmayan ancak bazı beta hücre hatlarında ölümcül etki gösterdiği belirlenen TRAIL molekülünün, NIT-1 hücrelerinde orta derecede sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Bunun yanında, TRAIL'ın farklı proinflamatuvar sitokinlerle birlikte uygulanmasının, bu hücrelerde ilk aşamada sitokinlerin yol açtığı sitotoksisteye katkıda bulunurken, sonrasında sitotoksik etki göstermediği, bazı şartlarda koruyucu etki dahi sergileyebiliği gözlenmiştir. Sonuçlarımızın, TRAIL'ın T1D'teki rolünün daha iyi anlaşılabilmesine katkı sağlayacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
2. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
3. Nagane, M., H.J. Huang, and W.K. Cavenee, *The potential of TRAIL for cancer chemotherapy*. Apoptosis, 2001. **6**(3): p. 191-7.
4. Griffith, T.S. and D.H. Lynch, *TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 559-63.
5. Harith, H.H., M.J. Morris, and M.M. Kavurma, *On the TRAIL of obesity and diabetes*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(11): p. 578-87.
6. Hymowitz, S.G., et al., *A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL*. Biochemistry, 2000. **39**(4): p. 633-40.
7. Holland, P.M., *Targeting Apo2L/TRAIL receptors by soluble Apo2L/TRAIL*. Cancer Lett, 2013. **332**(2): p. 156-62.
8. di Iasio MG, M.E., Secchiero P, Capitani S., *TNFSF10 (tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol., 2008. **12**(4): p. 339-343.
9. Ning, Q., et al., *TNF related apoptosis-inducing ligand and its receptors in ocular tumors*. Int J Ophthalmol, 2011. **4**(5): p. 552-7.
10. Krieg, A., et al., *TRAIL-beta and TRAIL-gamma: two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential*. Br J Cancer, 2003. **88**(6): p. 918-27.
11. Wang, P., et al., *Novel transcript variants of TRAIL show different activities in activation of NF-kappaB and apoptosis*. Life Sci, 2011. **89**(23-24): p. 839-46.
12. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
13. Schneider, P., et al., *Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5444-54.
14. Song, J.H., et al., *Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6946-55.
15. Aydin, C., et al., *Decoy receptor-2 small interfering RNA (siRNA) strategy employing three different siRNA constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(1): p. 39-50.
16. Sanlioglu, A.D., et al., *DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells*. Cancer Gene Ther, 2007. **14**(12): p. 976-84.

17. Zhang, X.D., et al., *Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types*. FEBS Lett, 2000. **482**(3): p. 193-9.
18. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 66-75.
19. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. Science, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
20. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 813-20.
21. Sanlioglu, A.D., et al., *Adenovirus-mediated IKKbetaKA expression sensitizes prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(1): p. 21-31.
22. Dirice, E., et al., *TRAIL and DcR1 expressions are differentially regulated in the pancreatic islets of STZ- versus CY-applied NOD mice*. Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 625813.
23. Audo, R., et al., *The two directions of TNF-related apoptosis-inducing ligand in rheumatoid arthritis*. Cytokine, 2013. **63**(2): p. 81-90.
24. Kischkel, F.C., et al., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 611-20.
25. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
26. Kahraman, S., *TRAIL'in Pankreatik Beta Hucrleri Uzerindeki Proliferatif Etkisinin Arastirilmesi*, in *Tibbi Biyoloji ve Genetik AD*, 2014, Akdeniz Universitesi, Tıp Fakultesi, : Antalya.
27. Di Pietro, R. and G. Zauli, *Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L*. J Cell Physiol, 2004. **201**(3): p. 331-40.
28. Secchiero, P., et al., *Aberrant expression of TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells*. J Cell Physiol, 2005. **205**(2): p. 246-52.
29. Lancaster, J.M., et al., *High expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is associated with favorable ovarian cancer survival*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 762-6.
30. Azijli, K., et al., *Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family*. Cell Death Differ, 2013. **20**(7): p. 858-68.
31. Gonzalez, F. and A. Ashkenazi, *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4752-65.
32. Finegood, D.T., L. Scaglia, and S. Bonner-Weir, *Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model*. Diabetes, 1995. **44**(3): p. 249-56.
33. van Kruijsdijk, R.C., E. van der Wall, and F.L. Visseren, *Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(10): p. 2569-78.
34. Vigneri, P., et al., *Diabetes and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(4): p. 1103-23.
35. Secchiero, P., et al., *TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(15): p. 1965-74.

36. Kavurma, M.M., et al., *TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(12): p. 7754-62.
37. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
38. Varfolomeev, E.E. and A. Ashkenazi, *Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?* Cell, 2004. **116**(4): p. 491-7.
39. Isaacs A., L.J., *Virus interference* Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 1957. **147**: p. 258-267.
40. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
41. Atkins, E., *Pathogenesis of fever*. Physiol Rev, 1960. **40**: p. 580-646.
42. Dinarello, C.A., *The interleukin-1 family: 10 years of discovery*. FASEB J, 1994. **8**(15): p. 1314-25.
43. Gabay, C., C. Lamacchia, and G. Palmer, *IL-1 pathways in inflammation and human diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(4): p. 232-41.
44. Risbud, M.V. and I.M. Shapiro, *Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(1): p. 44-56.
45. Sanlioglu, A.D., et al., *Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes*. J Cell Biochem, 2008. **104**(3): p. 710-20.
46. Gusdon AM, C.J., Mathews CE., *Type 1 diabetes: Islet inflammation- the contribution of cytokines and beta cells*. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2006. **Vol. 3. No. 3** p. 367-372.
47. Eizirik, D.L. and T. Mandrup-Poulsen, *A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis*. Diabetologia, 2001. **44**(12): p. 2115-33.
48. Augstein, P., et al., *Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes*. Diabetologia, 1998. **41**(11): p. 1381-8.
49. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
50. Yamada, K., et al., *Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas*. Diabetologia, 1996. **39**(11): p. 1306-12.
51. Wachlin, G., et al., *IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 303-12.
52. Sanlioglu, A.D., et al., *High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas*. Pancreas, 2008. **36**(4): p. 385-93.
53. Mi, Q.S., et al., *Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1967-75.
54. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2274-8.

55. Di Bartolo, B.A., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protects against diabetes and atherosclerosis in Apoe / mice*. Diabetologia, 2011. **54**(12): p. 3157-67.
56. Zauli, G., et al., *Treatment with recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alleviates the severity of streptozotocin-induced diabetes*. Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1261-5.
57. Dirice, E., et al., *Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(10): p. 1177-89.
58. Ou, D., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction*. Diabetologia, 2002. **45**(12): p. 1678-88.
59. Kelly, M.A., et al., *Molecular aspects of type 1 diabetes*. Mol Pathol, 2003. **56**(1): p. 1-10.
60. Mathews, C.E., *Utility of murine models for the study of spontaneous autoimmune type 1 diabetes*. Pediatr Diabetes, 2005. **6**(3): p. 165-77.
61. Notkins, A.L. and A. Lernmark, *Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1247-52.
62. Cnop, M., et al., *Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S97-107.
63. Hanley, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha production by human islets leads to postisolation cell death*. Transplantation, 2006. **82**(6): p. 813-8.
64. Kayagaki, N., et al., *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1451-60.
65. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
66. Fanger, N.A., et al., *Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1155-64.
67. Griffith, T.S., et al., *Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1343-54.
68. Kemp, T.J., J.M. Moore, and T.S. Griffith, *Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 892-9.
69. Asao, H. and X.Y. Fu, *Interferon-gamma has dual potentials in inhibiting or promoting cell proliferation*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 867-74.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Denizli’de doğan Özlem YILMAZ, ilköğrenimini 1992-1993 yılları arasında Edikli İlköğretim Okulunda yapmış, 1994 yılında Tokat’a gelerek ilköğretim eğitime burada devam etmiştir. Antalya Aldemir Atilla Anadolu Lisesinde 1999-2003 yılları arasında lise öğrenimini gördükten sonra 2005-2009 yılları arasında kazandığı T.C. Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde lisans öğrenimi görmüştür. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda, Tıbbi Genetik Yüksek Lisansı yapmaya hak kazanmış ve 2011-2014 yılları arasında yüksek lisans çalışmalarını tamamlamıştır.