



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

BİR HÜCRE İSKELETİ PROTEİNİ OLAN WASP'IN
PERİODONTİTİS GELİŞİMİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Kübra ŞAHİN

Danışman: Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ

TOKAT/2022
Her hakkı saklıdır

JÜRİ KABUL VE ONAY SAYFASI

Kübra ŞAHİN tarafından hazırlanan “**Bir Hücre İskeleti Proteini Olan WASP’ın Periodontitis Gelişimindeki Rolünün Araştırılması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20/09/2022 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: 20/09/2022

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT

Üye: Prof.Dr. H. Ömer ATEŞ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Saime SEZER SONDAŞ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sümeyya Deniz AYBEK

ONAY

...../...../.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK SÖZLEŞME

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Bir Hücre İskeleti Proteini Olan WASP’ın Periodontitis Gelişimindeki Rolünün Araştırılması” adlı Doktora tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

20/ 09/ 2022

Kübra ŞAHİN

ÖNSÖZ

Akademik eğitimim sürecinde engin bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, yardımını esirgemeyen, beni bilimsel ve mesleki anlamda yetiştiren, manevi desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ’e,

Eğitimim süresince bilgilerinden her zaman faydalandığım, Anabilim Dalı Hocamız, Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ’a

Eğitim sürecimde akademik bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü problemimi çözmemde yardımcı olan Anabilim Dalı Hocamız sevgili Dr. Öğr. Üyesi Nihan BOZKURT’a,

Çalışmam için gerekli olan örneklerin kriterlere uygun olarak toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN, Arş. Gör. Dr. Gül SARITAŞ ve Arş. Gör. Dr. Yunus BALEL’e,

Tezimin deney ve yazım aşaması süresince bilgi ve desteklerini esirgemeyen, her konuda sabır ve ilgi ile yaklaşan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Sadegül ŞAVKIN’a,

Hayatımın her anında yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, bana en büyük sevgi ve hoşgörüyü veren, Anneme, Babama, Abime ve ailemize katıldığı günden beri her zaman yanımda olup her adımında beni destekleyen Öznur’a

ve

varlığıyla hayatımıza renk katan, neşe kaynağım, yiğenim Nehir’e

Teşekkürlerimi sunarım...

Kübra ŞAHİN
TOKAT, Eylül 2022

ÖZET

BİR HÜCRE İSKELETİ PROTEİNİ OLAN WASP'IN PERİODONTİTİS GELİŞİMİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ŞAHİN, Kübra

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. H. Ömer ATEŞ

Eylül 2022, XIV+ 100 sayfa

Periodontitis, dişlerin destek dokularını etkileyen, periodontal ceplerin derinleşmesi, bağ doku atışman kaybı ve alveolar kemik kaybı ile karakterize, multifaktöriyel etiyolojiye sahip, inflamatuvar otoimmün bir hastalıktır. İnflamasyon ve bağışıklık sistemi kusurları periodontitis gibi immün aracılı inflamatuvar hastalıklarda önemli rollere sahiptir. Aktin hücre iskeleti; hareket, hücreler arası etkileşimler, endositoz, sitokinez, sinyal iletimi ve hücre morfolojisinin korunması dahil olmak üzere normal bağışıklık işlevi için gerekli olan hücresel süreçte rol alır. WASP (Wiskott-Aldrich sendromu proteini), hücre göçü, hücre sinyali, artan inflamatuvar sitokinler ve aşırı inflamasyon aktivasyonu gibi biyolojik süreçlerde yer aldığı bilinen bir hücre iskeleti düzenleyici proteindir. Çalışmalar, WASP ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin, immün ve inflamatuvar yanıt oluşumunda kusurlara neden olduğunu göstermektedir. Bu sebeple WASP'ın periodontitis gelişimi için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızın amacı, periodontitis ve sağlıklı dişeti dokularında WASP geninin mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini belirlemektir. Çalışmamıza periodontitis tanısı almış 20 periodontitis dokusu ve aynı hastalardan alınan 20 sağlıklı dişeti dokusu dahil edildi. Gen ekspresyon seviyeleri SYBR green temelli eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (SYBR Green temelli RT-PZR) ile protein ekspresyon seviyeleri ise western blot analizi ile belirlendi. Çalışma sonuçlarımıza göre, periodontitis dokusunda WASP gen ifade düzeyinin kontrol dokusuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı, protein düzeyinin ise anlamlı oranda azaldığı bulunmuştur. Sonuçlarımız WASP'ın periodontitis başlangıcında ve gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, periodontisteki inflamatuvar/immün mekanizmaları anlamak, periodontitisin erken evrelerinde teşhis, önleme ve tedavisi için faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Aktin Hücre İskeleti, Bağışıklık, İnflamasyon, Periodontitis, WASP

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF WASP WHICH IS CYTOSKELETAL PROTEIN IN THE DEVELOPMENT OF PERIODONTITIS

SAHIN, Kubra

Ph. D. Dissertation, Department of Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. H. Omer ATES

September 2022, XIV+ 99 sayfa

Periodontitis is an inflammatory autoimmune disease with multifactorial etiology, which affects the supporting tissues of the teeth, is characterized by deepening of periodontal pockets, loss of connective tissue attachment and alveolar bone loss. Inflammation and immune system defects have important roles in immune-mediated inflammatory diseases such as periodontitis. Actin cytoskeleton; it is involved in the cellular process essential for normal immune function, including movement, intercellular interactions, endocytosis, cytokinesis, signal transduction, and maintenance of cell morphology. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) is a cytoskeletal regulatory protein known to be involved in biological processes such as cell migration, cell signaling, increased inflammatory cytokines and excessive activation of inflammation. Studies show that changes in WASP expression level cause defects in immune and inflammatory response formation. For this reason, it is thought that WASP may be a risk factor for the development of periodontitis. The aim of our study was to determine the mRNA and protein expression levels of the WASP gene in periodontitis and healthy gingival tissues. In our study, 20 periodontitis and 20 healthy gingival tissues from the same patients were included. Gene expression levels were determined by SYBR green based PCR and protein expression levels were determined by western blot analysis. According to our study results, it was found that the expression level of the WASP gene in periodontitis tissue was statistically significantly increased compared to the control tissue, while the protein level was significantly decreased. Our results suggest that WASP may be effective in the onset and development of periodontitis. Moreover, understanding the inflammatory/immune mechanisms in periodontitis may be useful for diagnosis, prevention and treatment of periodontitis in its early stages.

Keywords: Actin Cytoskeleton, Immunity, Inflammation, Periodontitis, WASP

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
ETİK SÖZLEŞME.....	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. PERİODONSİYUM	5
2.1.1. Periodonsiyumu Oluşturan Elemanlar	5
2.1.1.1. Dişeti (Gingiva)	6
2.1.1.2.Alveolar kemik	7
2.1.1.3.Sement	7
2.1.1.4.Periodontal ligament (PDL).....	8
2.1.2. Periodontal Hastalık.....	9
2.1.3. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması	10
2.1.4. Periodontitis ve Gingivitis	11
2.1.4.1.Gingivitis (dişeti iltihabı).....	11
2.1.4.2. Periodontitis	11
2.1.5. Periodontitis Evreleri	12

2.1.6. Periodontitise Bağlı Dişeti Çekilmesi	13
2.1.7. Periodontitis Epidemiyolojisi	14
2.1.8. Periodontitis Etiyolojisi	14
2.1.8.1. Sigara	15
2.1.8.2. Bakteriyel ve viral enfeksiyonlar	15
2.1.8.3. Sistemik hastalıklar	16
2.1.8.4. Periodontitis genetiği	18
2.1.9. Periodontitis Histopatolojisi	19
2.1.10. Periodontitis Patogenezi	20
2.1.10.1. Periodontitis patogenezinde immün-inflamatuvar yanıtlar.....	22
2.1.10.2. Periodontitis patogenezinde nötrofillerin rolü	24
2.1.10.3. Periodontitis patogenezinde sitokin ve kemokinlerin rolü	26
2.1.11. Periodontitis Tedavisi	28
2.2.HÜCRE İSKELETİ	29
2.2.1.Hücre Göçü	32
2.2.2. Aktin Hücre İskeleti ve Bağışıklık Hücre İşlevi	35
2.2.3. WASP/ WAVE Ailesi Proteinleri.....	37
2.2.4. WASP Geni.....	38
2.2.4.1. WASP domainleri	40
2.2.5. WASP Degredasyonu ve WIP'in rolü	43
2.2.6. WASP Aktivasyon Mekanizması	44
2.2.7. WASP' da İmmün- İnflamatuvar Hücre Fonksiyonları.....	46
2.2.8. WASP'ın Hastalıklarla İlişkisi.....	49
3.GEREÇ ve YÖNTEM	51
3.1. GEREÇ	51
3.1.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	51

3.1.2. Dokuların Toplanması ve Saklanması	51
3.1.3. Klinik Periodontal ve Dental Değerlendirme	52
3.1.3.1. Plak indeksi.....	52
3.1.3.2. Gingival indeksi.....	52
3.1.3.3. Sondalamada cep derinliği.....	52
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	53
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Kit İçerikleri	53
3.1.6. Çalışmada Kullanılan Tampon ve Çözeltiler (Buffer).....	56
3.1.6.1. RNA eldesinde kullanılan tampon ve çözeltiler	56
3.1.6.2. Protein eldesinde kullanılan tampon ve çözeltiler	56
3.2. YÖNTEM	57
3.2.1. Dokulardan RNA izolasyonu.....	57
3.2.2. cDNA sentezi.....	58
3.2.3. cDNA konsantrasyonlarının hesaplanması	59
3.2.4. WASP geninin ifade analizi.....	60
3.2.4.1. Gerçek zamanlı PZR.....	60
3.2.4.2 WASP geni gerçek zamanlı PZR sonuçları analizi	62
3.2.5.WASP Geni Protein Analizi	62
3.2.5.1. Protein izolasyonu.....	64
3.2.5.2. Protein konsantrasyonunun hesaplanması	64
3.2.5.3. Protein örneklerinin hazırlanması ve protein lineerizasyonu	65
3.2.5.4. SDS jel elektroforezi.....	65
3.2.5.5. Transfer aşaması (Blotlama)	66
3.2.5.6. Bloklama.....	66
3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi	67
4. BULGULAR.....	68

4.1. Demografik Veri Analizleri	69
4.2. RT PCR ile WASP Gen İfadesinin Belirlenmesi.....	70
4.3. Western Blot ile WASP Protein Ekspresyonu Analiz Sonuçları	74
5.TARTIŞMA	76
KAYNAKÇA.....	85
ÖZGEÇMİŞ	99



TABLOLAR LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 2.1. Periodontitis evrelemesi ve derecelendirilmesi	13
Tablo 3.1. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	59
Tablo 3.2. cDNA sentezinde kullanılan PZR prosedürü	59
Tablo 3.3. Gerçek zamanlı PZR işleminde kullanılan primerler ve sekansları	61
Tablo 3.4. Gerçek zamanlı PZR’da kullanılan tepkime bileşen ve miktarları.....	61
Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR protokolü	62
Tablo 4.1. Periodontitis hastalarının demografik verileri	68
Tablo 4.2. Yaşın değişkenlere göre dağılımı	69
Tablo 4.3. Yaş ve plak skoru ilişkisi.....	69
Tablo 4.4. Yaş ve sondalama cep derinliği korelasyon analizi.....	70
Tablo 4.5. Periodontitis ve sağlıklı gingiva dokularındaki WASP ekspresyon seviyelerinin analizi	74
Tablo 4.6. Periodontitis ve sağlıklı gingiva dokusunda WASP proteini kat değişimi....	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 2.1. Periodonsiyum elemanları	6
Şekil 2.2. PDL ana liflerine şematik genel bakış	9
Şekil 2.3. Periodontitisin şematik gösterimi	12
Şekil 2.4.. Periodontitis ile ilişkili sistemik hastalıkların şematik gösterimi	18
Şekil 2.5 Periodontal patogenezin histopatolojik lezyonları	20
Şekil 2.6. Periodontal hastalık patogenezi	21
Şekil 2.7. Periodontal hastalık sırasında bağışıklık tepkisi. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 2.8. Periodontitisde nötrofillerin rolü	25
Şekil 2.9. Periodontal kemik rezorpsiyonunda yer alan yerleşik ve göç eden hücreler (lenfositler ve fagositler) tarafından salınan sitokin ağı	27
Şekil 2.10. Hücre iskelet elemanları	30
Şekil 2.11. WASP domainlerini gösteren şematik diyagram.....	38
Şekil 2.12. WASP geninin, cDNA transkriptinin ve WASP proteininin yapısı	39
Şekil 2.13. WASP ailesi domain ve efektör proteinleri	41
Şekil 2. 14. WASP aktivasyon mekanizması.....	46
Şekil 3.1. Western Blot metodunun çalışma prensibi	63
Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen periodontitis hastalarının cinsiyet dağılım grafiği	68
Şekil 4.2. WASP genine ait amplifikasyon eğrisi grafiği (A) ve Erime piki (B) Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 4.3. ACTB genine ait amplifikasyon eğrisi grafiği (A) ve Erime piki (B).....	71
Şekil 4.4. WASP gen ifade düzeyindeki değişimler	73
Şekil 4.5. WASP geninin periodontitis dokularında (n= 20) normal dişeti dokularına göre kat değişimini gösteren grafik.	73
Şekil 4.6. Sağlıklı dişeti dokularına kıyasla periodontitiste WASP protein seviyeleri.....	75
Şekil 4.7. WASP proteinin periodontitis dokularında normal dişeti dokularına göre kat değişimini gösteren grafik.	75

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

AAP: Amerikan Periodontoloji Akademisi
AB: Alveolar Kemik
ABD: Amerika Birleşik Devletleri
ACTB: Beta Aktin
APC: Antijen Sunan Hücreler
Arp2/3 Kompleksi: Aktin ilişkili protein 2/3 kompleksi
ATP: Adenozintrifosfat
BF: Bakteriyel Biyofilm
BR: Basit Alan
Btk: Bruton tirozin kinaz
Ca⁺: Kalsiyum
Cdc: Hücre bölünmesi kontrol proteini
CXCL: Kemokin ligandı
DC: Dentritik Hücreler
DNA: Deoksiribonükleik Asit
ECM: Ekstra Selüler Matriks
EVH1 Domain: Ena-WASP Homoloji Alanı
F- Aktin: Filamentöz Aktin
G- Aktin: Globüler Aktin
GBD: GTPaz Bağlanma Alanı
GCB: Germinal Merkez B hücreleri
GI: Gingival İndeks
HGF: İnsan Dişeti Fibroblastları
HIV: İmmün Yetmezlik Virüsü
HLA: İnsan Lökosit Antijeni
ICAM-1: Hücre İçi Yapışma molekülü 1
Ig: İmmünoglobulin
IL: İnterlökin
IMID: İmmün Aracılı İnflamatuvar Hastalıklar

IS: İmmünolojik Sinaps
JE: Bağlantı Epiteli
K: Potasyum
LPS: Lipopolisakkarit
Mg: Magnezyum
mm: milimetre
MMP: Matriks Metalloproteinazlar
ND: Doğal Katil Hücreler
NPF: Çekirdeklenmeyi Teşvik Edici Faktör
N-WASP: Nöronal WASP
OPG: Osteoprotegrin
PDL: Periodontal Ligament
PGE2: Prosteglandin E2
PIP2:Fosfotidil İnositol Bisfosfat
PMN: Polimorfonükleer Nötrofiller
PPD: Sondalama Cep Derinliği
PPP: Prolince Zengin Bölge
RA: Romatoid Artrit
RANK: Nükleer Faktör B
RANKL: Nükleer Faktör Ligandı
RT-RZR: Gerçek Zamanlı PZR
SDS: Sodyum Dedosil Sülfat
Src: Sarkoma ilişkili kinaz ailesi
TCR: T Hücre Reseptörü
Th: Yardımcı T hücreleri
TNF: Tümör Nekroz Faktörü
Treg: Düzenleyici T Hücreleri
VCA Domain: Verpolin-Kofilin-Asidik Alan
WAS: Wiskott Aldrich Sendromu
WASP: Wiskott Aldrich Sendrom Protein
WAVE: Verprolin Homolog Protein
WBC: Beyaz Kan Hücreleri

WH1 Domain: WASP homoloji alanı

WIP: Wiskott Aldrich Sendromu Protein Etkiliřimli Protein

XLN: X'e Bağlı Nötropeni

XLT: X'e Bağlı Trombositopeni



1.GİRİŞ ve AMAÇ

Halk arasında ‘dişeti iltihabı’ olarak adlandırılan periodontitis, ağız sağlığıyla ilgili yaşam kalitesi, dişlerin işlevi ve estetiği ile ilgili hususlar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Fischer ve ark., 2020). Periodontitis, disbiyotik plak biyofilmleri ile ilişkili, konağın aracılık ettiği periodontal dokunun iltihaplanması ile karakterize edilen, diş destek dokularının ilerleyici yıkımı ve periodontal ataşman kaybı ile sonuçlanan kronik çok faktörlü bir hastalıktır (Muñoz-Carrillo ve ark., 2019). Hastalık başladıktan sonra, kollajen liflerin kaybı, sement yüzeyine tutunma kaybı, cep epitelinin apikal migrasyonu, derinleşmiş periodontal ceplerin oluşumu ve alveolar kemiğin emilimi ile ilerler (Ram ve ark., 2015). Cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedavilerle; enfeksiyonu kontrol etmek, cep derinliğini azaltmak ve klinik ataşman kontrolünü sağlamak için çeşitli prosedürler uygulanarak hastaların ağız sağlığı ve sistemik sağlığı üzerindeki etkileri düzeltilmeye çalışılır (Fischer ve ark., 2020).

Hastalığın primer etiyolojik ajanı mikrobiyal dental plak olmasına rağmen, birçok hazırlayıcı etken ve risk faktörü tabloyu etkilemektedir. Konağın immün yanıt sistemi, dokuların bütünlüğü, hümmoral-hüccresel bağışıklık, bazı endokrin ve beslenme faktörleri periodontal hastalığın gelişimi ve ilerlemesi için ana faktörlerdir. Yaş, cinsiyet, ailesel geçiş, sistemik durum, ağız bakım alışkanlığı, eğitim, profesyonel tavsiyeye uygunluk ve sosyo-ekonomik durum gibi genetik, çevresel ve diğer modifiye edici faktörler sağlık durumundan hastalığa geçişe neden olan bir patern içerisinde rol almaktadır. Ayrıca, ilişkili metabolik bozuklukların varlığı da periodontal hasara yol açabilmektedir (Arweiler ve ark., 2018; Yılmaz ve ark., 2019; Umesh ve ark., 2021).

Periodontal hastalık periodonsiyumu etkileyen tüm hastalıkları kapsar (dişeti, periodontal ligament, sement ve alveolar kemik). Bu hastalıklar dişeti iltihabından viral enfeksiyonlara ve tümörlere kadar değişen geniş bir hastalık yelpazesi içermektedir. Bu nedenle hastalık sebebi, herpes simpleks virüsü gibi basit, tek faktörlü bir ajandan karmaşık çok faktörlü bakteri-konakçı bağışıklık sistemi aracılı disbiyozise kadar uzanmaktadır (Kumar, 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla periodontal hastalıkların sistemik hastalıklar için potansiyel bir risk faktörü olduğunun gösterilmesi, ağız ve genel sistemik sağlık arasındaki iki yönlü ilişkiyi güçlendirmektedir. Epidemiyolojik ve biyolojik veriler, periodontitisi kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, solunum problemleri, romatoid artrit (RA), pre-eklampsi, prematüre doğum, düşük doğum kilosu, hemodiyaliz hastalarında ölümcül pnömoni, kronik böbrek hastalığı ve metabolik sendrom dahil olmak üzere çeşitli sistemik hastalıklarla ilişkilendirmiştir (Grönkjaer ve ark., 2018; Lee & Lee, 2019; Fischer ve ark., 2020).

Aktin, neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde eksprese edilen ve evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş diziler içeren bir hücre iskeleti protein ailesidir. Bu protein ailesi hücrenin şeklini ve iç organizasyonunu korumakla görevlidir. Hücrelerin yapısı, hücresel hareket, hücreler arası etkileşimler, endositoz, sitokinez, sinyal iletimi ve hücre aktivasyonu, yapışması ve fagositozu dahil olmak üzere bir çok hücresel proses aktin hücre iskeletinin koordineli polimerizasyonunu ve depolimerizasyonunu gerektirmektedir (Park ve ark., 2010; Kopecki ve ark., 2016; Sun ve ark., 2022). Aktin düzenleyiciler, aktin-monomer bağlayıcı proteinleri, WASP/WAVE (Wiskott-Aldrich sendrom proteini/WASP-ailesi verprolin-homolog proteini) protein ailesini, çekirdeklenme proteinlerini, aktin filament polimerazlarını ve ayırıcı proteinleri içerir. Bu protein grubu, aktin dinamik değişiklikleri düzenler, böylece hücre motilitesinde, hücre içi taşımada, hücre bölünmesinde ve diğer temel hücresel aktivitelerde önemli bir rol oynar (Sun ve ark., 2022). Hücre iskeleti özellikle bağışıklık sistemi hücreleri için önemlidir çünkü göç, fagositoz, aktivasyon, salgılama ve hücre-hücre etkileşimi dahil olmak üzere temel eylemlerinin çoğu hücre iskelet mobilizasyonuna bağlıdır. Ayrıca, hücre iskeleti süreçleri çoğu hücre tipi için ortak olsa da, bunların düzenleyicileri, özellikle kortikal (plazma zarının altında) aktin hücre iskeletini modüle edenler, genellikle bağışıklık sistemi veya hematopoietik soylar için spesifiktir (Kopecki ve ark., 2016).

Wiskott-Aldrich sendromu proteini (WASP) ve WASP-ailesi verprolin-homolog protein (WAVE) ailesi proteinleri, aktin ile ilişkili protein 2/3 kompleksinin (ARP2/3) aktivasyonunda rol oynayan temel aktin-hücre iskeleti yeniden düzenleyicileridir (Takenawa & Suetsugu, 2007). WASP, Arp 2/3 kompleksi aracılığıyla yüzey sinyallerini aktin polimerizasyonuna ileten aktin çekirdeklenmeyi teşvik edici faktörler

(NFP'ler) ailesinin ilk tanımlanan üyesidir. Bu ailenin diğer üyeleri arasında temel olarak nöral-WASP (N-WASP) ve cAR/WASP ailesi verprolin-homolog proteinlerinin baskılayıcısı (SCAR/WAVE1–3) ailesi proteinleri yer almaktadır. WASP yalnızca hematopoietik hücrelerde eksprese edilirken diğer üyeler daha geniş bir dağılım göstermektedir (Massaad ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalarda, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin yetersiz veya anormal ekspresyonu, giderek artan bir şekilde immün yetmezlik ve/veya otoimmün/inflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Lafouresse ve ark., 2013). Bu düzenleyici/yeniden şekillenen aktin proteinleri arasında WASP/WAVE ailesi proteinleri de bulunmaktadır (Wickramarachchi ve ark., 2010). İnflamasyon aracılı otoimmünite ile ilişkili olarak, WASP eksikliği, hücresel göç, adezyon, aktivasyon ve bağışıklık sisteminin T hücrelerini, B hücrelerini ve dendritik hücrelerini etkileyen antijen sunumunda kusurlara neden olur (Goyal ve ark., 2009). Örneğin, WASP ile ilgili yapılan çalışmalarda WASP eksikliğinin, bozuk bakteri klirensine, aşırı inflamasyon aktivasyonu, bozulmuş otofajik p62/LC3 görevlendirmesi ve kanonik otofagozomların kusurlu oluşumu ile ilişkili konakçı hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca, otofaji ve inflamatuvar aktivitelerdeki düzensizliklere WASP'ın sebep olduğu ve bu sebeple terapötik müdahale için potansiyel hedefleri belirleyebileceği araştırmacılar tarafından düşünülmektedir (Lee ve ark., 2017).

Özetle, Periodontitis, zamanında tedavi edilmediğinde kalıcılığı olan, dişleri destekleyen periodontal ligament kaybına, diş kaybına ve birleşme epitelinin apikal göçüne neden olan, bakteriyel kaynaklı iltihaplanma ile karakterize, kronik yapısı nedeniyle tekrarlama riski yüksek bir hastalıktır (Cobb, 2000). Hastalığın gerek estetik açıdan rahatsız edici olması gerekse kişinin hayat kalitesini düşürmesi sebebiyle hastalığa neden olan mekanizmaların aydınlatılabilmesi ve bunun ışığında tedaviye yönelik yaklaşım ve uygulamalar son derece önem kazanmıştır.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın hipotezi, kronik inflamatuvar bir hastalık olan periodontitis ile inflamasyon ve bağışıklık süreçlerinde etkisi gösterilen WASP geni arasında bir ilişki olabileceğidir. Bu doğrultuda çalışmamızın amacı, periodontitis ve sağlıklı gingiva dokularında WASP mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini belirlemek, otoimmün/inflamatuvar hastalıklarla bağlantıları gösterilen WASP'ın periodontitis patogenezinde rolü olup olmadığını saptayabilmek, periodontitis ve aynı

süreci paylaşan diğer otoimmün/inflamatuvar hastalıklar için yeni teşhis ve tedavi seçenekleri sağlayabilmektir. Ayrıca, literatürde WASP geni ve periodontitis arasındaki olası ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanmamış olup çalışmamız bu yönüyle özgün bir nitelik taşımaktadır. Çalışmamızın literatürdeki bu yöndeki boşluğu dolduracağını ve diğer çalışmalar için bir temel oluşturabileceğini düşünmekteyiz.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. PERİODONSİYUM

Periodonsiyum, köken olarak Yunanca bir kelime olup, -peri “çevre” ve –odonto “diş” kelimelerinden oluşmaktadır. Periodonsiyum, diş çevreleyen ve destekleyen dokuları tanımlamak için kullanılır (Lindhe ve ark., 2015). Periodonsiyum, diş destekleyen, saran, beslenme ve hassasiyet sağlayan sinirler, kan damarları ve lif demetleri içeren bir doku kompleksidir. Periodonsiyum, yaşam boyunca rejenerasyon ve yeniden şekillenme potansiyeline sahip olup süt dişlerinin geçici olmasını ve kalıcı dişlerin yerini almasını sağlar (Muñoz-Carrillo, 2019). Periodonsiyumun ana işlevi, diş çenelerin kemik dokusuna tutturmak ve ağız boşluğunun, çiğneme mukoza yüzeyinin bütünlüğünü korumaktır. Sağlıklı periodonsiyum, dişlerin işlevlerini yerine getirmelerinde gerekli desteği sağlama ve dişleri koruma yönünden çok önemlidir (Lindhe ve ark., 2015).

2.1.1. Periodonsiyumu Oluşturan Elemanlar

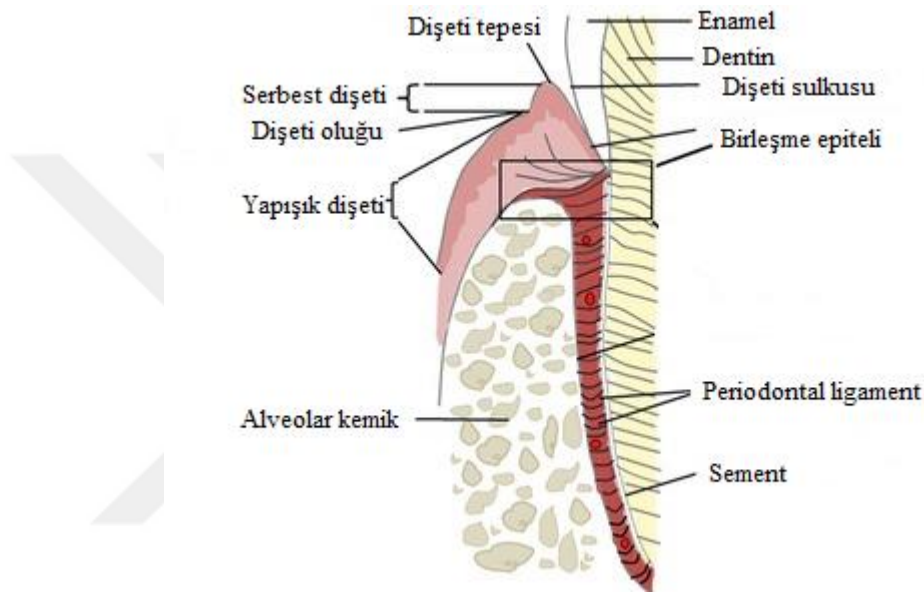
Periodonsiyum, mekanik ve kimyasal uyaranlara hızla yanıt veren çok dinamik bir komplekstir. İki sert doku ve iki yumuşak bağ dokusu olmak üzere dört temel bileşenden oluşan çok karmaşık bir yapıya sahiptir (Bortald & McCulloch, 2013).

Bu dört temel bileşen;

1. Dişeti (Gingiva)
2. Alveoler kemik
3. Periodontal ligament (PDL)
4. Sement'dir.

Bu dört bileşen yapısal ve biyokimyasal içerik olarak birbirinden farklı olmakla birlikte, davranışsal olarak bir bütün olarak hareket ederler. Yani periodontal dokuların birinde meydana gelecek patolojik bir farklılık, periodonsiyumun aktivitelerinde de değişikliğe neden olacaktır (Bartold & Narayanan, 2006). Bu dokular, her bölmedeki yerleşik periodontal hücreler tarafından ifade edilen moleküller tarafından tanımlanır ve

bu sadece periodonsiyumun yapısını ve işlevini değil, aynı zamanda enfeksiyon ve iltihaplanmaya nasıl tepki verdiğini de belirler. Bu moleküllerin biyolojik aktivitesi, doku homeostazını korumak, inflamatuvar yanıtları etkilemek ve doku rejenerasyonuna katılmak için sıkı bir şekilde düzenlenir (Bortald & Mcculloch, 2013). Peridonsiyum elemanları aşağıda yer alan Şekil 2.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Periodonsiyum elemanları (Barczyk ve ark., 2013)

2.1.1.1. Dişeti (Gingiva)

Dişeti bağ dokusu, esas olarak kollajenler, proteoglikanlar, fibronektin, osteonektin, tenasin ve elastinden oluşan deriden farklı değildir. Bu moleküllerin dişeti mimarisine değişken katkısı, büyük ölçüde konuma bağlıdır. Örneğin, epitelin hemen bitişiğinde, tip I ve tip III kollajen ve ayrıca küçük lösin açısından zengin proteoglikanlar olan decorin ve biglikan açısından zengin bir alan bulunur. Tip IV kolajen, bağ dokusunun epitel ve sement ile birleşim yerlerinde bulunan bazal membranlarda, rete peglerde, kan damarları ve sinirlerin çevresinde bulunur. Tip VI kollajen, bazal membranın yakınında bulunur ve diffüz mikrofibriler bir modelde dağılır. Elastin yapışık diş etinde zayıf bir şekilde dağılmıştır ancak komşu, daha

hareketli ve esnek alveolar mukozada bol miktarda bulunur (Bartold & Narayanan, 2006).

2.1.1.2. Alveolar kemik

Alveolar kemiğin biyokimyasal bileşimi yeterince çalışılmamıştır. Periodonsiyumun diğer dokuları gibi, tip I ve III kollajenler kemiğin baskın organik bileşenleridir. Kollajenlere ek olarak, alveolar kemik ekstraktlarının biyokimyasal analizleri, kemik sialo proteini ve osteopontin dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif polipeptitlerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Alveolar kemikte tanımlanan başlıca proteoglikanlar, kondroitin sülfattan zengindir ve büyük olasılıkla bir dekorin ve glikan karışımıdır (Bartold & Narayanan, 2006). Alveolar kemik, kök sementum ve periodontal bağ ile birlikte, ana işlevi çiğneme ve diğer temaslar tarafından oluşturulan kuvvetleri dağıtmak olan diş yerleştirme aparatını oluşturur (Muñoz-Carrillo, 2019).

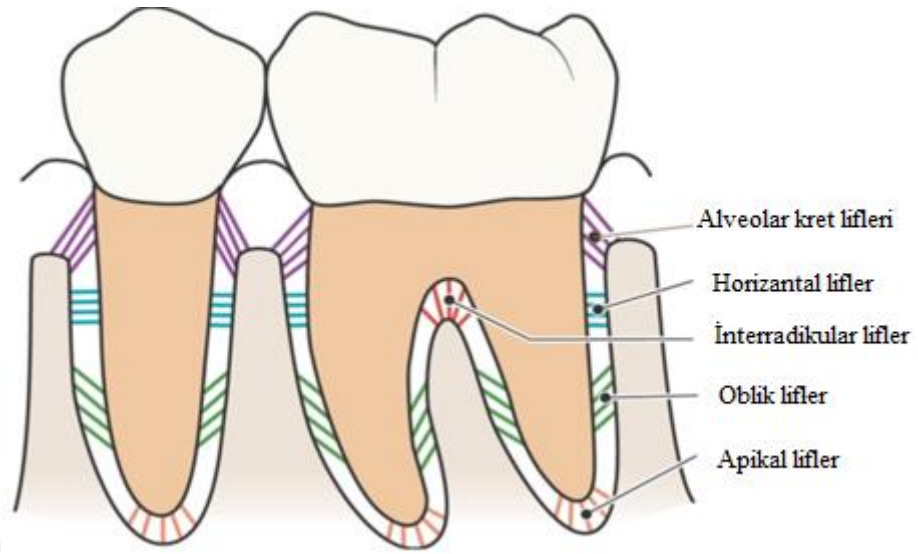
2.1.1.3. Sement

Sement, sınırlı dağılımı nedeniyle biyokimyasal olarak çalışılması zor bir bağ dokusu olmuştur. Histolojik değerlendirme, sementin kemik ve dentine benzer bir üst yapıya sahip olduğunu gösterir (Bartold & Narayanan, 2006). Kök sementi, kök dentin ve periodontal ligament arasındaki ara yüzü oluşturan, tüm kök yüzeyini kaplayan avasküler ve mineralize bir bağ dokusudur. Ayrıca, dişin beslenmesinde ve periodontal bağa tutunma yoluyla dişin stabilize edilmesinde önemli roller oynar. Aynı zamanda dişin komşu ve karşıt dişlerle ilişkisini sürdürmesini sağlar. Kemiğin aksine, kök sementi kan veya lenfatik damarlar içermez, innervasyondan yoksundur ve yeniden şekillenme veya fizyolojik rezorpsiyona uğramaz. Sementin bileşimi yaklaşık %50 mineral ve %50 organik matris içerir. Tip I kollajen, organik matrisin %90'ını oluşturan baskın organik bileşendir. Sement ile ilişkili diğer kollajenler arasında tip I, III, V, VI, XII ve XIV bulunur. Sementum farklı işlevler gerçekleştirir: periodontal ligamentin ana liflerini köke sabitler ve kök yüzeyi hasar gördüğünde onarım sürecine katkıda bulunur. Sement, sementositlerin varlığına ve yokluğuna bağlı olarak hücresel ve hücresiz sement olarak sınıflandırılmış, ayrıca sırasıyla sementoblastlar veya fibroblastlar

tarafından oluşturulan kollajen liflerinin varlığına bağlı olarak intrinsik ve ekstrinsik fiber sement olarak gruplandırılmıştır (Muñoz-Carrillo, 2019).

2.1.1.4. Periodontal ligament (PDL)

PDL, bir tarafta dişlerin kök sementine diğer tarafta çenelerin alveolar kemiğine sıkıca sabitlenmiş fibröz bir ağıdır. Geniş bir kan kaynağına, sinir ağına ve çeşitli hücre popülasyonlarına sahip heterojen bir dokudur. Bunlar arasında kemik hücreleri, sement hücreleri, Malassez'in epitel artıkları, endotelyal hücreler, nöral hücreler, kemik için öncü hücreler, uygun PDL ve sement yer alır. Bununla birlikte, baskın hücre tipi, liflerin en büyük fonksiyonel bileşenini oluşturduğu hücre dışı matrisin üretiminden ve korunmasından sorumlu olan PDL fibroblastıdır. Mekanik stabilite sağlar, diş ve alveol kemiği çiğneme ile ilişkili yüksek kuvvetlerin oluşturduğu hasardan korumak için bir amortisör görevi görür, dişeti ile birlikte ağız boşluğundan gelen patojenlere karşı koruyucu bir bariyer oluşturur (Jong ve ark., 2017). PDL'nin ana işlevi, dişleri yuvalarında desteklemek ve aynı zamanda önemli çiğneme kuvvetlerine dayanmalarını sağlamaktır. Ek olarak PDL, çiğneme sırasında çenelerin uygun şekilde konumlandırılması için gerekli bir duyu reseptörü olarak hareket etme kapasitesine sahiptir. Çok daha önemlisi, doku homeostazı, rejenerasyonu ve onarımı için bir hücre deposudur (Muñoz-Carrillo, 2019). PDL işlevleri, PDL'nin ve destekleyici alveolar kemiğin kaybına yol açan yaygın olarak ortaya çıkan ve ilerleyici bir hastalık olan periodontitis tarafından hasar görmesi durumunda bozulur (Jong ve ark, 2017). PDL'nin yapısal gücü, esas olarak tip I kollajenden oluşan kollajen lifleri ve tip III kollajeninin küçük katkısı ile sağlanır. Kollajen fibrillerinin çoğu, ana lifler olarak adlandırılan iyi tanımlanmış lif demetleri halinde düzenlenir. Ana lifler, kök boyunca konumlarına ve yönelimlerine göre sınıflandırılır. PDL lifleri Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. PDL ana liflerine şematik bakış (<https://www.jaypeedigital.com/book>)

2.1.2. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalık, plak biofilmi tarafından başlatılan ve dişetinde inflamasyona, periodontal doku yıkımına ve alveolar kemik kaybına neden olan mikrobiyal, kronik, enflamatuvar bir durumdur (Arweiler ve ark., 2018). Periodontal hastalık, dişlerdeki bakteri birikimlerine veya diş plağına yanıt olarak dişleri çevreleyen dokularda meydana gelen inflamatuvar süreçleri ifade eder (Kim & Amar., 2006). Periodontal hastalıklar, dişlerin destek yapılarını etkileyerek, diş kaybına yol açarlar. Periodontal hastalığın başlaması ve yayılması, kommensal oral mikrobiyotanın disbiyozisi yoluyla gerçekleşir, daha sonra konağın bağışıklık savunması ile etkileşime girerek iltihaplanma ve hastalığa yol açar (Kinane ve ark., 2017).

Periodontal hastalık terimi en dar anlamıyla hem gingivitis hem de periodontitis anlamına gelir (Kinane, 2001). Periodontal hastalıklar, periodontal lezyonların geri dönüşümlü olup olmasına göre iki genel kategoriye ayrılabilir (Greabu, 2020). Periodontal hastalıklar gingivitis ile başlar ve tedavi edilmezse hastalık periodontitise ilerleyerek dişeti ve dişleri destekleyen alveol kemikte geriye dönüşümsüz hasar oluşturarak diş kaybına sebep olur. Yani gingivitis periodontal hastalığın erken dönemi iken periodontitis periodontal hastalıkların daha ilerlemiş bir safhasıdır (Kinane ve ark., 2017).

2.1.3. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması

Genel olarak kabul görmüş ilk sınıflandırma 1966 yılında Ann Arbor (Michigan, ABD) tarafından gerçekleştirilmiş olup periodontal hastalıklar gingivitis ve periodontitis olmak üzere 2 kategoriye ayrılmıştır. Bu sınıflandırmanın daha çok patomorfolojik, yani klinik görünüm ve hastalığın seyri temelinde yapılması, etiyoloji ve patogeneze konusundaki bilgilerin ise yetersiz olması sebebiyle ileriki dönemlerde yeni bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu sebeple 1989 yılında Amerikan Periodontoloji Akademisi'nin (AAP) Prince Town'da ilk kez düzenlediği üçüncü Dünya Çalıştayı'nda, periodontal hastalıkların ayrıntılı bir sınıflandırması sunulmuştur. 1999 yılında ise Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması Çalıştayı ilk kez dünya çapında kabul görmüş ve bilimsel temelli bir sınıflandırma olarak kabul edilmiştir (Plancak ve ark., 2001). 2017 yılında ise Şikago'da Amerika Periodontoloji Akademisi ve Avrupa Periodontoloji Federasyonu tarafından 2017 Dünya Periodontoloji Çalıştayı düzenlenmiş ve periodontitis: Nekrotizan Periodontal Hastalıklar, Periodontitis ve Sistemik Hastalıkların Göstergesi Olan Periodontitis olmak üzere üç ana sınıfa ayrılmıştır. Daha önceleri “kronik” veya “agresif” olarak kabul edilen hastalık formları bu sınıflama ile birlikte tek bir kategoride “periodontitis”i oluşturmuş ve çok boyutlu bir evreleme ve derecelendirme ile karakterize edilmiştir.

Evreleme sistemi:

Evre I ataşman kaybının erken aşamaları,

Evre II yerleşik periodontitis,

Evre III ataşman aparatında ciddi hasar,

Evre IV diş kaybına ve çiğneme işlevinin kaybına yol açan periodontal destekte önemli hasar, olarak sınıflandırılmıştır.

Derecelendirme sistemi ise:

Derece A periodontal hastalık ilerleme hızı düşük,

Derece B beklenen hızda periodontal hastalıkta ilerleme,

Derece C yüksek periodontal hastalık ilerlemesi riski olarak sınıflandırılmıştır (Caton ve ark., 2018).

2.1.4. Periodontitis ve Gingivitis

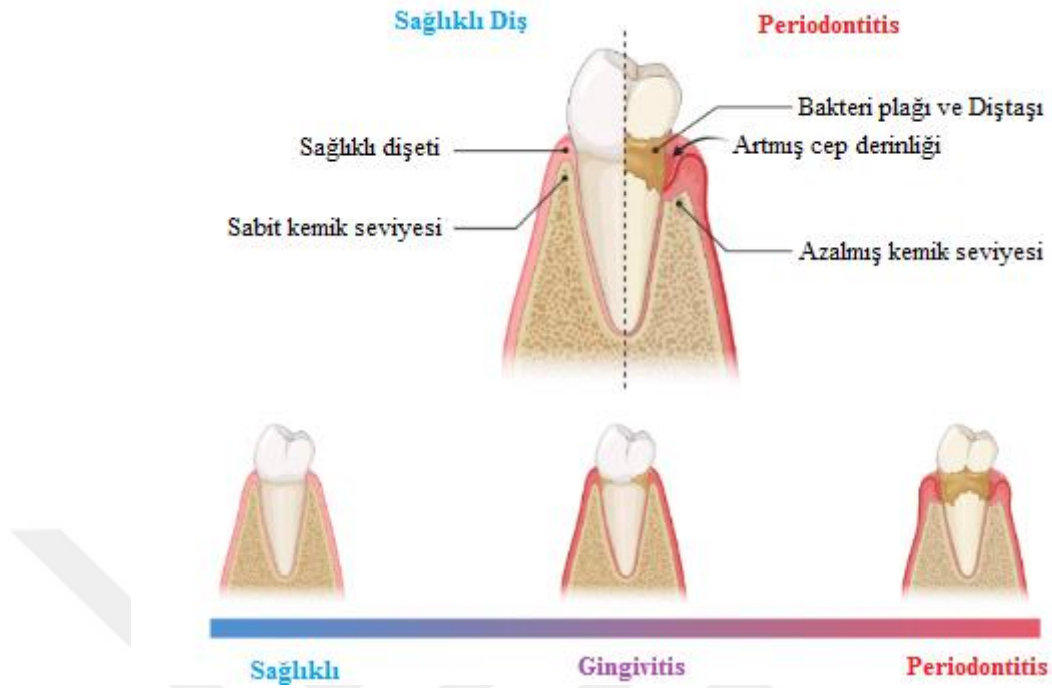
2.1.4.1. Gingivitis (*Dişeti iltihabı*)

Gingivitis periodontal hastalığın en yaygın ve en hafif bir formudur (Kim & Amar, 2006). Gingivitis, dişleri çevreleyen yumuşak dokuların iltihabi bir durumudur ve dişlerde oluşan dental mikrobiyal plaklara karşı doğrudan bir bağışıklık tepkisidir (Kinane, 2001). Gingivitis, dişeti ataşmanı kaybı olmaksızın dişeti iltihabının varlığı ile karakterizedir. Etkilenen bölge dişeti ile sınırlıdır (Greabu, 2020). Dişeti iltihabı, sigara, bazı ilaçlar, ergenlik ve hamilelikte meydana gelen hormonal değişiklikler gibi çeşitli faktörler tarafından modifiye edilir (Kinane, 2001).

2.1.4.2. Periodontitis

Periodontitis, yetişkinlerde diş kaybının önemli nedenlerinden biri olan, dişlerin destek dokularını etkileyen ve periodontal ceplerin derinleşmesi, bağ doku tutunma kaybı ve alveolar kemik kaybı ile karakterize, multifaktöriyel etiyolojiye sahip, inflamatuvar otoimmün bir hastalıktır (Grönkjaer ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). Periodontitis, dişeti enfeksiyonuna, diş destekleyen periodonsiyumun tahrip olmasına ve genellikle dişeti çekilmesine neden olur (Chrysanthakopoulos, 2011; Grönkjaer ve ark., 2018). Şekil 2.3' de periodontitis şematik olarak gösterilmiştir.

Periodontitis, dünya nüfusunun önemli bir kısmını etkileyen ve en yaygın altıncı insan hastalığı olan, genel olarak yüksek prevalansa sahip kronik bulaşıcı olmayan bir hastalıktır (Sanz ve ark., 2020). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya nüfusunun % 35 ila %50'si periodontitisten etkilenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 3-11 yaş arası çocuklarda diş eti iltihabı prevalansı %9-17 iken ergenlik çağında bu prevalans %70-90'a yükselir ve yetişkin popülasyonun % 47' sine karşılık gelir (Hoare ve ark., 2019).



Şekil 2.3. Periodontitisin şematik gösterimi

2.1.5. Periodontitis Evreleri

Periodontitis dört evreden oluşur ve hastalığın evresine şiddeti, ilerleme hızı, ataşman kaybı, periodontitise bağlı diş kaybı, sondalama derinliği vs. gibi faktörlere bakılarak karar verilir. Evre I periodontitis, gingivitis ve periodontitis arasındaki sınır bölgesidir ve ataşman kaybının erken aşamalarını temsil eder. Evre I periodontitisli hastalar, dişeti iltihabının ve biyofilm disbiyozisinin kalıcılığına yanıt olarak periodontitis geliştirmiştir. Bu evrede diş kaybı meydana gelmemektedir. Evre II, diş desteğinde kusurlara sebep olan karakteristik hasarların tanımlandığı yerleşik periodontitisi temsil eder. Bununla birlikte, hastalık sürecinin bu aşamasında, düzenli kişisel ve profesyonel bakteri uzaklaştırma ve izlemeyi içeren standart tedavi ilkelerinin uygulanmasının hastalığın ilerlemesini durdurması açısından önemli olmakla birlikte genellikle yetersiz kalır. Evre III'te ataşmanda önemli hasara neden olmuştur ve ileri tedavi olmadığında diş kaybı meydana gelebilir. Evre III, kökün orta kısmına uzanan derin periodontal lezyonların varlığı ile karakterize edilir ve derin kemik içi defektlerin varlığı, furkasyon tutulumu, periodontal diş kaybı öyküsü gibi sebeplerle tedavi zorlaşır. Diş kaybı olasılığına rağmen çiğneme fonksiyonu korunur. Evre IV'de ise, kökün apikal kısmına uzanan derin periodontal lezyonların varlığı ve/veya çoklu diş kaybı öyküsü ile

karakterize edilir; sekonder oklüzal travma ve diş kaybının sekelleri nedeniyle diş hipermobilitesi ile sıklıkla komplike hale gelir. Bu evrede periodontitis uygun tedavi ve yöntemlerle kontrol altına alınmazsa diş kaybına sebep olur. Ayrıca bu evre, evre III'ün aksine çiğneme kaybına da sebep olur (Tonetti ve ark., 2018). Tablo 2.1.'de periodontitis evrelemesi ve derecelendirilmesi gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Periodontitis evrelemesi ve derecelendirilmesi

Periodontitis Evreleri	İnterproksimal kemik kaybı
Evre I	< %15 veya < 2 mm
Evre II	Kökün kronal üçte biri
Evre III	Kökün orta üçte biri
Evre IV	Kökün apikal üçte biri
Periodontitis Derecelendirilmesi	% Kemik kaybı/ yaş
Derece A (yavaş)	< 0.5
Derece B (orta)	0.5-1.0
Derece C (hızlı)	>1.0

2.1.6. Periodontitise Bağlı Dişeti Çekilmesi

Periodontitiste eş zamanlı olarak genellikle dişeti çekilmesi de meydana gelir (Cobb, 2000). Dişeti çekilmesi, diş etinin en sık görülen ve istenmeyen durumudur. Dişeti kenarının apikal olarak sement-mine birleşiminden yer değiştirmesi ve kök yüzeyinin ağız ortamına maruz kalmasıyla karakterizedir (Chrysanthakopoulos, 2011). Periodontitise bağlı dişeti çekilmeleri ilgili dişlerin periodonsiyumu ile ilişkilidir. Periodontal hastalıkla birlikte destek alveol kemiği yüksekliği azaldığında, dişeti de onunla birlikte apikale doğru yer değiştirir ve bu durum tedavi edilmezse geri dönüşümsüzdür (Pini Prato ve ark., 2000). Belirgin inflamasyon, dişeti ceplerinin oluşumu ve granülasyon dokusu ile karakterize vakalarla birlikte, ağırlıklı olarak infeksiyöz etiolojinin inflamatuvar bir durumu olarak kabul edilir (Jarvin, 2013). Periodontal hastalık sonucunda oluşan alveolar kemik rezorpsiyonu dişeti çekilmelerine sebep olan patolojik bir faktördür. Periodontitisli hastalarda ara yüzlerde meydana gelen ataşman kayıplarının ardından vestibül ve lingual yüzeylerdeki remodelasyon sonrasında yumuşak dokunun apikalde konumlanması söz konusu olur (Wennstrom,

1996). Kemik kaybının derecesine bağlı olarak kısmen ya da tamamen plastik cerrahi ile tedavi edilebilir (Pini Prato ve ark., 2000). Bir hasta için dişeti çekilmesi genellikle estetik bir sorun yaratır ve özellikle bu tür bir sorun ön dişleri etkilediğinde tahribatın ilerlemesine bağlı diş kaybı endişesi de meydana gelir (Chrysanthakopoulos, 2011).

2.1.7. Periodontitis Epidemiyolojisi

Periodontal hastalıklar hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygındır ve dünya nüfusunun yaklaşık %20-50'sini etkilemektedir (Nazir, 2017). Yapılan çalışmalarda, erkeklerde kadınlara oranla periodontal hastalık ve periodontal doku kaybının daha yaygın olduğu rapor edilmiştir (Albandar, 2002). Periodontal hastalık görülme sıklığı farklı popülasyon ve ırklar arasında değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda düşük gelirli bireylerde, yüksek gelirli bireylere göre 1.8 kat daha şiddetli periodontal hastalık olasılığı olduğu ve siyahilerde beyazlara oranla daha yüksek periodontal hastalık geliştiği bildirilmiştir (Albandar ve ark., 1999; Nazir ve ark., 2020). Ergenlerde, yetişkinlerde ve yaşlı bireylerde periodontal hastalığın yüksek prevalansı, onu bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir (Nazir, 2017). Farklı yaş grupları arasında periodontal hastalık eşitsizlikleri bulunmakta ve ilerleyen yaşla birlikte hastalığın şiddeti artmaktadır. Bir epidemiyolojik çalışmada, en yüksek periodontitis prevalansının yaşlı popülasyonda (%82) görüldüğü, bunu yetişkinler (%73) ve ergenlerin (%59) takip ettiği bulunmuştur (Nazir ve ark., 2020). Yetişkin popülasyonun yaklaşık %50'sinde herhangi bir zamanda diş eti iltihabı, %30'unda ise herhangi bir zamanda periodontitis meydana gelmektedir. Önümüzdeki yıllarda insan ömrü uzaması sebebiyle periodontal hastalığın küresel prevalansında artış beklenmektedir (Loesche & Grossman, 2001).

2.1.8. Periodontitis Etiyolojisi

Periodontitisin multifaktöriyel bir hastalık olması sebebiyle hastalığın başlaması ve ilerlemesinde birçok risk faktörü yer almaktadır. Sigara gibi kötü alışkanlıklar, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, sistemik hastalıklar en önemli risk faktörleri olmakla beraber kalıtım, yaş, cinsiyet, kötü ağız hijyeni, ilaçlar, stres,

beslenme alışkanlığı, eğitim gibi etmenlerinde hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Nazir, 2017; Bui ve ark., 2019).

2.1.8.1. Sigara

Sigara içmek periodontitis için en önemli risk faktörlerinden biridir ve periodontal hastalık prevalansındaki azalma, sigara içme oranlarındaki düşüşle ilişkilidir. Sigara, puro, esrar ve pipo içmenin periodontal dokular üzerindeki olumsuz etkileri benzerdir. Sigara içenlerin, içmeyenlere göre ciddi bir periodontal hastalığa sahip olma olasılığı 3 kat daha fazladır. Ayrıca, sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla alveolar kemik kaybı ve diş kaybı prevalansının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Kanıtlar, sigara içmenin oral mikrobiyal florayı değiştirdiğini, belirli periodontal mikroorganizmaların seviyesini arttırdığını veya konakçı yanıtını etkilediğini göstermektedir (Nazir, 2017).

2.1.8.2. Bakteriyel ve viral enfeksiyonlar

Periodontal hastalıklar, dişlerdeki bakteri birikimlerine yanıt olarak dişleri çevreleyen dokularda meydana gelen iltihabi süreçleri ifade eder (Loesche & Grossman, 2001). Genel olarak hem gingivitis hem de periodontitisin diş yüzeylerini kolonize eden bakterilerden kaynaklandığına ve periodontal yıkımın ana mekanizmalarının bakteriler tarafından başlatıldığına inanılmaktadır (Cappuyns ve ark., 2005). Nadiren bu bakteri birikimleri enfeksiyonlara neden olur, ancak dişeti dokusunda ortaya çıkardıkları inflamatuvar yanıtlar, dişin alttaki alveolar (çene) kemikte meydana gelen ilerleyici kolajen kaybından sorumludur; bu durum kontrol edilmezse, dişin gevşemesine ve daha sonra kaybedilmesine neden olabilir (Loesche & Grossman, 2001). Dolayısıyla, plak miktarı ile dişeti iltihabının şiddeti ve alveolar kemik kaybı arasında pozitif bir ilişki vardır (Cappuyns ve ark., 2005). Ağız boşluğundaki en yaygın Gram negatif bakteri cinsleri arasında *Treponema*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinobacillus* ve *Eikenella* bulunur. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *Tannerella forsythia* da periodontal hastalığa neden olan ajanlar olarak tanımlanmış olup periodontal hastalık üzerine yapılan araştırmaların çoğu bu mikroorganizmalara odaklanmaya

devam etmektedir. Ayrıca, ağız boşluğunun yaklaşık 500-700 civarında yaygın takson içerdiğini düşünülmektedir (Bui ve ark., 2019).

Periodontal hastalıkların etiyolojisi bakteri plağı, mikrobiyal yan ürünler ve konakçının immün yanıtına odaklanmıştır. Bakteriler periodontal hastalıkların birincil etiyolojik faktörüdür, ancak yapılan çalışmalar ayrıca maya ve herpes gibi virüslerin de periodontitis etiyolojisinde yer aldığını göstermektedir (Guthmiller & Novak, 2002). İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve enterovirüsler dışında, periodontal hastalığa potansiyel olarak dahil olan virüslerin çoğu DNA virüsleridir. Özellikle HIV ve herpes virüslerin periodontal hastalıklara dahil olduğu düşünülmektedir. Birkaç çalışmada, HIV enfeksiyonu ile periodontal enfeksiyonun bazı farklı formları, yani nekrotizan lezyonlar arasında açık bir ilişki olduğunu gösterilmektedir. Ayrıca, HIV pozitif kişilerde kronik periodontitis prevalansının ve ciddiyetinin arttığına ilişkin raporlar, HIV enfeksiyonunun kronik periodontitise yatkınlık oluşturduğunu düşündürmektedir (Cappuyns ve ark., 2005).

2.1.8.3. Sistemik hastalıklar

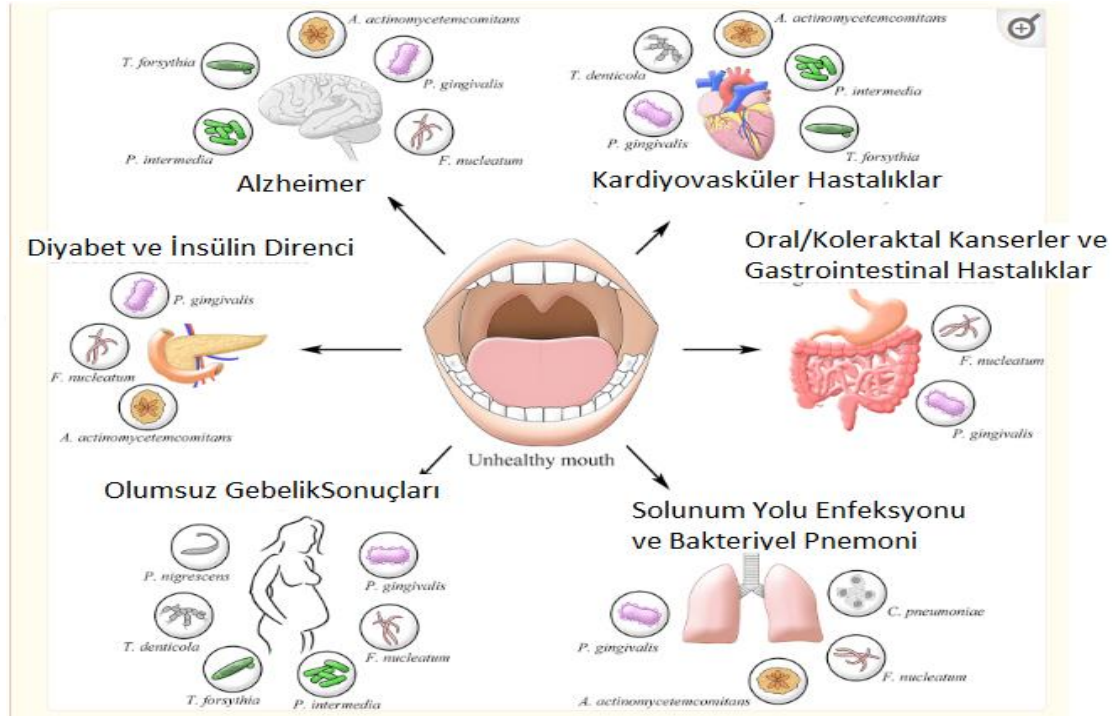
Periodontal patojenler ve inflamasyon çalışmalarında, periodontitisin çeşitli sistemik hastalıkların başlaması veya ilerlemesi üzerindeki potansiyel etkisi araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Periodontal hastalıklar; nörodejeneratif hastalıklar, solunum yolu enfeksiyonu, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci, RA, tip 2 diyabet, olumsuz gebelik sonuçları dahil olmak üzere birçok sistemik hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, belirli periodontal patojenlerin sistemik hastalığın gelişimini uyarıp uyarmadığı veya sistemik hastalığın periodontal patojenlerin bolluğunun değişmesine neden olup olmadığı henüz belirlenemese de periodontal patojenlerin, doğrudan veya dolaylı olarak sistemik hastalıkların gelişimini teşvik ettiği düşünülmektedir. Örneğin, ağız boşluğunda bol miktarda bulunan yaklaşık 30 türün, özellikle Gram negatif anaerobik bakterilerin, sistemik hastalıklara doğrudan katkıda bulunabilecek endotoksinler ürettiği bilinmektedir (Bui ve ark., 2019).

Sistemik hastalıklar içerisinde özellikle diyabet ve periodontitis arasındaki ilişki dikkat çekmektedir. Diyabet ve periodontitis arasında çift yönlü bir ilişki ve sinerji vardır. Literatür, periodontitis ve insülin direnci arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Periodontitisin, metabolik hastalık ve tip 2 diyabetin patogeneğinde rol oynayan kronik bir durum olan insülin direncini artırdığı iddia edilmiştir (Nazir, 2017). Akut bakteriyel ve viral enfeksiyonu olan bireylerde, şiddetli ve uzun süreli insülin direnci görülmesi bu iddayı desteklemektedir. Diyabetin periodontitis riskini artırdığı ve tersine periodontal inflamasyonun glisemik kontrolü olumsuz etkilediği iki yönlü bir ilişki gösterilmiştir. Diyabetik bireyler, diyabetik olmayan bireylere kıyasla periodontitis riskinde üç kat artışa sahiptir. Yapılan bir çalışmada periodontitis, tip 1 diyabet hastalarının %58'inde ve diyabetik olmayan kontrollerin %15'inde bulunmuştur (Bui ve ark., 2019). Dişeti oluşu sıvıları ve tükürük, periodontal hastalığı olan diyabetik olmayan bireylerle karşılaştırıldığında, periodontitisli diyabetik hastalarda farklı sitokin türleri daha yüksek konsantrasyonlarda inflamatuvar araçlara sahiptir (Nazir, 2017).

Periodontitis ile ilişkisi dikkat çeken diğer bir hastalık kanserdir. Periodontal hastalık ve kanser riski arasındaki ilişki üzerine yapılan epidemiyolojik ve kanser kontrol çalışmalarında, çoğunlukla genel kanser riski ve belirli spesifik kanser türleri ile pozitif bir ilişki olduğunu düşündüren veriler elde edilmiştir. Bazı anatomik bölgelerin, özellikle ağız boşluğuna yakın olan yemek borusu ve üst gastrointestinal sistem için riskin daha yüksek olabileceği görülmektedir. Bununla birlikte, periodontal hastalık ve kanser riski arasındaki ilişkinin kesin olarak varlığını kanıtlamak, sigara içimi, hastalığa katkı sağlayabilecek beklenmeyen yabancı faktörler gibi sebeplerle sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, ilişkinin doğasını netleştirmeye yardımcı olmak ve özellikle periodontal hastalık ile kanser riski arasındaki nedenselliği destekleyecek kanıtlar eklemek için randomize kontrollü klinik deneyler ve iyi tasarlanmış, büyük prospektif çalışmalar kullanılarak daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Nwizu ve ark., 2020). Bununla birlikte, birçok kanser türü ve mortalitesi ile periodontitis arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır. Örneğin; Wank ve ark., (2013), periodontitis ile baş ve boyun kanseri riski arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu (Wang ve ark., 2013), Ahn ve ark., (2012) kolorektal veya pankreas kanserli bireylerde daha yüksek periodontitis ile ilişkili ölüm oranları gözlemlendiğini (Ahn ve ark., 2012), Abnet ve ark., (2001) özofagus kanserinin diş kaybı ile pozitif ilişkili olduğunu (Abnet ve ark., 2001) bildirmiştir. Fakat iyileştirilmiş periodontal hastalık önleme ve yönetim stratejilerinin kanser riskini nasıl etkileyebileceğini değerlendirmek için daha fazla

araştırmaya ihtiyaç vardır (Nwizu ve ark., 2020). Şekil 2.4’de periodontitis ile ilişkili sistemik hastalıklar gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Periodontitis ile ilişkili sistemik hastalıkların şematik gösterimi (Bui ve ark., 2019)

2.1.8.4. Periodontitis genetiği

Periodontitis enfeksiyöz bir hastalıktır ve doku yıkımının çoğu, periodontopatojenik mikroorganizmalara karşı doğal ve adaptif immün reaksiyonlardan kaynaklanır. Bu nedenle, bağışıklık reaksiyonlarını değiştiren genetik varyasyonlar, bireysel farklılıkları belirleyebilir. Bu tür genetik varyasyonların, anormal ve yıkıcı inflamatuvar yanıtların gelişimi açısından yüksek risk altındaki hastaları belirleyebileceği düşünülmektedir. (Hajishangalis, 2015).

İkiz yetişkinler üzerinde yapılan çalışmalarda, cep derinliği, ataşman kaybı ve kemik kaybı gibi periodontal ölçümler için popülasyon varyansının önemli bir bölümünün genetik geçişi düşündürdüğü gösterilmiştir. Aynı zamanda, dizigotik ikizlere kıyasla monozigotik ikizlerde erken başlangıçlı periodontitis riskinin iki kattan

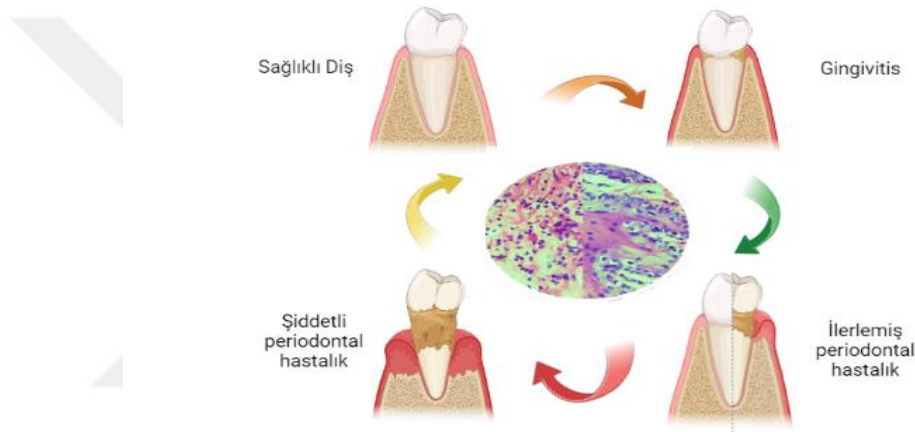
fazla arttığı, bu sebeple erken başlangıçlı periodontitisin kalıtsal olma ihtimalinin yüksek olduğu da belirlenmiştir (Corey ve ark., 1993; Umesh ve ark., 2021).

Genetik unsurların, periodontal hastalığın inflamatuvar ve immün yanıtını etkilemede hayati bir rol oynaması sebebiyle araştırmalar, bağışıklığın çeşitli yönleriyle ilgili genetik mutasyon veya polimorfizmleri tanımlamaya yönelmiştir (Taba ve ark., 2012). Bu bağlamda yapılan bazı çalışmalarla, farklı interlökin (IL) (IL 1-2-6, vb.) genlerinde görülen polimorfizimlerin hastalığa yatkınlık oluşturabildiği, şiddetini artırabildiği veya koruyucu bir faktör olabileceği; agresif periodontitisli hastalarda ve şiddetli periodontal bozukluğu olan kişilerde CD14-1359 polimorfizminin N-allel ve N/N genotipinin daha yüksek sıklığı gözlemlendiği; nükleer faktör-B (RANK), RANK ligand (RANKL) ve osteoprotegrin (OPG) aktivasyonunun periodontal hastalıkta artmış kemik rezorpsiyonuna neden olduğu; pozitif IGM'li hastaların daha yüksek antikorlar ürettiği; matriks metalloproteinazların (MMP) periodontal hastalıkta bağ dokusu yıkımının önemli bir aracısı olduğu ve bazı MMP tek nükleotid polimorfizmlerinin agresif periodontitis ile bağlantılı olduğu; HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 genotipli hastaların T hücre yanıtını hızlandırmış olabileceğini ve bu nedenle periodontitise yatkınlık oluşturabileceği tespit edilmiştir (Greenstein & Hart, 2002; Vijayalakshmi ve ark., 2010; Umesh ve ark., 2021).

2.1.9. Periodontitis Histopatolojisi

Periodontitis gelişimi başlangıç, erken, yerleşik ve ilerlemiş lezyonlar olmak üzere 4 aşamaya ayrılabilir (Page & Schroeder, 1976; Kinane, 2001). Başlangıç lezyonu, mikrobiyal dental plak birikiminden 2-4 gün sonra başlar. Başlangıç lezyonu sırasında, birleşme epitelinin lateralindeki venüllerin pleksusunda akut eksüdatif vaskülit, PMN hücrelerin birleşme epitelinden dişeti oluşuna göçü, sulkustan sıvının birlikte eksüdasyonu ve perivasküler bölgede kollajen azalımı gözlenir. Erken lezyon 4-10 gün içinde gelişir. Bu lezyon, yoğun bir T lenfosit infiltratı ve diğer mononükleer hücrelerin yanı sıra fibroblastların patolojik değişimi ile karakterize edilir (Page & Schroeder, 1976; Kinane, 2001; Lindhe & Lang, 2017; Bostanci & Belibasakis, 2018). Yerleşik lezyon 2-3 hafta içinde gelişir. Bu lezyonda aktif B hücreleri (plazma hücreleri)

hakimdir, dişeti bağ dokusu hasarı artmıştır ancak henüz kemik kaybı saptanmamıştır. PMN, birleşme epitelinden göç etmeye devam eder ve dişeti cebi yavaş yavaş kurulur. Son olarak, ilerlemiş lezyonda, alveolar kemik ve periodontal ligamanın yıkımı ile birlikte dişeti dokusu bozulduğu için plazma hücreleri baskın olmaya devam eder. Birleşim epitelinin cep epiteline dönüşümü, plazma hücreleri ve makrofajlardan oluşan daha yoğun inflamatuvar infiltrat oluşumu, kök yüzeyine kollajen bağlanmasının kaybı ve alveolar kemiğin rezorpsiyonu ile karakterizedir. Bu safha periodontitis olarak adlandırılan safhadır (Şekil 2.5.) (Muñoz-Carrillo ve ark., 2019).



Şekil 2.5. Periodontal patogenezin histopatolojik lezyonları

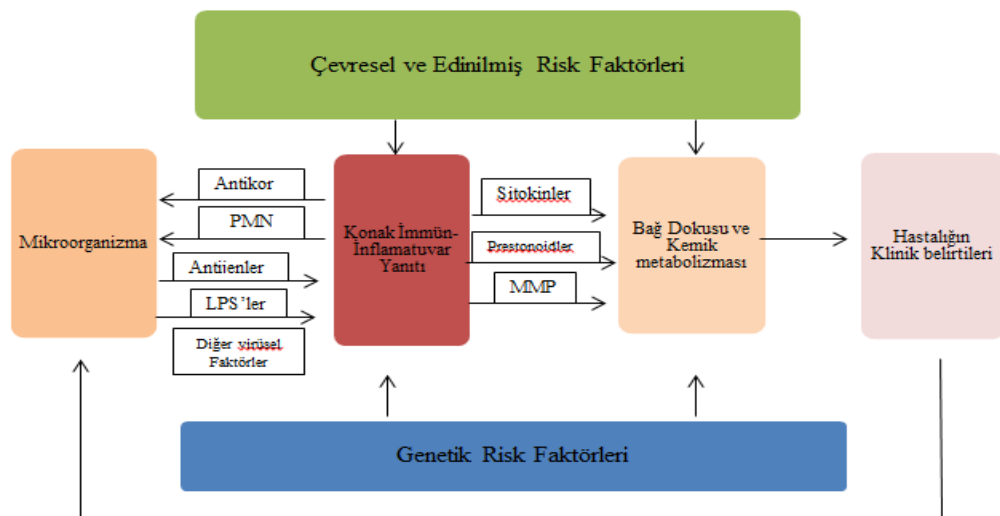
2.1.10. Periodontitis Patogenezi

20. yüzyılda, izolasyon ve kültür çalışmaları ile bir grup spesifik mikroorganizma, periodontitisin patojeni olarak tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmalar arasında, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* ve *Tannerella forsythia*'dan oluşan patojenik bir "kırmızı kompleks", 1980'lerin sonundan 1990'lara kadar periodontitis patogenezinin en temsili teorisi olarak önerilmiştir. Bununla birlikte, daha derin immünolojik araştırmalarla, periodontitis patogenezinde lokal konak immün yanıtının önemli bir rolü olduğu ortaya çıkmıştır (Pan ve ark., 2019).

Bakteriyel biyofilm oluşumu dişeti iltihabını başlatır; bununla birlikte, periodontitisin başlaması ve ilerlemesi, dişeti iltihabı ve doku yıkım ürünlerinden gelen

besinlere yanıt olarak mikrobiyomdaki disbiyotik ekolojik değişikliklere ve iltihaplanma başladıktan sonra dişeti sulkus bölgesindeki mikrobiyal tehdide karşı gelişen anti-bakteriyel mekanizmalara bağlıdır. Bu, periodontal bağ liflerinin kaybına, birleşme epitelinin apikal göçünü sağlayan ve kök yüzeyi boyunca bakteri biyofilminin apikal yayılmasına izin veren konakçı kaynaklı proteinazları aktive eden birkaç anahtar moleküler yolun aktivasyonuna yol açar. Bu nedenle periodontitisin birincil özellikleri, klinik ataşman kaybı, radyografik olarak değerlendirilen alveolar kemik kaybı, periodontal cep oluşumu ve dişeti kanaması ile kendini gösteren periodontal doku desteğinin kaybını içerir (Muñoz-Carrillo ve ark., 2019).

Birçok farklı bakteri türünün inflamasyon sürecine dahil olması nedeniyle hastalık polimikrobiyal bir patogeneze sahiptir (Benedetto ve ark., 2013). Oral mikrobiyotaya bağlı olarak bozulmuş konak immün ve inflamatuvar yanıtları, periodontal inflamasyonun ve doku yıkımının başlamasının, oluşumunun ve ilerlemesinin ana nedeni olarak kabul edilir (Bunte & Beikler, 2019). Periodontitisin gelişimi, periodontal patojenler ve konak immün sistemi arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan inflamasyonu artıran veya azaltan mediatörler arasındaki dengenin bozulması ile ilişkilidir. Bu nedenle, periodontitisin patogenezi anlamada immün ve inflamatuvar yanıtların nasıl düzenlendiği önemli bir role sahiptir (Çekici ve ark., 2014). Şekil 2.6' da periodontitis patogenezinin şematik hali gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Periodontal hastalık patogenezi (Meyle ve Chapple, 2015).

(LPS, lipopolisakarit; MMP'ler, matris metalloproteinazlar; PMN'ler, polimorfonükleer nötrofiller)

2.1.10.1. *Periodontitis patogenezinde immün-inflamatuvar yanıtlar*

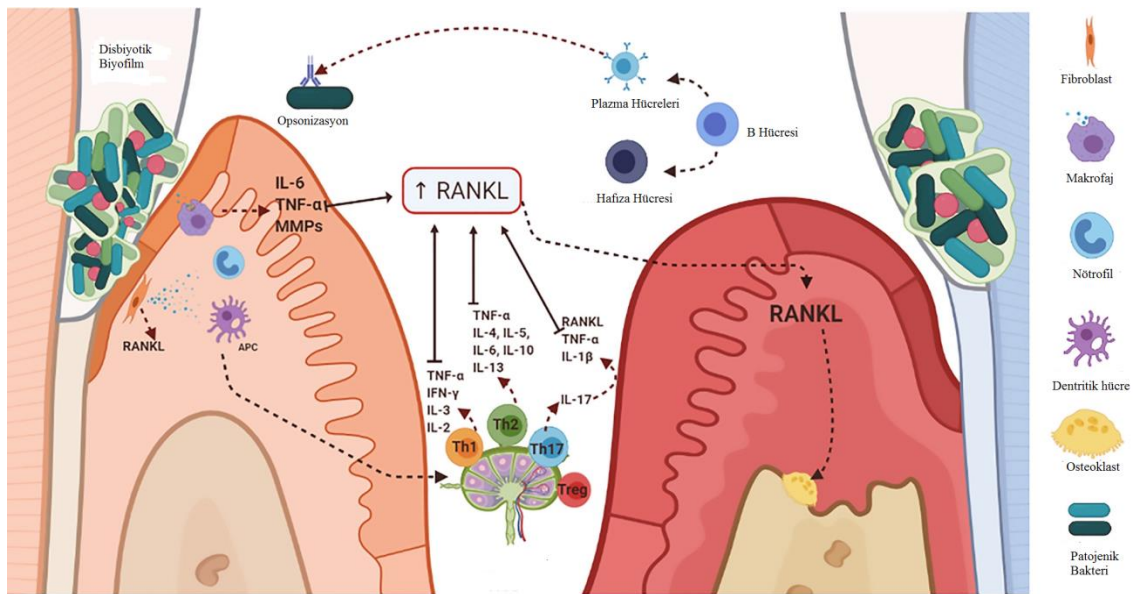
Bağışıklık, tüm bağışıklık hücrelerinin uyumlu ve doğru eylemine dayanan karmaşık bir süreçtir (Bouma ve ark., 2009; Bunte & Beikler, 2019). Kronik inflamatuvar hastalıklar karmaşık durumlar olup, çoğu zaman aynı anda rol oynayan birden fazla nedensel bileşen içerirler ve genellikle öngörülemeyen bir şekilde birbirleriyle etkileşime girerler. Başka bir deyişle, hastalık, mikrobiyal topluluklar (biyofilmler) ve birkaç bireysel faktörle açıklanması zor olan konak yanıtı gibi genetik ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucudur (Loos & Van Dyke, 2020).

Enflamasyon, doğal bağışıklık sisteminin çeşitli endojen veya eksojen uyaranlara karşı fizyolojik bir tepkisidir (Muñoz-Carrillo ve ark., 2019). Enflamasyonun ilk aşamalarında etkili olan doğal bağışıklık, patojenlere, doku hasarına ve yaralanmaya karşı ilk bağışıklık tepkisini oluşturur. Doğal bağışıklık tarafından etkinleştirilen adaptif bağışıklık, hafıza oluşumu ve uzun süreli koruma için gereklidir (Bouma ve ark., 2009; Bunte & Beikler, 2019). Enflamasyon akut bir paternle başlar; ancak hücresel ve hücresel olmayan mekanizmalar yoluyla adaptif immün yanıtı aktive ederek kronikleşebilir (Muñoz-Carrillo, 2019). Her iki bağışıklık biçimi de doku homeostazını korumak ve sürdürmek için koordinasyon içinde hareket eder. Etkileşimlerindeki düzensizlikler kronik inflamasyon ve otoimmünite ile sonuçlanabilir; sedef, RA, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve periodontitis gibi oldukça yaygın immün aracılı inflamatuvar hastalıkların (IMID'ler) başlaması ve ilerlemesi için temel oluşturabilir (Bouma ve ark., 2009; Bunte & Beikler, 2019).

Normal sağlık koşullarında, periodontal dokular, konakçı bağışıklık sisteminin çeşitli mekanizmaları yoluyla bakterilerin varlığı ile başa çıkabilir. Bununla birlikte, enfeksiyon kontrol mekanizmaları ile subgingival biyofilm arasındaki denge kaybolduğunda, inflamatuvar reaksiyonlar ve bağışıklık sistemi tetiklenir. Bu süreçler, dişleri çevreleyen ve destekleyen dokuların tahrip olmasına ve sonunda dokuların, kemiklerin ve nihayetinde dişlerin kaybına neden olur (Muñoz-Carrillo ve ark., 2019).

İlk olarak yerleşik lökositler ve endotel hücreler bakteriyel biyofilme karşı bir yanıt oluşturur. İlk yanıt olan akut inflamasyon, sitokin ve kemokinlerin üretimi yoluyla enfeksiyon bölgelerine yeterli hücrelerin toplanması için mikroorganizmalara karşı

verilen fizyolojik yanıttır. Bu aşamada klinik inflamasyon belirtisi yoktur, ancak dokulardaki değişiklikler histolojik olarak gözlemlenebilir. Bakterilerin metabolik ürünleri (lipopolisakkaritler, peptidoglikanlar gibi antijenler ve ürünler) konakçı hücrelerin yüzeyindeki reseptörler tarafından tanınır ve inflamatuvar yanıtı başlatarak sitokinler üretmek için bağlantı epitel hücrelerini tetikler ve nöronları, lokal kan damarlarının vazodilatasyonuna neden olan nöropeptitleri üretmesi için uyarır (Cekici ve ark., 2014; Yucel-Lindberg & Bage, 2013). Nötrofiller damardan ayrılır ve kemokinlere yanıt olarak inflamasyon bölgesine doğru göç eder. Bunu takiben, bağ dokusunda nötrofillerin, makrofajların, lenfositlerin, plazma hücrelerinin ve mast hücrelerinin sayısı artar ve kompleman proteinleri aktive edilir. Bir sonraki aşamada, doğal bağışıklık tepkisinden kazanılmış bağışıklık tepkisine geçiş meydana gelir. İnflamasyon devam ederse bakteriyel antijenler, lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından işlenir ve sunulur. Bu safhada makrofajlar, plazma hücreleri, T ve B lenfositleri baskındır ve B lenfositlerinin immünoglobulin (Ig) G1 ve Ig G3 alt sınıfları da mevcuttur. Kan akışı bozulmuştur ve kollajenolitik aktivite artmıştır. Ayrıca fibroblastlar tarafından artan kolajen üretimi de vardır. Klinik olarak bu evre, dişeti kanaması, renk ve kontur değişiklikleri ile orta veya şiddetli dişeti iltihabı olarak adlandırılır. Bundan sonraki aşama periodontitise geçiştir. Geri dönüşümsüz ataşman kaybı ve kemik kaybı histolojik ve klinik olarak gözlenir. Enflamatuvar lezyonların alveolar kemiği etkileyerek daha derine uzandığı gözlenir (Cekici ve ark., 2014). Periodontal hastalık sırasında bağışıklık tepkisi şekil 2.7’de verilmiştir.



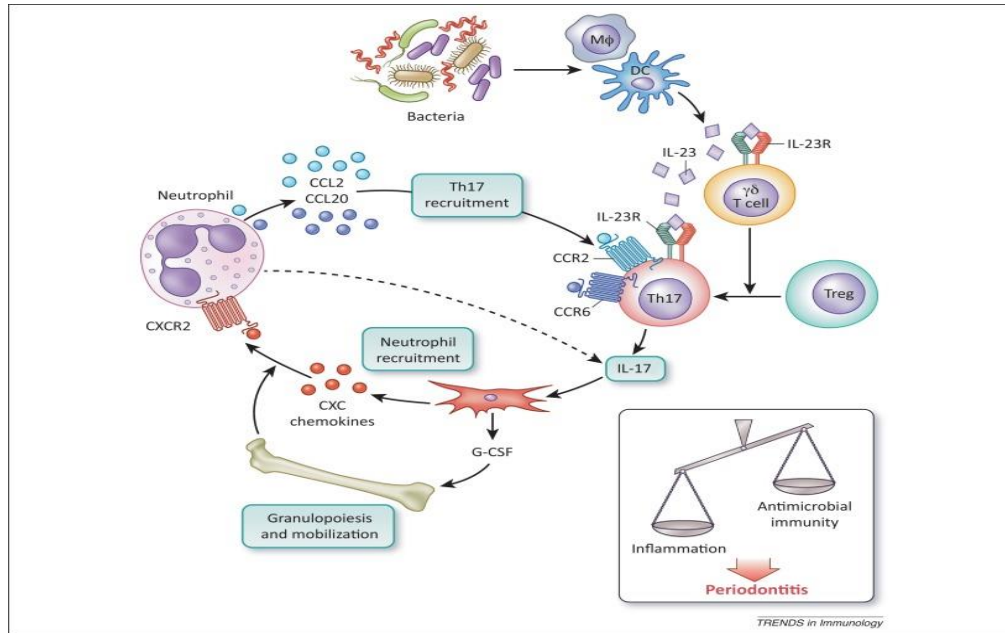
Şekil 2.7. Periodontal hastalık sırasında bağışıklık tepkisi (Becerra- Ruiz ve ark., 2022)

2.1.10.2. Periodontitis patogenezinde nötrofillerin rolü

Nötrofiller, subgingival aralıkta veya periodontal ceplerde gözlenen en yaygın lökositlerdir. Azalmış nötrofil sayısına sahip bireylerde şiddetli periodontitis gelişir ve bu da periodontal doku homeostazı için nötrofillerin gerekli olduğu hipotezini doğrular (Hajishengallis, 2015). Nötrofil bozukluklarında, nötrofil miktarındaki dikkate değer azalma, konak savunma kapasitesini düzensizleştirme eğilimindedir ve periodontal hastalığın daha genç yaşta ortaya çıkmasına neden olur. Dişeti iltihabı, agresif periodontal doku yıkımı, ödem, cep oluşumu ve diş hareketliliği sık görülen belirtilerdir. Bu klinik görünüm, süt dişlerinin erken kaybıyla prepuberal veya hızlı ilerleyen periodontitise çok benzer (Umesh ve ark., 2021). Bununla birlikte hiperaktif, fazla sayıda veya düzensiz nötrofiller, enflamatuvar ve toksik maddelerin veya dokuyu bozan enzimlerin salınımı yoluyla ikincil doku hasarına da neden olabilir (Hajishengallis, 2015). Polimorfonükleer nötrofiller, periodontal dokuların yıkımına önemli ölçüde katkıda bulunma olasılığı en yüksek hücrelerdir ve bunların hiperfonksiyonellikleri periodontitiste, özellikle agresif periodontitiste gözlenmiştir. Nötrofiller, reaktif oksijen türleri, lizozim, kolajenazlar ve elastaz gibi yüksek düzeyde dokuya zarar veren enzimler ve maddeler salgırlar. Ek olarak, inflamasyonun devam eden kronikliğine katkıda bulunan proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretirler; bu

bağışıklık araçları dolaşıma sızacak ve periodontitisin sistemik proinflamatuvar etkilerine katkıda bulunacaktır. Örneğin, periodontitis hastalarından alınan plazma örneklerinin sağlıklı donörlerden alınan nötrofiller tarafından süperoksit üretimini arttırmada etkili olduğu ex vivo deneylerde gösterilmiştir. Hiperaktif nötrofiller, özellikle alveolar kemiğe yakın olduklarında, osteoklastik aktivitenin uyarılması yoluyla kemik yıkımına da katkıda bulunabilirler; büyük olasılıkla nötrofiller, osteoklastların aktivitesine aracılık eden ve yönlendiren yardımcı T hücre 17 (Th17) hücrelerinin kemotaktik alımına katılmaktadır (Loos & Van Dyke, 2020). Şekil 2.8’de nötrofil-periodontitis ilişkisi gösterilmiştir.

Meyle & Chapple (2015) yaptıkları çalışmada periodontitisli hastalardan alınan periferik kan nötrofillerinin kusurlu kemotaksik doğruluğu olduğunu, potansiyel olarak doku geçiş sürelerini ve dolayısıyla kollateral doku hasarına neden olma potansiyellerini artırdığını göstermiştir (Meyle & Chapple, 2015). Hishengallis’in çalışması da nötrofillerin, RA ve sedef hastalığı gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda giderek daha fazla kabul gören bir rol oynadığını göstermektedir (Hajishengallis, 2014).



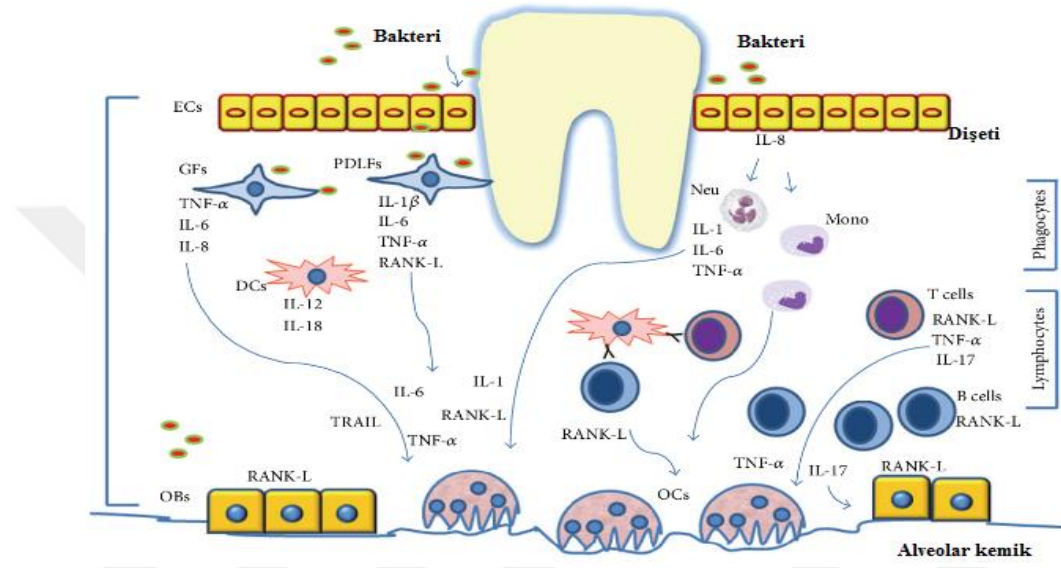
Şekil 2.8. Periodontitisde nötrofillerin rolü (Hajishengallis, 2014)

2.1.10.3. Periodontitis patogenezinde sitokin ve kemokinlerin rolü

Periodontitis, periodontal bölgedeki hem yumuşak hem de sert dokunun yıkımını içeren iltihabi bir hastalıktır. Lokal mikrobiyal topluluğun disbiyozisi, lokal inflamasyonu başlatsa da, konakçı immün yanıtının aşırı aktivasyonu, osteoklastik aktiviteyi ve alveolar kemik kaybını doğrudan aktive eder. Birçok çalışma, periodontitis ile ilgili sitokin ağı ve bunun spesifik immünoisitlerin alınması, patobiyontların kontrolü ve osteoklastik aktivitenin indüksiyonu veya baskılanması üzerindeki önemli ve pleiotropik etkisi olduğunu göstermektedir (Pan ve ark., 2019). İnsan in-vitro ve in-vivo analizlerinin büyük bir kısmı ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, sitokinlerin periodontal bozuklukta immün yanıtın tüm aşamalarında anahtar bir rol oynadığını kuvvetle doğrulamaktadır (Umesh ve ark., 2021). Sitokin ağı, doku homeostazında, patojenik etkiyi kontrol etmek için bağışıklık hücrelerinin alınmasında ve osteoklastik fonksiyonun düzenlenmesinde birincil rol oynar, böylece bağışıklık tepkisinin yoğunluğunu ve süresini modüle eder (Plemmenos ve ark., 2021). Doğal bağışıklık (makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, nötrofiller) ve adaptif bağışıklık (örneğin B ve T lenfositler) hücrelerinin müdahalesiyle periodontal bakteriler ve bağışıklık arasında bir mücadele gerçekleşir bunun sonucunda proinflamatuvar moleküller (interferon-gama, IL-1, IL-6, IL-17, TNF gibi) ve enzimler (matris metalloproteinazlar gibi kollajenazlar) salınır. İnflamatuvar yanıt, bir yandan vücudumuzun daha derin dokulardaki (kemik gibi) bakteri istilasına karşı koruyan bir savunma şeklidir. Öte yandan, iltihaplanma devam eder ve düzenlenme yetersiz kalırsa, periodontal cepler, ataşman kaybı, diş eti çekilmeleri, diş hareketliliği, diş göçü ve diş kaybı gibi tipik periodontitis belirtileri ile periodonsiyumda geri dönüşü olmayan bir tahribata neden olur (Cecoro ve ark., 2020).

Periodontitisin ilerlemesinde sitokinlerin rolü son derece önemlidir. Sitokinler, bariyer bölgelerinde patojenlere ve uyaranlara karşı ilk tepki dalgasında hareket eden ve doku hücrelerini lenfositler ve aksesuar hücre popülasyonları ile bağlayan, hem homeostazın hem de inflamatuvar süreçlerin anahtar modülatörleridir. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, sitokinlerdeki ve ilişkili reseptör kodlayan genlerdeki tek nükleoid polimorfizmlerinin periodontitis riski ve şiddeti ile ilişkili olduğunu, sitokinlerin düzensiz düzenlenmesinin periodontitisi başlattığını veya hızlandığını

göstermiştir. İnsan ve deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin ekspresyonunun manipüle edilmesinin alveolar kemik kaybı fenotipini etkilediğini ve periodontal hastalık için sitokin hedefli tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini belirtmektedir (Pan ve ark., 2019). Şekil 2.9'da sitokin ağı gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Periodontal kemik rezorpsiyonunda yer alan yerleşik ve göç eden hücreler (lenfositler ve fagositler) tarafından salınan sitokin ağı (Benedetto ve ark., 2013)

Periodontitis sırasında IL-1, IL-6, TNF- α ve prostaglandin E2 (PGE2) gibi lokal olarak üretilen proinflatuar mediatörler sistemik dokuya geçerek daha sonra uzak organlar üzerinde etkiler gösterebilir, bir inflammatuar durumu artırabilir ve/veya sürdürebilir (Cecoro ve ark., 2020). En belirgin proinflatuar sitokinler ve kemokinler arasında, TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-6, IL-1, IL-12, IL-18, IL-21, kemokin ligand 6-8 (CXCL6-8) yer alır. Bu sitokin ve kemokinlerin periodontitis hastalarında aşırı eksprese edildiği ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olup periodontitis patogenezinde rol oynayabilecekleri gösterilmiştir (Yücel-Lindberg & Bage; 2013; Plemmenos ve ark., 2021). Öte yandan, periodontitisde anti-inflatuar sitokin olan IL-4 ve IL-11 seviyeleri azalırken, IL-12 ve interferon- γ ekspresyonu periodontal hastalığın ilerlemesi veya engellenmesinde rol oynar (Plemmenos ve ark., 2021). Örneğin, B hücreleri periodontitisin patogenezinde rol alan birçok efektör molekül salgılar. IL-1 ve IL-6 en önemli efektör moleküllerdendir (Oldrich ve ark., 2009). Bakteriyel LPS'ye yanıt olarak

epitel hücreleri, lenfositler, monositler ve fibroblastlar tarafından IL-6, IL-1 ve TNF- α üretilir ve bu efektör moleküllerin osteoklast oluşumunu uyardığı gösterilmiştir. Sağlıklı kontrollere kıyasla periodontitisli hastaların diş oluşu sıvısında gelişmiş IL-6 seviyeleri gösterilmiştir ve periodontitis dokusu sağlıklı dişeti dokusu ile karşılaştırıldığında hastalıklı dişeti dokularında daha yüksek IL-6 ekspresyonu rapor edilmiştir (Yücel-Lindberg & Bage, 2013). Benzer şekilde, cerrahi olmayan periodontal tedaviden sonra dolaşımdaki artan sistemik IL-6 seviyeleri azalmış ve periodontal durumun klinik olarak iyileşmesi ile sonuçlanmıştır (Marcaccini ve ark., 2009). Aynı şekilde TNF- α , bakteri saldırılarına yanıt olarak mast hücrelerinden salınır ve inflamatuvar kaskadın erken aşamalarında yer alır. Klinik bağlamda, TNF- α ve IL-1 β , periodontitis dişeti oluşu sıvısı ve dişeti dokusunda artan konsantrasyonlarda bulunmuştur ve periodontal hastalık tedavisinden sonra seviyelerinin düştüğü bildirilmiştir. Anti-TNF tedavisinden sonra RA'lı periodontitis hastalarında ataşman kaybının azaldığı ve sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda dişetine uygulanan TNF- α veya IL-1 sitokinlerinin periodontitisi şiddetlendirdiğine dair raporlarla bu sitokinlerin periodontisteki rolü daha da fazla desteklenmektedir. İnflamatuvar yanıtta yer alan çok sayıda sitokin arasında önemli bir etkileşim vardır ve inflamatuvar hastalıkların gelecekteki tedavisi ve yönetimi için ek anahtar oyuncularını belirlemek için çalışmalar devam etmektedir (Yücel-Lindberg & Bage, 2013).

2.1.11. Periodontitis Tedavisi

Periodontitis tedavisi, diş kaybı riskini azaltmak, semptomları en aza indirmek, kaybedilen periodontal dokuyu geri kazanmak ve sağlıklı bir periodontiyumun sürdürülmesini sağlamak amacıyla hastalığın ilerlemesini önlemeyi amaçlar (Graziani ve ark., 2017). Periodontitis tedavisi, iltihabı hafifletmeli, bağışıklık reaksiyonunu düzenlemeli ve periodontal doku yenilenmesini desteklemelidir (Zhang ve ark., 2018). Doğru teşhis, hastalığa sebep olan nedenlerin ortadan kaldırılması, değiştirilebilir risk faktörlerinin azaltılması, periodontitisin başarılı bir şekilde önlenmesi ve tedavisi için çok önemlidir. İlk olarak hastanın durumuna göre cerrahi olmayan periodontal tedavi önerilir. Bu tedavi temel olarak evde bakım incelemesi, ölçkleme ve kök planlamasından oluşur. Cerrahi olmayan periodontal tedavinin tamamlanmasının ardından, aktif periodontitisli herhangi bir rezidüel bölgeyi yok etmek için çağdaş

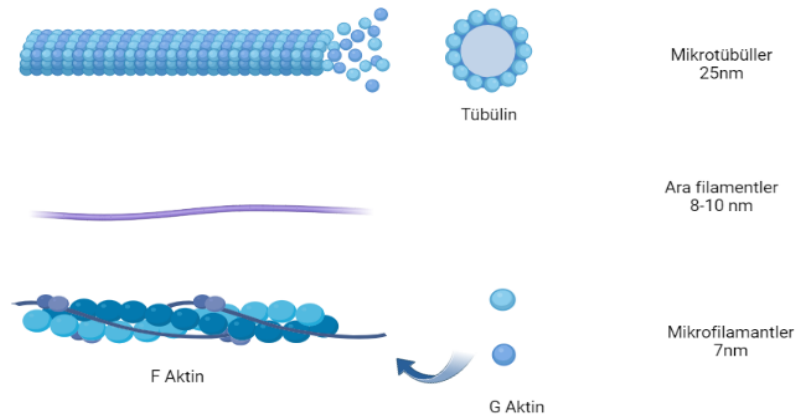
rejeneratif veya geleneksel rezektif cerrahi tedavi yöntemleri kullanılır. Bundan sonra, periodontal bakım tedavisi ve uzun süreli takip, tedavinin başarısı ve dişlerin uzun süreli tutulması için çok önemlidir (Kwon ve ark., 2021). Ayrıca, periodontitis tedavi yönetimi, diyabet kontrolü, sigara bırakımı gibi uygun risk faktörü azaltmayı içeren kişiselleştirilmiş bir risk değerlendirmesi ve tedavi planı da içermelidir (Kumar, 2018).

Tanı ve tedavi yöntemleri sadece altta yatan hastalığın teşhisini amaçlamamalı, aynı zamanda tedaviyi planlamak için bir temel oluşturmalı ve periodontal tedavinin etkinliğini değerlendirmek için araçlar sağlamalıdır. Optimal yenilikçi yaklaşımlarla, mevcut hastalık aktivitesinin varlığını doğru bir şekilde belirleme, gelecekte oluşabilecek tekrarlama alanlarını tahmin etmeye çalışılmaktadır. Periodontitisin başlaması ve ilerlemesinde rol oynayan araçların anlaşılması konusunda bir dizi iyileştirme yapılmıştır, ancak tek bir belirtecin periodontitisin klinik durumunun değerlendirilmesi için gerekli tüm kriterleri tam olarak karşılayamadığı görülmekle birlikte, gelecekteki araştırmalarda bu belirteçlerin bir bütün halinde çalışılacağı düşünülmektedir (Ram ve ark., 2015).

2.2. HÜCRE İSKELETİ

Hücre iskelet sistemleri, plazma zarından nükleer zarfa ve hatta çekirdeğin içine uzanan birkaç filamentli ağdan oluşur. Hücre iskeleti hücreyi komşu hücrelere ve hücre dışı matrikse bağlamada ve plazma zarını kaplayan özel hücre bağlantıları yoluyla hücreyi sabitlemede rol oynar. Bazı hücrelerde %80'den fazla olan toplam hücresel proteinin büyük bir kısmı hücre iskeleti kaynaklıdır (Ramaekers & Bosman, 2004). Hücre iskeleti, hücre şeklinin korunması, hücre hareketi, hücre farklılaşması, hücre sinyali, hücre bölünmesi, dış kuvvetlere tepki, yapışma, hücre replikasyonu ve apoptoz dahil, canlı hücrelerin tüm yapısal ve dinamik yönleriyle ilgili olan organizasyonunda işbirliği yapan yüzlerce farklı (ilişkili) proteinden oluşan, karmaşık çok yönlü bir yapıdır (Ramaekers & Bosman, 2004; Hohmann & Dehghani, 2019; MacTaggart & Kashina, 2021). Ökaryotik hücrelerin hücre iskeleti, hücre boyunca uzanan filamentli yapılar oluşturan üç ana protein ailesinden oluşur (Ramaekers & Bosman, 2004). Çeşitli işlevleri kolaylaştırmak için ana hücre iskeleti bileşenleri olan mikrotübüller, aktin filamentleri ve ara filamentler farklı hücre içi alanlarda ve hücre tiplerinde oldukça

çeşitli yapılar oluşturmaktadır (MacTaggart & Kashina, 2021). Farklı aktin izoformlarından oluşan mikrofilamentler, α - ve β -tübulinden yapılmış mikrotübüller ve ara filamentler, bunlarla ilişkili moleküler motor ve düzenleyici proteinlerle kompleks oluşturarak işlev görürler (Ramaekers & Bosman, 2004). Her üçü de deformasyona direnen ancak dışarıdan uygulanan kuvvetlere yanıt olarak yeniden düzenlenebilen ağlar halinde düzenlenmiş olup hücre içi bölümlerin bütünlüğünü düzenlemede ve korumada önemli rollere sahiptirler (Fletcher & Mullins, 2010). Mikrofilamentler ve mikrotübüller, yüksek oranda korunmuş küresel proteinlerden bir araya getirilirken, ara filamentler, merkezi bir α -sarmal alanı olan uzatılmış proteinlerden oluşturulur. Bu farklı proteinler korunmuş bir alt yapıya sahip olmalarına rağmen, α -sarmal olmayan baş ve kuyruk alanlarındaki amino asit dizilerine göre önemli farklılıklar ile karakterize edilirler. Ara filament protein ailesinin çeşitli üyeleri, dokuya özgü bir şekilde ifade edilir (Ramaekers & Bosman, 2004). Şekil 2.10.'de hücre iskelet elemanları gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Hücre iskelet elemanları

Mikrotübüller, hücre iskeletinin en kalın ve en sert elemanı olup içi boş tüpler oluşturmak üzere yanal olarak birleşen protofilamentlere baştan kuyruğa doğru bağlanan α - ve β -tübulin dimerlerinden oluşan uzun ve içi boş silindirlere (Tang &

Gerlach, 2017). Mikrotübül duvarlarında tübülün dimerlerini içeren 13 kolon yer alır. Mikrotübüller, α ve β tübülün dimerlerinin GTP enerjisi kullanılarak polimerleşmesi sonucu meydana gelir. Oluşan mikrotübüller tekrar alt birimlerine ayrılabilir ve bu alt birimler hücrenin başka bir bölgesinde tekrar birleşebilir. En temel görevleri hücre hareketi, organel lokalizasyonu ve hücre bölünmesi sırasında koromozomların yer değiştirmesidir (Özdil ve ark., 2017).

Ara filamentler, 10 nanometre çapları ile mikrofilamentlerin ve mikrotübüllerin arasında yer alan hücre iskeleti elemanıdır. Sitoplazma içinde anastomozlu bir ağ halinde toplanır (Fuchs & Cleveland, 1998). Ara filamentler, üç tip hücre iskeleti polimeri arasında en az sert olanıdır ve çekme kuvvetlerine sıkıştırma kuvvetlerinden çok daha etkili bir şekilde direnirler. Plektinler adı verilen proteinler tarafından aktin filamentleri ve mikrotübüllerin yanı sıra birbirlerine çapraz bağlanabilirler ve bazı ara filament yapıları esas olarak mikrotübüller veya aktin filamentleri ile etkileşimler yoluyla organize edilebilir. Mikrotübüller ve aktin filamentlerinin aksine, ara filamentler polarize değildir ve motor proteinlerin yönlü hareketini destekleyemez (Fletcher & Mullins, 2010).

Mikrofilamentler, lineer G-aktin polimerlerinden oluşan en ince filamentlerdir. Ökaryotik hücrelerde aktin; uzun, ince lifler oluşturmak üzere polimerize olan en bol hücre içi proteindir. Aktin monomerleri kritik ve korunmuş bir organizasyon yapısındadır ve farklı fonksiyonlara sahip α -aktin, β -aktin ve γ -aktin olmak üzere üç ana izoforma sahiptirler. α -aktin genellikle kas dokularının kasılma bileşenleri ile ilişkilidir, β -aktin ise çoğu hücre tipinde polimerizasyon veya diğer hücresel etkileşimlerle sıklıkla ilişkilidir (Melekoğlu & Karahan, 2019). G-aktin; serbest küresel monomerler, uzun, sarmal filamentler halinde polimerize olabilir ve F-aktin olarak adlandırılan doğrusal polimerleri oluştururlar. Bu polimerizasyon, Mg^{2+} , K^+ veya Na^+ iyonlarıyla zenginleştirilmiş çözeltilerle indüklenebilir (Melekoğlu & Karahan, 2019). F-aktin hücre iskeletinin dinamik düzenlenmesi, hücre yapışması, göçü ve bölünmesi dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreç için kritik öneme sahiptir. Bu süreçlerin her biri, büyük ölçüde, çeşitli F-aktin ağları ve demetlerinin dinamik hareketleri tarafından düzenlenen hücre şeklinin ve mekanik kuvvetin hassas bir şekilde düzenlenmesini gerektirir (Stricker ve ark., 2010). F-aktin, göç eden hücrelerde sayısız işleve sahiptir.

En önemli rolü psödopodlar ve lamellipodlar gibi çıkıntılarının oluşturulmasıdır. İkinci önemli rolü ise endositoz ve vezikül ayrımını yönlendirerek hücre içi trafiğin sürdürülmesidir. Bu çeşitli işlevler, aktin ağının dallanmasını ve büyümesini sağlayan yüksek oranda korunmuş Arp2/3 kompleksine bağlıdır (Amato ve ark., 2019). Hücreler, Arp2/3 kompleksini kontrol etmek için WASP çekirdeklenmeyi teşvik edici faktörler ailesini kullanır. Ailenin kurucu üyesi, WASP, hematopoietik soylara özgüdür ve hücre göçündeki temel görevi klatrin aracılı endositozu kolaylaştırmaktır (Derry ve ark., 1994; Amato ve ark., 2019).

Ökaryotik hücrelerin aktin hücre iskeleti, hücre bölünmesi sırasında şiddetli değişikliklere ve yeniden şekillenmeye uğrar. Fazlar arası hücreler genellikle geniş bir aktin ağı içerir, ancak hücreler mitozla girdiğinde bu ağ hızla parçalanır ve yeniden düzenlenir, mitotik hücrelere karakteristik yuvarlak şekillerini verir. Mitozun sonunda, aktin bölünme oluklarında yeniden düzenlenir ve sitokinez sürecinin merkezi olan kasılma halkasının bir parçasını oluşturur. Aktin ağının önemli bir rol oynadığı bir başka mitotik olay, kortikal aktin ve miyozin ağının kortikal akışına bağlı olan sentrozomların ayrılmasıdır (Heng & Koh, 2010).

Hücre iskeleti protein aberasyonları, birçok patolojik fenotipin altında yatan nedendir. Bu kadar önemli hücresel yapıdaki değişikliklerin patolojik sonuçlara yol açması şaşırtıcı değildir. Birçok kardiyovasküler hastalık sendromu, nörodejenerasyon, kanser (invazyon), karaciğer sirozu, pulmoner fibroz ve kabarcıklı cilt hastalıkları dahil olmak üzere birçok hastalık hücre iskeleti ve nükleoskeletal proteinlerdeki anormallikler ile ilişkilendirilmiştir (Ramaekers & Bosman 2004).

2.2.1. Hücre Göçü

Hücre göçü, hücrenin hareket etmesi ve çevresindeki ortam değişikliklerine uyum sağlaması için gerekli olan hücresel yapının sürekli yeniden şekillenmesini içeren karmaşık, dinamik bir süreçtir (Sadok & Marshall, 2014). Çok hücreli organizmalar uygun organizasyonunu kurmak ve sürdürmek için hücre göçünü kullanır. Yetişkin bir organizmada, hücre göçü; uygun bağışıklık tepkisi, yara onarımı ve doku homeostazı

için esastır ve çeşitli patolojilerde anormal hücre göçü kusurları saptanmıştır (Trepap ve ark., 2012).

Hücreler tek tek veya toplu halde hareket edebilirler. Hücrelerin hareket yönü nadiren rastgeledir; çoğu durumda, göç yönlü bir şekilde gerçekleşir, bu sayede hücreler belirli bir konumdan diğerine yer değiştirir. Örneğin, bağışıklık hücreleri enfeksiyon bölgelerine doğru hareket eder; bakteriler besin kaynaklarına doğru göç eder; radyal glia hücreleri, germ hücreleri ve nöral krest hücreleri, gelişmekte olan embriyoda doku ve organları oluşturmak için göç eder. Yönlü göç daha çok yara iyileşmesi ve kanser istilas sırasında meydana gelir (Shellard & Mayor, 2020).

Genel olarak hücre göçü, dört aşamada gerçekleşir. İlk olarak, ekstraselüler matriks (ECM) yapışkan proteinlere yanıt olarak, hücrelerin ön tarafında lamellipodia adı verilen bir çıkıntı oluşturur. Daha sonra ECM'ye bağlanmalarını güçlendirmek için hareketli hücrelerin önünde yeni odak adezyonları oluşur. Aktomiyosin aktivitesi, arka kısmın geri çekilmesini sağlamak için artar. Son olarak hücrenin arkasındaki fokal yapışıklıklar, tüm hücre gövdesinin ileriye doğru hareket etmesine izin vermek için demonte edilir (Tang & Gerlach, 2017). Bu dört aşama ayrıntılı olarak incelendiğinde; bir hücrenin yönlü olarak göç etmesi için polarize olması gerekir, yani hücrenin ön ve arka tarafı arasındaki simetri kırılır. Bu simetri değişikliğinin temeli, ön kenarda aktin polimerizasyonu olup, odak temasları ile substrata yapışan çıkıntılar olarak adlandırılan zarın dışa doğru büyümesine dayanır. Stres lifleri olarak adlandırılan miyozin II motorlarını içeren aktin filament demetleri, odak temaslarına bağlanır ve yapışma için kasılma kuvvetleri oluşturur. Kasılma kuvvetleri alt tabakaya aktarılır. Hücrenin arka kısmında fokal yapışıklıklar çözülür, hücre gövdesi ve çekirdek geri çekilir. Aktin polimerizasyonu ve miyozin kasılma kuvvetleri birlikte hücreyi ileriye doğru hareket ettirir. Bu kuvvetlerin ve hareketlilik süreçlerinin organizasyonu küçük GTPaz'lara bağlıdır. Cdc42 (hücre bölünmesi kontrol proteini 42), hücre polaritesi düzenleyicisidir. Rac, SCAR/WAVE, Arp2/3'ü aktive ederek öndeki aktin polimerizasyonunu koordine eder. RhoA aktomiyosin kontraktilitesini ve arka retraksiyonu düzenler (Ciobanasu ve ark., 2012; Bachir ve ark., 2017).

Göç eden hücrenin ön kenarlarında lamellipodia, filopodia, invadopodia gibi çıkıntıların oluşumu, yapışma (lamella ve stres lifleri) ve şekil değişikliği (korteks) için

gerekli olanlar da dahil olmak üzere hücre göçünün farklı adımları aktin polimerizasyonu ve aktin hücre iskeletinin düzenleyicileri tarafından kontrol edilir (Stricker ve ark., 2010; Frugniet ve ark., 2015). Genel olarak, lamellipodanın hücre göçünde ana itici gücü sağlayan anahtar yapılar olduğu, filopodanın ise hücre dışındaki çevreyi algılamada, hücre göçüne rehberlik etmede ve ECM ile adezyon oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Aktin filamentlerinin organizasyonu, hücre hareketliliğini sağlayan çeşitli çıkıntılarda farklıdır. Aktin filamentleri lamellipodiada dallanma ağında toplanırken filopodiada uzun paralel demetler oluşturur. WASP/WAVE ailesi proteinleri, aktin filamentlerinin, lamellipodia oluşumundan sorumlu ana yapılar olan dallı aktin ağlarının oluşumunu indüklemek için Arp2/3 kompleksi ile etkileşime girer (Tang ve ark., 2005; Pollard & Cooper, 2009; Frugniet ve ark., 2015). WASP, GTPazlar ile aktin hücre iskeleti arasında kilit bağlantı oluşturan bir grup moleküldür. WASP proteini, Arp2/3 kompleksinin aktive edilmesi yoluyla aktin polimerizasyonunun kontrolündeki rolü hücre göçünde görülen aktin bazlı membran çıkıntılarının oluşmasında kritik öneme sahiptir. Bu nedenle WASP'ın hücre göçündeki aktivitesi son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Frugniet ve ark., 2015).

Lökositlerin bir yaralanma veya iltihaplanma bölgesine göçü, damar duvarına bağlanma, duvar boyunca endotel sınırlarına hareket, endotel ve alt endotelyal membran boyunca enine göç ve yer değiştirme dahil olmak üzere bir dizi adımı içerir. Lökositlerin transendotelyal göçünü kontrol etmek için kavşak adezyon molekülleri, endotel hücre seçici adhezyon molekülleri ve endotelyal sıkı bağlantı düzenleyicileri dahil olmak üzere çeşitli endotel molekülleri tanımlanmıştır (Kopecki ve ark., 2016). Bununla birlikte, lökosit perivasküler ekstrasvazasyonu, doku hasarı bölgesine göç ve hücre dışı matrikse yapışma, aktin hücre iskeletinin polarizasyonu tarafından yönetilir (Weninger ve ark., 2014).

Hücre göçünün anormal düzenlenmesi otoimmün hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalığa sebep olur (Yamaguchi & Condeelis, 2007). Hücre göçü, kanser hücrelerinin metastazındaki en önemli adımdır. Metastaz için hücre göçü, komşu dokulara invazyon ve kan/lenfatik damarlara intravazyon gereklidir (Yamaguchi ve ark., 2005). Kanser hücrelerinin göçündeki en önemli yapılar çıkıntılardır (filopodia, lamellipodia ve invadopodia/podozomlar)

(Yamaguchi & Condeelis, 2007). Son bulgular, istilacı kanser hücrelerinin, proteolitik enzimlerin kümелendiği iskeleler olarak hizmet ettiği düşünülen, podozomlar veya invadopodia adı verilen özel ve odaklanmış aktin bakımından zengin makro yapılarda ECM'yi sindirdiğini ve yeniden düzenlediğini göstermektedir (Kurusu & Takenawa, 2010). Hücre göçü ve istilas, bir dizi kemoatraktan tarafından tetiklenir. Hücre yüzeyi reseptörlerine bağlandıktan sonra, bu kemo-çekici maddeler, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlayan hücre içi sinyal yollarını uyarır. Bugüne kadar sinyal yollarına aracılık eden birkaç önemli proteinin, çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese edildiği tanımlanmıştır. Bunlar arasında yer alan WASP, Arp2/3 kompleksi, kinaz/kofilin ve kortaktin yolakları, hücre göçü ve istilasındaki kritik önemleri nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Yamaguchi & Condeelis, 2007).

Hücre göçü üzerine yapılan çalışmalarda kötü huylu kanser hücrelerinin yayılmasını azaltma, iltihaplanma sürecinde beyaz kan hücrelerin istilasını geciktirme veya yaraların iyileşmesini hızlandırma amaçlanmaktadır (Trepas ve ark., 2012).

2.2.2. Aktin Hücre İskeleti ve Bağışıklık Hücre İşlevi

Aktin hücre iskeletinin bütünlüğünün kaybı, istilacı patojenlerin hücre göçünü, yapışmasını, çoğalmasını ve fagositozunu bozarak doğal ve adaptif bağışıklık tepkisinin hemen hemen her alanında kusurlara neden olur (Su ve ark., 2019). Doğal bağışıklık enfeksiyonun ilk aşamalarında önemliken, uzun süreli koruma ve hafızayı sürdürmek için adaptif bağışıklık gereklidir; etkili bir bağışıklık için bu iki bağışıklığın birlikte ve kordineli hareketi gerekir (Worthylake ve Burridge 2001; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004). Hem doğal hem de adaptif bağışıklık hücreleri, etkili hücre fonksiyon için dinamik hücre iskeleti yeniden düzenlemelerini kullanır (Bouma ve ark., 2009). Kan yoluyla taşınan nötrofillerin ve monositlerin inflamatuvar bölgelere alınması, hücrelerin kan akışından vasküler endotel yoluyla alttaki dokuya diapedize olmasına izin veren dinamik hücre şekli değişikliklerine bağlıdır (Worthylake & Burridge 2001; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid 2004). Bu bağlanma, yuvarlanma ve ekstravazasyon sürecinde birkaç adım yer alır ve aktin hücre iskeleti bu adımların hepsinde önemli bir rol oynar. Enflamatuvar bölgede, partiküler antijenlerin fagositozu

ve çözünür antijenlerin nötrofiller ve makrofajlar tarafından endositoz/pinositoz yoluyla alınması, aktin hücre iskeleti tarafından düzenlenen plazma zarının protrüzyonunu ve retraksiyonunu gerektirir (Swanson, 2008). Enflamatuvar bir ortamda dendritik hücreler (DC'ler) tarafından antijenlerin alınması, DC'nin olgunlaşmasını ve drene olan lenfoid dokulara göçünü başlatır, burada yakalanan antijeni T hücrelerine sunarlar (Bouma ve ark., 2009). DC motilitesi ve T hücresi hazırlama sırasında immünolojik sinapsın (IS) oluşumu için dinamik hücre iskeleti yeniden düzenlemesi zorunludur (Al-Alwan ve ark., 2001; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid 2004). T hücreleri, antijen sunan hücrelerle (APC) karşılaştıktan sonra hücre iskeleti organizasyonuna girer ve bu süreç, hem lamellipodia oluşumunu hem de mikrotübül düzenleyici merkezin IS'ye yeniden yönlendirilmesini içerir. T hücrelerindeki hatalı Arp2/3, kusurlu lamellipodia oluşumuna yol açar ve bunların APC'lerle konjugasyonunu bozar (Su ve ark., 2019). Primer T hücreleri daha sonra patojenlerin temizlenmesinde makrofajlara yardımcı olmak veya virüs bulaşmış hücrelerin sitotoksik T hücreleri tarafından öldürülmesi gibi efektör işlevi uygulamak için enflamatuvar bölgeye ev sahipliği yapar. Yine bu süreçler için fonksiyonel ve dinamik bir hücre iskeleti yeniden düzenleme mekanizması gereklidir (Worthylake & Burridge 2001; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid 2004).

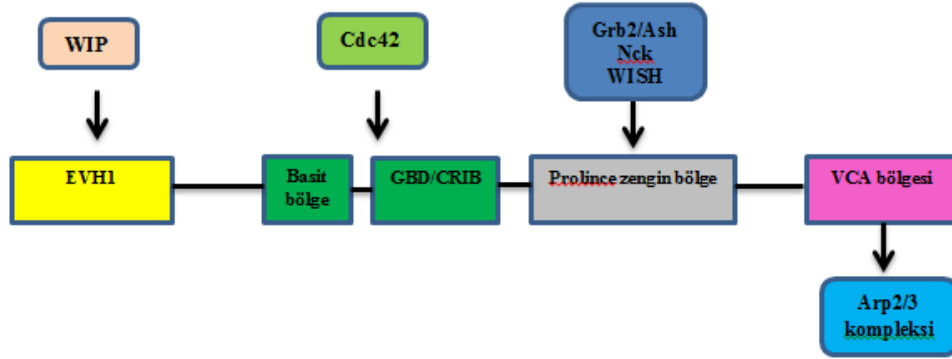
Lökositler veya beyaz kan hücreleri (WBC'ler), vücudu enfekte eden organizmalara ve yabancı maddelere karşı koruyan bağışıklık sisteminin hücreleridir. Dokular, kan ve lenfatik sistem dahil olmak üzere vücutta bulunan oldukça kompleks hücrelerdir. Bakteriyel ve viral enfeksiyon bölgesine lökositlerin alınması, vasküler endotelyuma ilk tutunmayı, yuvarlanmayı, zayıf ve sıkı yapışmayı, transendotelyal göçü ve kemotaksiyi içerir (Trepate ve ark., 2012). Lökositlerin kandan interstisyel dokular yoluyla göçü, başarılı bir immün yanıtın oluşması için gerekli olup hücre içi ve dışı faktörler, immün hücrelerin özel mikro ortamlar bağlamında uygun şekilde konumlandırılmasına katkıda bulunur. Lökositlerin bir diyapedez süreci boyunca parasellüler ve transsellüler göçü, aktin hücre iskeletine bağlı birçok molekülü ve bu moleküllerin dahil olduğu birçok mekanizmayı etkiler (Kopecki ve ark., 2016). Hücre iskeleti, enflamatuvar hücre göçü, etkilenen bölgelere adezyon, sitokin üretimi ve hücre sinyalleşmesinin düzenlenmesi dahil olmak üzere enflamasyonun tüm yönlerine içsel olarak dahil olur. Hücre iskeleti düzenleyici proteinler, zaman ve hücreye özel bir

şekilde hareket eden birden fazla role sahiptir ve hem hücrenin içinde hem de dışında inflamasyonu azaltabilir ve EBA (epidermoliz bullosa kazanita) gibi inflamasyon aracılı otoimmün hastalık gelişim sürecini etkileyebilir (Kopecki ve ark., 2016).

2.2.3. WASP/WAVE Ailesi Proteinleri

WASP-WAVE proteinleri WASP ailesi ve WAVE ailesi olmak üzere iki alt aileden oluşur. WASP ailesi WASP ve nWASP'dan, WAVE ailesi ise WAVE1 (Scar1), WAVE2, WAVE3 proteinlerinden oluşmaktadır. WASP/WAVE ailesi, diğer birçok faktörle birlikte, özellikle Arp2/3 kompleksi ile etkileşerek aktin dinamiklerini düzenler (Millard ve ark., 2004; Vartiainen ve ark., 2004; Deeks & Hussey, 2005). WASP/WAVE ailesi üyelerinin aktivasyonu, vezikül trafiği, mikrobiyal enfeksiyon ve hücre substratı yapışması gibi aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gereken birçok biyolojik işlemde yer almıştır (Bompart & Caron 2004). WASP ifadesi hematopoietik hücrelerle sınırlı olup, nöronal-WASP (N-WASP) ve WAVE üyeleri hemen hemen her dokuda ifade edilir ve herbiri farklı bir ekspresyon paterni gösterdiği farklı bir kromozomda bulunur (Kurusu & Takenawa, 2009; Jain & Thanablu, 2015). İnsan WASP ve WAVE proteinleri 498 ila 559 amino asit uzunluğundadır ve sırasıyla 9 ila 12 ekson tarafından kodlanır. Genlerin uzunluğu, 7,6 kb olan WASP dışında, N-WASP için 67.1 kb'den WAVE3 için 131.2 kb'ye kadar değişen uzunluklara sahip olmasına rağmen nispeten benzerdir (Kurusu & Takenawa, 2009). Tüm aile üyeleri, WASP aktivitesini ve hücre altı lokalizasyonu düzenlemek için sinyalleri entegre etmeye hizmet eden dizi homolojisi ve bağlanma etkileşimleri ile tanımlanan çok alanlı proteinlerdir. En yakın dizi benzerliği N-WASP ile paylaşılır ve bu proteinlerdeki ortak alanlar benzer bağlanma ortaklarına ve işlevlere sahiptir. Tüm WASP ailesi proteinleri, yeni aktin filamentlerinin oluşumunu başlatmak için Arp 2/3 kompleksini aktive edebilen karakteristik bir C-terminal VCA alanı (verprolin homolojisi, merkezi ve asidik alan) içerir (Bouma ve ark., 2009). WASP'nin hematopoietik hücrelerde kısıtlı ifadesi, transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarıdaki 137-bp'lik bir bölgeye bağlıdır (Kurusu & Takenawa, 2009). WASP ailesi üyeleri, Arp2/3 kompleksini başka yapılarda ve başka amaçlarla etkinleştirir. Örneğin, SCAR/WAVE kompleksi, aktin açısından zengin çıkıntılarının oluşumunu yönlendirir ve bu nedenle hücre göçü ve

polarizasyonunun yerleşik bir düzenleyicisidir (Amato ve ark., 2019). WASP protein yapısı şekil 2.11.'de verilmiştir.

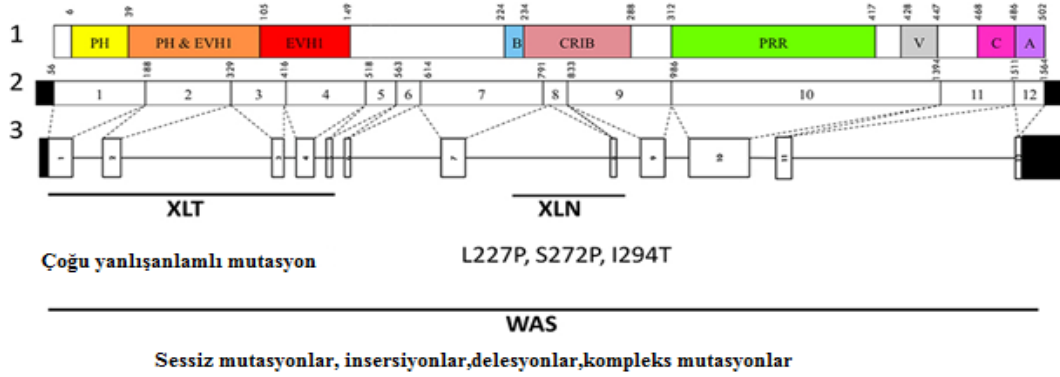


Şekil 2.11. WASP protein yapısı (Miki & Takenawa, 2003).

2.2.4. WASP Geni

İnsan Wiskott-Aldrich sendromu proteini (WASP) geni, WASP ve WAVE ailesi genlerinin ilkidir ve 1994 yılında X'e bağlı resesif bir hastalık olan Wiskott-Aldrich sendromu (WAS) ile ilişkili mutasyona uğramış bir gen olarak izole edilmiştir (Kurusu & Takenawa, 2009). WASP geni, X kromozomunun kısa kolunda Xp11,22-p11,23 bölgesinde lokalize olup, 502 aminoasitten ve 12 ekzondan oluşan, 54 kDa ağırlığında bir protein kodlamaktadır (Derry ve ark., 1994; Zu ve ark., 1997). WASP geninde şimdiye kadar yaklaşık 400 mutasyon tanımlanmış ve bu mutasyon tipleri meydana gelen hastalıkların şiddeti ve klinik fenotip ile ilişkilendirilmiştir (İmai ve ark., 2003; Yapıcı & Kılıç, 2008). Yapılan çalışmalarda, mutasyonların N-terminal bölgesindeki ilk üç ekzonda olduğu ve bu mutasyonların nispeten daha hafif fenotiplerle sonuçlandığı, C terminal bölgesinde meydana gelen mutasyonların ise daha ağır tablolarla sonuçlandığı görülmüştür (Yapıcı & Kılıç, 2008). Erken sonlanma mutasyonları ve delesyonlar WASP protein ekspresyonunu engelleyerek immün düzensizlik, mikrotrombositopeni, egzama ve lenfoid maligniteler ile karakterize, nadir görülen bir X'e bağlı resesif primer immün yetmezlik olan WAS'a yol açar. Yanlış anlamalı mutasyonlar genellikle azalmış protein ekspresyonuna sebep olur ve fenotipik olarak daha hafif bir form olan X'e bağlı trombositopeni (XLT) ile sonuçlanır. Aktive edici mutasyonlar ise değişken miyelodisplazili nötropeni ile tanımlanan X'e bağlı

nötropeniye (XLN) yol açar (Blundell ve ark., 2010). WASP geninin, cDNA transkriptinin ve WASP proteininin yapısı şekil 2.12’de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. WASP geninin, cDNA transkriptinin ve WASP proteininin yapısı (Sudhakar ve ark., 2021).

WASP proteinleri temel aktin-hücre iskeleti yeniden düzenleyici proteinleridir. WASP proteinleri, Arp2/3 kompleksini aktive ederek hücresel işlemler için kritik olan hücresel harekete sebep olan hızlı aktin polimerizasyonunun kontrolünde rol oynarlar (Deryy ve ark., 2004). Tüm hematopoietik kök hücre türevli soylarda (CD34⁺ hematopoietik öncül hücre, trombositler, NK hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler) ifade edilen WASP, ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunur (Yapıcı & Kılıç, 2008).

WASP, hücre yüzeyinden aktin hücre iskeletine sinyallerin iletilmesinde rol oynar ve WASP eksikliği, proliferasyon, fagositoz, immün sinaps oluşumu, nötrofil üretimi/salımı, yapışma ve yönlendirilmiş göç dahil olmak üzere normal hücresel aktivitenin birçok yönünü tehlikeye atan hücre iskeleti kusurlarına neden olur (İmai ve ark., 2003; Blundell ve ark., 2010).

2.2.4.1. WASP domainleri

WASP üzerinde, Ena-VASP homoloji domaini (EVH1)/WASP homology domain 1 (WH1), GTPaz bağlanma domaini (GBD), basit bölge (BR), prolince zengin bölge (PPP), V, C, A domain olmak üzere birbirinden farklı fonksiyonlara sahip 5 farklı domain yer almaktadır (Kurusu & Takenawa, 2009). Bu alanlar aracılığıyla WASP, birçok adaptör protein ile çoklu etkileşimler kurar ve aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi için çoklu hücresel sinyalleri uyarır (de la Fuente ve ark., 2007). WASP domainleri şekil 2.13’de gösterilmiştir.

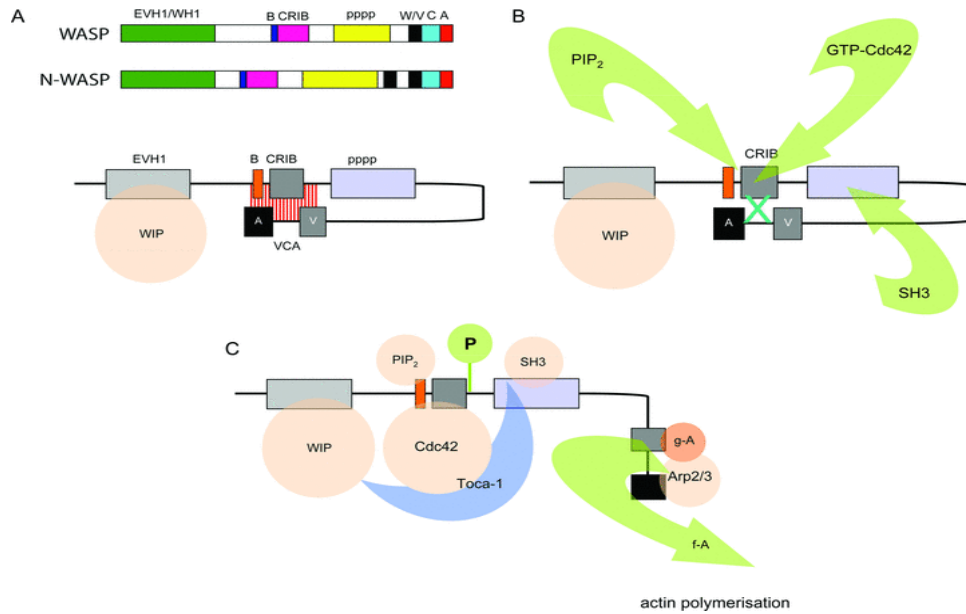
2.2.4.1.1. EVH1/WH1 domaini

EVH1 alanı, aktin yeniden şekillenmesinde rol oynayan prolin bakımından zengin bir bölgedir. Bu alan, Mena, VASP ve Evl gibi aktin hücre iskeleti proteinlerinde bulunur. En iyi karakterize edilmiş EVH1 alanı bağlanma ortakları, verprolin protein ailesinin üyeleridir (Blundell ve ark., 2010). En iyi bilinen adaptör proteinlerden biri F-aktinin polimerizasyonunu ve stabilitesini düzenleyen ve C-terminal ucu aracılığıyla WASP’ın WH1 alanına bağlanan, yaygın olarak eksprese edilen bir protein olan Wiskott-Aldrich sendromu protein etkileşimli proteindir (WIP). WIP, 503 amino asit uzunluğunda prolinden zengin bir proteindir ve en bol olarak hematopoietik hücrelerde olmasına rağmen birçok dokuda eksprese edilir (Konno ve ark., 2007). EVH1/WH1 peptit bağlanma alanı, WIP’nin bağlanma bölgesidir (de La Fuente ve ark., 2007). Hematopoietik hücrelerdeki WASP proteinlerinin çoğu WIP ile kompleks oluşturarak çalışır. WASP ailesinin WIP proteinleri tarafından aktif olmayan konformasyonda stabilize edilmesi ve işlevi için WIP’in gerekli olması birçok çalışmanın konusu olmuştur. WASP’ın WIP sayesinde kalpain ve proteasomal bozulmadan korunduğu düşünülmektedir (Kurusu & Takenawa, 2009). WASP üzerindeki WIP bağlanma bölgesi olan EVH1/WH1 peptid alanının mutasyonlar için bir sıcak nokta olduğuna, çoğu mutasyonun bu domainde gerçekleştiğine ve WASP-WIP etkileşiminin bozulmasının WASP protein eksikliğine neden olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Konno ve ark., 2007; Kurisu& Takenawa, 2009). EVH1/WH1 dominini bozan mutasyonlar, WIP bağlanmasını azaltarak in vivo WASP ve birçok WAS formunun proteolitik

bozunmasına yol açar. WIP bağlanması ayrıca N-WASP VCA'yı negatif olarak düzenler (Padrick & Rosen, 2010).

2.2.4.1.2. BR ve GBD domainleri

Dinlenme durumunda WASP/N-WASP sitoplazmada otomatik olarak inhibe edilmiş inaktif durumda bulunur. BR, GBD ve VCA alanı, arasındaki intramoleküler etkileşim ile korunur ve WIP ile stabilize edilir. WASP proteinleri, bir C-terminal VCA alanı aracılığıyla Arp2/3 kompleksini aktive eder (Massaad ve ark., 2013). Serbest WASP'da (dinlenme durumunda) bu aktivite, merkezi bir GBD ile moleküller arası etkileşimler yoluyla bloke edilir. Yapısal ve biyokimyasal çalışmalar, GBD'nin, VCA'nın C bölgesinde, Arp2/3 kompleksinin aktivasyonu için gerekli olan ve oto-inhibisyonla sonuçlanan bir amfipatik sarmal oluşturduğunu göstermiştir. WASP, Cdc42 ve SH2 (fosforile WASP için) alanları dahil olmak üzere bir dizi hücre içi ligand tarafından allosterik olarak aktive edilebilir. Bu ligandlar, WASP ve N-WASP'a, GBD'nin otomatik olarak inhibe edilen hali ile yapısal olarak uyumsuz bir şekilde bağlanır. Böylece, GBD'yi küresel olarak stabil olmayan hale getirir ve sonuç olarak VCA domainini serbest bırakarak aktive olurlar (Cheng ve ark., 2008).



Şekil 2.13. WASP ailesi domain ve efektör proteinleri (Calle ve ark., 2008)

2.2.4.1.3 VCA ve PPP domainleri

WASP ailesi proteinleri, bir C-terminal üçlü VCA alanının varlığı ile karakterize edilir (Cory ve ark., 2003). VCA alanı, Arp2/3 kompleksi tarafından aktin çekirdeklenmesini güçlü bir şekilde uyarır. Bu süreçte üç unsurun farklı işlevleri vardır. C-terminal A bölgesi, Arp2/3 kompleksine karşı önemli bağlanma afinitesine katkıda bulunur. A bölgesi ile aktivite arasında da bir bağlantı vardır; farklı WASP ailesi VCA'ları, A bölgesi dizisi ile ilişkili olan oldukça farklı aktivitelere sahiptir. C bölgesi ayrıca hem bağlanma afinitesine hem de aktivasyonun afiniteden bağımsız bir yönüne ve ayrıca oto-inhibitör düzenlemeye katkıda bulunur (Padrick & Rosen, 2010). Bu alan hem aktin monomerlerini (V bölgesi aracılığıyla) hem de Arp 2/3 kompleksini (CA bölgesi aracılığıyla) bağlar ve bir G-aktin, Arp2/3 kompleksi ve ATP etkileşimine eklendiğinde in vitro aktin polimerizasyonunu uyarır (Cory ve ark., 2003). Çalışmalar VCA alanına bağlı aktin monomerlerinin Arp2/3 kompleksinin aktivasyonunda önemli bir rol oynadığını ve F-aktin polimerizasyonunu başlattığını göstermiştir (Kelly ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada, kompleksin Arp2 alt biriminin, filament çekirdeklenmesi sırasında veya hemen sonrasında ATP'yi hidrolize ettiğini ve dendritik çekirdeklenme için gerekli faktörlerin ATP hidrolizi için de gerekli olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte aktin bağlayıcı WH2 dizisinin bir WASP-ailesi VCA alanından çıkarılmasının Arp2/3 aktivasyonunun verimini büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Kelly ve ark., 2006).

Poliprolin alanı (PPP) ise, WASP'ın işlevsel alanlarının en büyüğüdür. SH3 alanı içeren proteinler için çoklu bağlanma bölgesi olarak görev yapar. PPP alanının silinmesi, WASP ve N-WASP'ın aktin polimerizasyonunu indüklemeye yeteneğini ortadan kaldırır. Reseptör olmayan tirozin kinazlar, aktin bağlayıcı moleküller ve adaptör moleküller dahil olmak üzere birçok molekül SH3 alanları yoluyla WASP'ı bağlar. Kinaz ailelerinin Src (Sarkoma ilişkili tirozin kinaz) ve Tec ailesinin üyeleri, SH3 alanları aracılığıyla WASP'ın poliprolin alanına bağlanabilir. Bunlardan Btk (Bruton tirozin kinaz), Hck, Fyn ve Lyn'in tümü WASP'ı bağlayabilir ve fosforile edebilir (Blundell ve ark., 2010). WASP'ın fosforilasyonu, TCR (T hücre reseptörü) sinyali, filopodia ve podozom oluşumu, göç ve fagositoz dahil olmak üzere birçok hücre işlemi için önemlidir ve WASP aktivasyonunun kilit düzenleyici mekanizması gibi

görülmektedir (Blundell ve ark., 2010). Fosforilasyonun, WASP degradasyonunda rol oynadığı, böylece aktivitenin kontrolü için bir mekanizma sağlayabileceği düşünülmektedir (Trasher & Burns, 2010).

2.2.5. WASP Degradasyonu ve WIP'in Rolü

Yapılan çalışmalarda WASP'ın WIP ile etkileşiminin, WASP'ı bozulmadan koruduğunu düşündüren veriler elde edilmiştir. Hücrelerde, WASP proteinlerinin çoğu (WASP, N-WASP), bu proteinleri proteasomal bozulmaya karşı koruyan WIP ailesi proteinleri ile birebir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks WASP'ları protein degradasyonuna karşı korur. WASP-WIP bağlanmasının bozulması ve sonuçta ortaya çıkan WASP degradasyonu, WASP fonksiyon kaybına ve WAS'ta immün hücrelerinde kusurlu aktin hücre iskeletine neden olur (Kurusu & Takenawa, 2009). WIP, WASP'ın WH1 alanını sarar ve genişletilmiş bir yüzeyle etkileşime girer. Sitoplazmadaki WASP moleküllerinin çoğu WIP ile ilişkilidir, bu sayede WASP'ın mutlak hücresel seviyelerini düzenler. WIP-WASP etkileşimi, WASP'ı in vivo aktif aktin polimerizasyon alanlarına lokalize etmek için de önemlidir (Thrasher & Burn, 2010). Bununla birlikte nakavt farelerde WIP'in yokluğu, kalpain veya proteazom inhibitörleri ile tedavi edilmesi sonucunda kısmen tersine çevrilebilen hücresel WASP seviyelerinde belirgin bir azalmaya yol açar, bu da WIP'nin WASP'ı proteaz ve proteazom aracılı bozulmadan koruduğunu gösterir (Chou ve ark., 2006; de la Fuente ve ark., 2007). WASP ve WIP arasındaki bağlantıyı etkileyen farklı yanlış anlamalı mutasyonların hızlandırılmış WASP degradasyonu ve düşük WASP ekspresyonlarına neden olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, mutant proteinler, in vitroda benzer seviyelerde ifade edildiğinde, en azından vahşi tip WASP'a eşdeğer seviyelerde aktin polimerizasyonunu destekleme yeteneğini koruduğu için, bu yanlış anlamalı mutasyonlar, temel olarak WASP işlevini etkilemez. Ek olarak, yanlış anlamalı mutant proteinlerin daha düşük ekspresyon seviyelerine rağmen in vivo, makrofaj veya DC podozomları dahil olmak üzere WASP'a bağlı aktin yapıları, normalden daha düşük seviyelerde de olsa oluşur. Bu mutasyonların WASP aktivitesinin normal düzenlenmesini ve lokalizasyonunu bozup bozmadığı açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak bu, plazma zarına alımı kolaylaştıran ve WASP aktivitesini

azaltabilen WIP bağlanması azalması veya ortadan kalkması nedeniyle muhtemel görünmektedir (Thrasher & Burn, 2010).

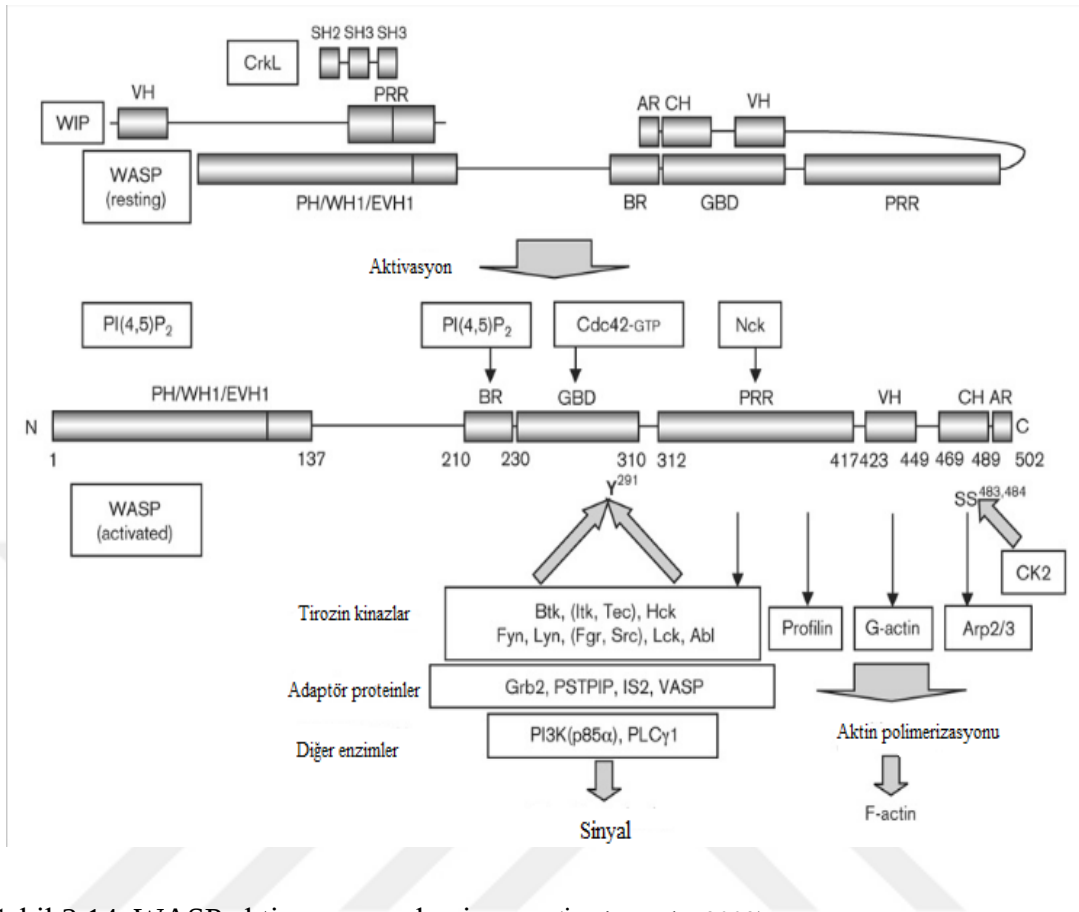
2.2.6. WASP Aktivasyon Mekanizması

Arp2/3, WASP/WAVE proteinlerinin C-terminalindeki CA bölgesine bağlandığında aktive olur ve V bölgesine bağlanan bir aktin monomer ile birlikte aktin polimerizasyonunu başlatır (Machesky & Insall, 1998; Yazar ve ark.,1999; Rohatgi ve ark., 2000; Takenawa ve Miki, 2001; Frugtniet vd. 2015). Bu etkileşim, WASP işlevi açısından en önemli olanıdır, ancak diğer birçok bağlayıcı bileşen, WASP ve WAVE aktivasyonunu düzenler. Dinlenme koşulları altında, N-WASP ve WASP, N-terminal bölgesindeki GBD alanı ile C-terminal bölge arasındaki etkileşimin VCA bölgesini maskeleyen otomatik engellenmiş, katlanmış bir konformasyonda bulunur (Miki ve ark., 1998; Kim ve ark., 2000; Frugtniet ve ark., 2015). Bu etkileşim, Arp2/3 kompleksinin CA bölgesine erişimini engeller ve böylece WASP ve N-WASP aktivasyonu inhibe edilir. Rho GTPase, Cdc42 ve fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP2) gibi ligandların WASP'lar ile yarışmalı bağlanması, VCA bölgesini maskeleyen C-terminal ve N-terminal arasındaki etkileşimi bozabilir. Cdc42, GBD'ye bağlanır ve PIP2, bazik bölge ile etkileşime girebilir. Bu etkileşimlerden herhangi biri, WASP'lerin oto-inhibe edilmiş konformasyonunu bozabilir ve diğer ligandın bağlanmasını artırabilir, böylece VCA bölgesinin açığa çıkmasına ve WASP ailesi proteinlerinin aktivasyonuna yol açabilir (Prehoda ve ark., 2000; Rohatgi ve ark., 2000; Frugtniet ve ark., 2015).

WASP/WAVE ailesinin üyeleri aktif olduğunda, VCA bölgesi ortaya çıkarak Arp 2/3 kompleksi ve bir aktin monomerinin buna bağlanmasına izin vererek yeni bir aktin filamentinin çekirdeklenmesine yol açar. WASP/WAVE ailesi üyelerinin aktivasyonu, vezikül trafiği, mikrobiyal enfeksiyon ve hücre substratı yapışması gibi aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gereken birçok biyolojik işlemde yer almaktadır (Takenawa & Miki 2001; Takenawa & Suetsugu 2007; Frugtniet ve ark., 2015).

WASP aktivasyonu için başka bir mekanizma fosforilasyon ile sağlanır. Fosforilasyonun TCR uyarımı, mast hücreleri üzerinde IgE reseptörü uyarımı ve trombositler üzerinde kollajen reseptör uyarımı dahil olmak üzere çeşitli uyarılarda meydana geldiği düşünülmektedir. Fosforilasyon için önemli bir rezidü, Btk ve Src familyası kinazları için bir hedef olarak tanımlanan tirozin Y291'dir. Tirozin 291 fosforilasyonunun Cdc42 aktivasyonu için eşiği düşürdüğü ve WASP'ın 'açık' moleküler yapısını stabilize ettiği düşünülmektedir. Tirozin 291'in fosforillenmiş halinin mutasyona uğratılması ile WASP'ın yapısal olarak aktif hale geldiği ve aktin polimerizasyonunun artmasıyla sonuçlandığı görülmüştür. Bu da WASP fosforilasyonunun, WASP işlevi üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunu gösterir (Bouma ve ark., 2009).

WASP ve N-WASP'ın serin ve tirozin rezidülerinin kinazlarla fosforilasyonu, aktivasyon ve lokalizasyonlarını etkiler. Örneğin, fokal adezyon kinaz, N-WASP'ın tirozin rezidüsü 256'yı fosforile eder, bu fosforilasyon ise nükleer lokalizasyonunu etkileyerek hücre göçünü destekler (Lane ve ark., 2014). Y256 fosforilasyonu aynı zamanda nükleustan N-WASP'ın çıkarılmasını da düzenler. N-WASP normalde hem nükleus hem sitozolde bulunurken Y256E mutanti sitozolde bulunur. Fosforilasyon açık WASP/N-WASP moleküllerinin aktivitesini güçlendirdiğinden Y256E mutantlarının sadece küçük, tespit edilemeyen bir fraksiyonunun dinlenme koşullarında plazma zarına ulaşması mümkündür, oysa çoğunluğu inaktif, sitozolik formda kalır (Suetsugu & Takenawa, 2003; Bompard & Caron, 2004). WASP aktivasyon diyagramı şekil 2. 14'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. WASP aktivasyon mekanizması (İmai ve ark., 2003)

2.2.7. WASP' da İmmün- İnflamatuvar Hücre Fonksiyonları

WASP, lenfoid ve miyeloid hücre göçü, reseptör sinyalizasyonu, sitotoksite ve fagositozda önemli fonksiyonel rollere sahip hematopoietik hücrelerde aktin hücre iskeletinin anahtar düzenleyicisi olarak görev alır (Rivers & Thrasher, 2017). Sadece hematopoietik hücrelerde eksprese edilen bir hücre iskeleti düzenleyici proteini olan WASP ekspresyonundan yoksun olan hastalarda bağışıklık fonksiyonunun hatalı olabileceği tespit edilmiştir (Bouma ve ark., 2009; Thrasher & Burn, 2010). Lenfoid soylarda, erken progenitörlerin gelişimi, hem insanlarda hem de WASP eksikliği taşıyan farelerde normal olarak ilerler, ancak WASP, terminal olarak farklılaşmış hücrelerin hayatta kalması ve homeostazı için gereklidir (Rivers & Thrasher, 2017). WASP eksikliği, bozulmuş T hücresi proliferasyonu, azalmış T hücresi reseptörü, bozulmuş makrofaj fagositozu, anormal inflamatuvar yanıtlar, otoimmünite ve maligniteye yatkınlık dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel kusurlarla sonuçlanır (Zhang ve ark.,

2006; Blundell ve ark., 2010). Ek olarak, WASP eksikliği, trombosit yıkımının ve kanama eğiliminin artmasıyla sonuçlanan spesifik bir trombosit defektine de neden olur (Blundell ve ark., 2010). Örneğin; WASP'ın, megakaryositlerden trombosit oluşumunda dolaşımdaki trombosit bütünlüğünün ve doku hasar bölgesine trombosit agregasyonunun sağlanmasında rol aldığı, megakaryositlerinin anormal hücre iskelet yapısına sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda çalışmalar dolaşımdaki hasar sonucu küçük trombositlerin meydana geldiğini de bildirmektedir (Yapıcı & Kılıç, 2008). Hem insan hem de murin modellerinde yapılan çalışmalarda WASP eksikliğinde lenfositler ve miyeloid hücreler dahil olmak üzere çoklu immün hücre soylarının göçünün kusurlu olduğu da gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2006).

Doğal bağışıklık hücre tipleri, WASP eksikliği bağlamında incelenmiştir ve şaşırtıcı olmayan bir şekilde çeşitli fonksiyonel kusurlar tanımlanmıştır. İnsan WASP eksikliği olan miyeloid soy hücreleri, aktin açısından zengin fagositik kap oluşumunda bozulmuş fagositoz sergiler (Thrasher & Burn., 2010). WASP eksikliği olan monositlerde, makrofajlarda, dendritik hücrelerde aktin polimerizasyonu değiştiği için hücre polarizasyonunda, göçünde, fagositozunda ve aktin dağılımında anormallikler saptanmıştır (Thrasher & Burn., 2010; Toscano ve ark., 2016; Rivers & Thrasher, 2017). Hem insanlar hem de fare modellerinde yapılan çalışmalarda WASP kaybı, trombositler, miyeloid hücreler ve lenfositler dahil olmak üzere tüm hematopoietik hücrelerin sayısını ve işlevini azaltır ve kanama bozukluklarının yanı sıra enfeksiyonlara ve kansere duyarlılığın artmasına neden olur. Kısmi bir hücre iskelet bütünlüğü kaybının bile geniş ve ciddi kusurlara neden olduğu gerçeği, hücre göçü, hücre yapışması, çoğalması ve patojenlerin yutulması gibi temel bağışıklık hücre fonksiyonları için aktinin önemini vurgulamaktadır (Tolar, 2017). Yakın zamanda, WASP'ın ayrıca miyeloid hücrelerin transkripsiyonel ve epigenetik düzenlenmesinde de bir rolü olduğu gösterilmiştir (Rivers & Thrasher, 2017).

WASP eksikliği olan monositler, makrofajlar, DC'ler ve osteoklastlardaki birincil kusur, hücre yapışma molekülleri için zenginleştirme noktaları olarak hizmet eden hücre ve alt tabaka arasındaki özel temas alanları olan podozomları oluşturmamalarıdır (Zhang ve ark., 2006; Thrasher & Burn, 2010). Podozomların işlevi tam olarak açık olmasada, podozom sayısındaki azalma, anormal hücre

hareketliliği ile ilişkilendirilmiştir (Oliver ve ark., 2005). Benzer şekilde, makrofajların ve DC'lerin göç eden kenarında filopodia ve lamellipodia oluşumu kusurludur ve spesifik kemoatraktanlara kemotaksi dahil göç, bu hücre tiplerinde bozulmuştur (Thrasher & Burn., 2010). Podozom eksikliği ile bağlantılı olarak, WASP eksikliği olan insan DC'leri $\beta 2$ integrinlerini kümelemede başarısız olur ve sonuç olarak bu hücreler, hücre içi yapışma molekülü 1'e (ICAM-1) yapışmayı azaltır. WASP^{-/-} farelerde, DC'lerin uygun yapışma temasları oluşturmaması, antijen biriktirme bölgelerinden bölgesel lenf düğümlerine göç yanıtlarının bozulmasına yol açar (Zhang ve ark., 2006). Aynı zamanda nötrofillerdeki WASP eksikliğinin $\beta 2$ integrinlerin kümelenmesinde derin kusurlara yol açarak, fizyolojik koşullar altında kusurlu yapışma ve transendotelyal göçe yol açtığı saptanmıştır (Zhang ve ark., 2006). WAS hastaları ve fare modellerinde, immün yetmezlik ve immün düzensizliğin altında yatan patofizyolojik mekanizmalara katkıda bulunan majör T hücre kusurları vardır. T hücrelerinin sayısı azalmıştır, morfolojide ve TCR'nin indüklediği aktin polimerizasyonunda büyük anormallikler gösterirler (Sun ve ark., 2019). WASP eksikliği olan T hücrelerinin daha az mikrovillus benzeri yüzey çıkıntılarına sahip oldukları, çoğalamadıkları ve sitokin üretmedikleri rapor edilmiştir (Oliver ve ark., 2005; Thrasher & Burns, 2010). Ayrıca, allojenik, antijenik ve mitojenik uyaranlara karşı anormal proliferatif tepkiler, WASP eksikliği olan T hücrelerinde de bulunmuştur. Bu T-hücre anormallikleri, WASP ile ilişkili hücresel süreç ile yakından ilişkilidir ve bu anormal işlevler, WAS hastalarında bulunan immün yetmezliğin ana nedeni olarak gösterilmektedir (Sun ve ark., 2019). WASP eksikliğinde düzenleyici T (Treg) hücrelerinin sayısı ve gelişiminin normal olduğu gösterilmiştir, ancak bu hücrelerin periferik homeostazı ve işlevi bozulur ve bu nedenle yatkınlığa katkıda bulunabilir. WASP eksikliği olan Treg hücreleri, aktive edilmiş T efektör hücrelerinin proliferasyonunu baskılama yeteneğinde bozulma sergiler. WASP eksikliği olan Treg hücreleri ayrıca daha az anti-inflamatuar sitokin IL-10 salgılar ve bu da patolojik inflamasyona daha fazla yatkınlık oluşturabilir. (Rivers & Thrasher, 2017). WASP eksikliği olan B hücreleri de T hücrelerinde olduğu gibi kusurlu göç, yapışma ve immünoglobulin üretimi gösterir (Sun ve ark., 2019). Öncü B lenfositleri üzerinde yapılan çalışmalarda, anormal iskelet yapısı, hücre sinyal mekanizmalarında ve hücrenin çoğalma yanıtlarında patolojiler saptanmıştır (Yapıcı & Kılıç, 2008). WASP

eksikliği olan B hücrelerinde bozulmuş B hücre reseptörü ve integrin sinyali aynı zamanda zayıf immünolojik sinapslarla sonuçlanır, bunun da B-hücre aktivasyonunu, kemotaksiyi ve hafıza B hücrelerinde sinyalleşmeyi bozabileceği düşünülmektedir (Rivers & Thrasher, 2017). Örneğin; Tolar'ın fare B hücrelerinde yaptığı çalışmada meydana gelen WASP kaybı, dinlenme halindeki B hücrelerinde ipliksi aktin miktarında bir azalmaya neden olur ve periferdeki B hücrelerinin gelişimini, yapışmasını ve göçünü bozar (Tolar, 2017).

2.2.8. WASP'ın Hastalıklarla İlişkisi

WASP/WAVE proteinlerinin, aktin polimerizasyonunun düzenlenmesi yoluyla hücre hareketliliğine doğal olarak dahil olduğunun kabul edilmesiyle bu ailenin kanser hücrelerinin hareketliliğine ve onların istilacı-metastatik potansiyellerine dahil olabileceği gerçeği ortaya çıkmıştır. O zamandan beri, WASP/WAVE ailesi proteinlerinin kanser gelişimindeki rolüne ilişkin çok sayıda araştırma yapılmıştır (Frugniot ve ark., 2015). Ancak şaşırtıcı olan, kanserin tipine ve patolojik evresine bağlı olarak kanser malignitelerini güçlendiricileri veya baskılayıcıları olarak hareket edebilmeleridir (Kurusu & Takenawa, 2010). Örneğin; WASP'ın lökosit bağımlı meme kanseri metastazını düzenlemede bir rolü olabileceği, epidermal büyüme faktörü salgılayan makrofajlar ile koloni uyarıcı faktör 1 salgılayan meme kanseri karsinom hücreleri arasındaki etkileşiminin istilayı desteklediğini rapor eden çalışmalar yapılmıştır (Wyckoff ve ark., 2004; Goswaewi ve ark., 2005; Ishiara ve ark., 2013). Bununla beraber bir diğer WASP aile üyesi olan N-WASP'ın artmış ekspresyon seviyeleri insan akciğer kanserinde, özofagus skuamöz hücreli karsinomda, hepatoselüler karsinomda, meme duktal karsinomda, pankreas duktal adenokarsinomda invaziv ilerleme ve/veya kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Juin ve ark., 2019).

WASP eksikliği olan farelerde inflamatuvar bir hastalık olan kolit meydana geldiği ve hastalık için lenfositler gerektiği saptanmıştır. T hücre transferinin, bağışıklığı yetersiz olan farelerde koliti indüklemek için yeterli olabileceği bildirilmiştir. WASP eksikliği olan bağışıklık hücreleri ve normal T hücreleri arasındaki kusurlu etkileşimlerin, tolerojenik dendritik hücre işlevlerini, interlökin-10 üretimini ve

düzenleyici T hücrelerin homeostazını değiştirerek mukozal düzenlemeyi bozabileceği ve hastalık meydana gelmesine sebep olabileceği saptanmıştır (Nguyen ve ark., 2012).

Bir endozomal WASP türü olan WASH'nin pankreas hücrelerine özgü susturulmasının, bozulmuş kan glikoz klirensine ve azaltılmış insülin salınımına yol açtığını saptanmıştır. WASH kompleksinin bileşenlerinde mutasyonları barındıran hastaların, tip 2 diyabet geliştirme riski altında olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar WASP ailesi proteinlerinin glikoz homeostazına katıldığını düşündürmektedir (Ding ve ark., 2019). Başka bir çalışmada N-WASP eksikliğinin insan dişeti fibroblastlarında inflamatuvar sitokin üretimini arttırdığını ve nükleer faktör kappa-B ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolları ile düzenlendiğini göstermiştir (Wang ve ark., 2020).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı polikliniğine periodontitis nedeniyle ileri diş destek doku kaybı oluşumuna bağlı diş çekimi için başvuran 8 Kadın, 12 Erkek hastadan oluşan 20 periodontitisli olgu dahil edilerek gerçekleştirildi. 18-65 yaş arası, sistemik olarak sağlıklı hastalardan diş çekim endikasyonu bulunan dişler çekildikten sonra, yumuşak doku düzeltmesi gereksinimi olan bölgelerden alınan 2 mm periodontitisli yapışık dişeti doku örnekleri hasta grubunu, aynı hastadan diş çekim bölgesinde oluşan yumuşak doku defektini kapatmak için lateralden kaydırılan flep operasyonu esnasında alınan 2 mm periodontitisi olmayan sağlıklı dişeti ise kontrol grubunu oluşturmaktadır. Çalışma için gerekli izin Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından **28/01/2021** tarihli toplantısında **21-KAEK-008** proje numarası ile alındı. Çalışmaya dahil edilen gönüllülerden yazılı ve sözlü onam alındı.

Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca 2021/56 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1.2. Dokuların Toplanması ve Saklanması

Tüm katılımcılara ayrıntılı bir oral ve radyografik muayene yapıldı ve deneyimli bir klinisyen (E.Ş.) tarafından teşhis konuldu. Tüm dişeti dokuları periodontal hastalık nedeniyle diş çekimi için başvuran katılımcılardan (n=20) alındı. Operasyon sırasında alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde istenilen parçalara ayrılarak sonrasında çalışılmak üzere -80 °C’de muhafaza edildi. Dokular ikiye ayrıldı. Birinci grup dokulardan cDNA elde edilerek WASP genine ait ifade düzeyleri Gerçek-Zamanlı PZR ile tespit edildi. İkinci grup doku örnekleri ise protein izolasyonu yapılarak Western Blot analizinde kullanıldı.

3.1.3. Klinik Periodontal ve Dental Değerlendirme

Klinik ve radyografik muayeneleri yapılan ve çalışma kriterlerine uygun hastaların mevcut dişlerinin her iki yüzeyinden mezial, orta ve distalden ölçümler yapılarak ortalama bir değer kaydedildi. Sondalama cep derinliği (PPD) bir periodontal prob (Williams tipi periodontal prob, Hu-Friedy Co., Chicago, IL, ABD) ile dişeti kenarından cebin dibine kadar ölçülmüştür. Periodontal Klinik Parametreler (PPD gingival indeks (GI) ve plak indeks (PI)) kaydedildi.

3.1.3.1. Plak indeksi

Plak skorları, Lö ve Silness 1964 kullanılarak belirlendi. Plak skor kriterleri aşağıdaki gibidir:

- 0- Plak yok,
- 1- Dişeti kenarlarında film şeklinde plak var,
- 2-Dişeti cebinde ve dişeti kenarında gözle görülen derecede plak var,
- 3-Dişeti cebinde ve dişeti kenarında fazla miktarda plak var (Silness & Löe 1964)

3.1.3.2. Gingival indeksi

Gingival indeksi belirlemek için Lö ve Silness 1963 indeksi kullanıldı. Gingival skor indeks kriterleri aşağıdaki gibidir:

- 0-Sağlıklı dişeti, inflamasyon yok,
- 1-Dişetinde hafif inflamasyon, renk değişikliği ve hafif ödem var, sondalamada kanama yok,
- 2-Dişetinde orta derecede inflamasyon, kızarıklık ve ödem var, sondalamada kanama var,
- 3-Dişetinde ileri derecede inflamasyon, kızarıklık ve ödem var, sondalamada kanama var (Lö & Silness, 1963)

3.1.3.3. Sondalamada Cep Derinliği

Dişin bukkal, lingual, medial ve distalinden periodontal prob ile ölçüm yapıldı, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Gerçek zamanlı PZR (Applied Biosystems, İngiltere)
- PZR (Termal Döngü Cihazı, Techne, İngiltere)
- PZR (Termal Döngü Cihazı, Biometra)
- İbnot Gel Transfer Sistemi (İnvitrogen, IB301001, Avusturalya)
- Vorteks (Velp, Scientifica, F20220176, İtalya)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Qubit1.0 Fluormeter (İnvitrogen, Life Technology, Avusturalya)
- Plate (Applied Biosystems, 4346907, İngiltere)
- Plate Yapıştırıcı (Applied Biosystems, 201405092, İngiltere)
- Otomatik Pipetler (Gilson, Fransa)
- Otoklav (HMC, HV25, Almanya)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, MD554, Türkiye)
- Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica, F20520162, İtalya)
- Güç Kaynağı (Biorad, 1645070, ABD)
- Etüv (Mettler, Almanya)
- Distile Su Cihazı (Elgaoption Q7, İngiltere)
- Dikey Elektroforez Seti (XCell SureLock, Invitrogen, Avusturalya)
- Yatay Elektroforez Seti (SUB-GEL Midi, ABD)
- Isıtıcı Çalkalayıcı (Thermoshaker, İngiltere)
- Buzdolabı (Arçelik, 570465, Türkiye)
- -20°C Derin Dondurucu (Arçelik, 2052dy, Türkiye)
- -80°C Derin Dondurucu (Nuaire, Nu9483e, ABD)

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Kit İçerikleri

Gen ekspresyonunun belirlenmesi için kullanılan kimyasal maddeler ve kitler;

- ✓ 2-Merkaptoetanol (Biotech, Lot: N6563970, Kanada)
- ✓ TE (Multicell, Lot: 8092155025)
- ✓ Etanol (Sigma-Aldrich Katalog No: E7023, ABD),

- ✓ RNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit, , K0731, ABD)
 - Proteinase K 600 µL
 - Lysis Buffer 40 mL
 - Wash Buffer 1 (konsantre) 40 mL
 - Wash Buffer 2 (konsantre) 23 mL
 - Water, nuclease-free 30 mL
 - GeneJET RNA Purification Columns pre-assembled with Collection Tubes 50
 - Collection Tubes (2 mL) 50
 - Collection Tubes (1,5 mL) 50
- ✓ cDNA sentezi için Applied biosystems marka High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, (4368814, (Lot: 0152470) , ABD)
 - 10X Reaction Buffer (RT Buffer)
 - 25X dNTP Mix (100 mM)
 - 10X Random primer
 - Revers Transkriptaz (50 U/µl)
 - RNaz İnhibitor (100 µl)
 - RNaz free Water
- ✓ qubit ssDNA assay kiti Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (İnvitrogen Katalog No: Q33230, ABD),
 - Qubit™ dsDNA HS Working solüsyon (50ml)
 - Qubit™ dsDNA HS Standard 1 (1ml)
 - Qubit™ dsDNA HS Standard 2 (1ml)
- ✓ Gerçek zamanlı PZR' da kullanılan mastermix RealQ Plus 2x Master Mix Green High ROX™, (Ampliqon, Cat. No: A325402, Danimarka)

Proteinlerin belirlenmesi için kullanılan kimyasal maddeler ve kitler;

- ✓ Protein İzolasyonu için
 - T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Lot:WG324365, ABD)
 - Halt™ Proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific, Lot: WH334691, ABD),
 - EDTA (Thermoscientific, Lot: WH336181, ABD)
- ✓ Protein miktar ölçümü için Qubit protein assay kiti (İnvitrogen Katalog No: Q33211, Lot: 2309216, ABD),
 - Qubit™ protein Buffer (60ml)
 - Protein Reagent (300 µl)
 - Protein Standart 1 (1ml)
 - Protein Standart 2 (1ml)
 - Protein Standart 3 (1ml)
- ✓ Bolt™ 4-12% Bis-tris plus gradient jel (İnvitrogen, Katalog No: NW04120BOX, Lot:21101270, ABD),
- ✓ Markerler
 - MagicMark™XP Western standar (İnvitrogen, Lot: 23881634, ABD)
 - PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermoscientific, Lot: 01188746, Lithuania)
- ✓ Bolt™ MES SDS Running solüsyonu (novex, life techonologies, Lot: 2365104, ABD),
- ✓ LDS Sample Solüsyonu (4X) (novex, life techonologies, Lot: 2417035, ABD)
- ✓ Sample Reducing Agent (10X) (İnvitrogen, Lot:2398613, ABD)
- ✓ iBlot Regular Stacks (İnvitrogen, Lot: NR141021-01, ABD)
- ✓ Bloklama solüsyonu
- ✓ Ponceu (Sigma-Aldrich, Katalog No: P7170-1L, ABD),
- ✓ Nitroselüloz membran (İnvitrogen, ABD),

✓ Western blot breeze kit (İnvitrogen, Kromojenik Immunodeteksiyon Sistem, Katolog No:WB7106, ABD),

- Bloker/Solüsyon A
- Bloker/Solüsyon B
- Yıkama Solüsyonu
- Kemilüminisans Substrat
- Kemilüminisans Substrat Hızlandırıcı
- Sekonder Antikor Solüsyonu

✓ Primer antikorlar

3.1.6. Çalışmada Kullanılan Tampon (Buffer) ve Çözeltiler

3.1.6.1. RNA eldesinde kullanılan tampon ve çözeltiler

LYS Solüsyonu: 300µL Lys

33 µL B-merkaptoetanol (Lys'nin %1'i olacak şekilde)

Proteinaz K solüsyonu: 10µL proteinaz K

590µL TE

Yıkama Tamponu 1: 40ml Wash Buffer

10ml Etanol (%96)

Yıkama Tamponu 2: 23ml Wash Buffer

39ml Etanol (%96)

3.1.6.2. Protein eldesinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Running Buffer hazırlanması: 475 ml Nükleaz free dH₂O

25 ml SDS/MES Running Buffer 1X

Bloklama solüsyonunun hazırlanması nitroselüloz membran için; 14 ml dH₂O

4 ml Diluent A

2 ml diluent B,

(toplam hacim 20 ml)

Yıkama solüsyonu hazırlanması: 150 ml distile su
10 ml wash buffer

Substrat hazırlama (1 membran için): 2,375 ml kemi substrat
0,125 ml kemi substrat enhancer

3.2. YÖNTEM

Opsasyon sırasında alınan doku örnekleri iki parçaya ayrılarak -80 °C’de saklandı. Dokular gen ifade ve protein eksresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanıldı. Ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde Gerçek zamanlı PZR ve Western Blot kullanıldı.

3.2.1. Dokulardan RNA izolasyonu

RNA izolasyonu ThermoScientific GeneJET RNA Purification Kit (Thermo, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapıldı. İzolasyon işlemi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- -80°C’de saklanan dokular RNAaz’lardan arındırılmış bir çalışma ortamında beta-merkaptoetanol eklenmiş, 300µL Lizis tampon ilave edilerek bir homojenizatör (Heidolpd silentcrusher) yardımıyla parçalara ayrıldı, her bir örnekten yaklaşık 20-25 mg kullanıldı. Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.
- Parçalanmış dokular 1,5 ml’lik ependorf tüplere aktarıldı.
- Herbir örnek üzerine 600 µL seyreltilmiş Proteinaz K eklendi ve örnekler 15-30 sn vortekslendi.
- Vortekslenen örnekler, 15-25 °C sıcaklıkta 10 dk inkübe edildi.
- 5 dk 12000xg’ de santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonucu oluşan supernatantlar yeni RNAaz içermeyen tüplere aktarıldı.

- Herbir örneğe 450 µL etanol eklendi, pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Toplama tüplerine 700 µL'ye kadar lizatlardan aktarıldı.
- 12000xg de 1dk santrifüj yapıldı.
- Tüp atıldı, filtre alındı ve yeni bir tüpe takıldı.
- Tüm lizat kolona aktarılıp santrifüj yapılana kadar bu adım tekrarlandı.
- Filtreli tüp yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi.
- 700 µL Wash Buffer 1 eklendi ve 1dk 12000xg'de santrifüj yapıldı
- Filtre alındı, tüp atıldı ve filtre yeni bir toplama tüpüne takıldı.
- 600 µL Wash Buffer 2 eklendi ve 12000xg'de 1dk santrifüj yapıldı.
- Filtre alındı, yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 250 µL Wash Buffer 2 eklendi ve 12000xg'de 2 dk santrifüj yapıldı (Bu adım isteğe bağlı olarak gerçekleştirildi).
- Kolana takılı filtreli tüp max hızda 1dk santrifüj edildi.
- Filtre 1,5 ml'lik ependorf tüplere takılarak üzerilerine 100 µL RNAaz Free water eklendi
- 12000xg'de 1dk santrifüj yapılarak filtredeki RNA'nın tüplere aktarımı sağlandı ve RNA izolasyonu tamamlandı.

3.2.2. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) metodu kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. RT-PZR işleminde Applied biosystems marka High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, (4368814, Lot: 0152470, ABD) kullanıldı. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve PZR prosedürü sırasıyla Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
10x RT Buffer	2 µL
25x dNTP	0.8 µL
10x RT RT Random Primers	2 µL
Revers Traskriptaz Enzimi	1 µL
Nükleaz Free Su	4,2 µL
RNA Örneği	10 µL
Total Hacim	20 µL

Tablo 3.2. cDNA sentezinde kullanılan PZR prosedürü

25 °C	10dk
37 °C	120 dk
85 °C	5 dk
4 °C	∞

3.2.3. cDNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması

cDNA konsantrasyon ölçümü için Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen Katalog No: Q33230, ABD) kullanıldı.

- ✓ 0.5 lik PZR tüplerine Standard 1 ve Standard 2 den 10 µL alınarak çalışma solüsyonu ile son hacimleri 200 µL'ye tamamlandı.
- ✓ Her cDNA örneğinden 5 µL alınarak, son hacim 200 µL olacak şekilde çalışma solüsyonu eklendi.
- ✓ Her numune 5sn vortekslendi
- ✓ Tüm örnekler oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilerek ölçüm için hazırlandı.

- ✓ Qubit 1.0 cihazına önce Standard 1, daha sonra Standard 2 okutuldu ve cDNA örneklerinin ölçümüne geçildi.
- ✓ Herbir cDNA'nın konsantrasyonu kaydedildi
- ✓ Hasta ve kontrol dokularına ait cDNA'ların konsantrasyonu, Qubit® 1.0 Fluorometer cihazında (Life Technologies, ABD) belirlendi. Her bir reaksiyon 60 ng olacak şekilde ayarlandı ve cDNA örnekleri uygun koşullarda çalışma yapılana kadar saklandı.

3.2.4. WASP Geninin İfade Analizi

Periodontitis ve sağlıklı kontrol dokularında WASP gen ifade analizi Applied Biosystem Step One Plus (Applied Biosystems, İngiltere) cihazında SYBR Green temelli Gerçek zamanlı-PZR metodu kullanılarak gerçekleştirildi

3.2.4.1. Gerçek zamanlı PZR

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, gerçek zamanlı olarak gen ekspresyonunun tespiti ve miktarının belirlenmesi için rutin olarak kullanılan bir yöntemdir (Hawkins & Guest, 2017). Gerçek zamanlı PZR oldukça hassastır, nadir transkriptlerin ve gen ekspresyonundaki küçük değişikliklerin miktarının belirlenmesini sağlar. Bunun yanı sıra, uygulaması kolaydır, gerekli doğruluğu sağlar, hem güvenilir hem de hızlı kantifikasyon sonuçları üretir (Pfaffl, 2001). Ürün miktarı, reaksiyona giren floresan boyaların veya problemlerin meydana getirdiği sinyalin reaksiyonun seyri boyunca izlenmesi ile anlaşılır (Kubista ve ark., 2006). Gerçek zamanlı PZR'da yeni sentezlenmiş PZR ürünleri için en basit saptama tekniği, özellikle çift sarmallı DNA'ya bağlanan SYBR Green I floresan boyasının kullanılmasıdır. Boya, DNA çift sarmalına bağlandığı için, spesifik ve spesifik olmayan PZR ürünleri veya primer dimerleri arasında ayırım yapamaz. Bu sebeple spesifik problemler kullanılması veya spesifik primer dizaynı yapılması önerilir (Thornton & Basu, 2011).

Tercih edilen kantifikasyon yöntemi, hedef diziye, dokuda bulunan, beklenen mRNA miktarı aralığına, gereken doğruluk derecesine ve kantifikasyonun nispi mi

yoksa mutlak mı olması gerektiğine bağlıdır (Pfaffl, 2001). Teknik, kontaminasyon olasılığının düşük olması, hassasiyetin yüksek olması sebebiyle tercih sebebi olmaktadır (Yao ve ark., 2006). Tablo 3.3.'de Gerçek Zamanlı PZR için kullanılan primer ve sekansları verilmiştir.

Çalışmanın doğruluğu ve güvenilirliği için, housekeeping gen olarak; beta aktin (ACTB) geni, negatif kontrol olarak içerisinde cDNA kalıbı içermeyen PZR karışımı kullanıldı. Toplam hacim 25 µl olacak şekilde nükleaz free su ile ayarlandı. Çalışmada kullanılan PZR bileşenleri Tablo 3.4.'de verildi.

Tablo 3.3. Gerçek zamanlı PZR işleminde kullanılan primerler ve sekansları

WASP -F	5'-GATGCTTGGACGAAAATGCTTG-3'
WASP-R	5'CCCCACAATGCTCCTTGGT-3'
ACTB-F	5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCC-3'
ACTB-R	5'-CACGCAGCTCATTGTAGAAGG-3'

Tablo 3.4. Gerçek zamanlı PZR'da kullanılan tepkime bileşen ve miktarları

Bileşenler	Miktar
2x Master Mix Green High ROX™	12,5 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
cDNA örneği	3 µl
dH2O	8,5 µl
Total Hacim	25 µl

Gerçek zamanlı PZR karışımları hazırlandıktan sonra 96 örneklik plakalara eşit hacimlerde dağıtıldı ve üzerlerine cDNA örnekleri eklendi. Tablo 3.5'de belirtilen PZR programı kullanıldı.

Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR protokolü

Başlangıç	50 °C	2 dk	1
Denatürasyon	95 °C	10 dk	
Yapışma	95 °C	20 sn	40
Uzama	55 °C	1 dk	

3.2.4.2 WASP geni gerçek zamanlı PZR sonuçları analizi

WASP geninin ifade düzeyi, Threshold ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metodu kullanılarak hesaplandı ve periodontitis dokusunda sağlıklı kontrol dokusuna göre genlerin ekspresyonunun kaç kat değiştiği hesaplandı (Livak & Schmittgen, 2001). Hesaplama işlemi aşağıdaki formüle göre yapıldı. İlgili gene ait her bir periodontitis doku örneğinin sağlıklı dişeti dokusuna göre kat değişikliği bulunup ortalama değerleri alındı.

2- $\Delta\Delta Ct$ metodu;

ΔCt (Periodontitis Dokusu): WASP (CTort)-ACTB (CTort)

ΔCt (Sağlıklı dişeti Dokusu): WASP (CTort)-ACTB (CTort)

$\Delta\Delta Ct$: ΔCt (Periodontitis Dokusu) - ΔCt (Sağlıklı diş eti Dokusu)

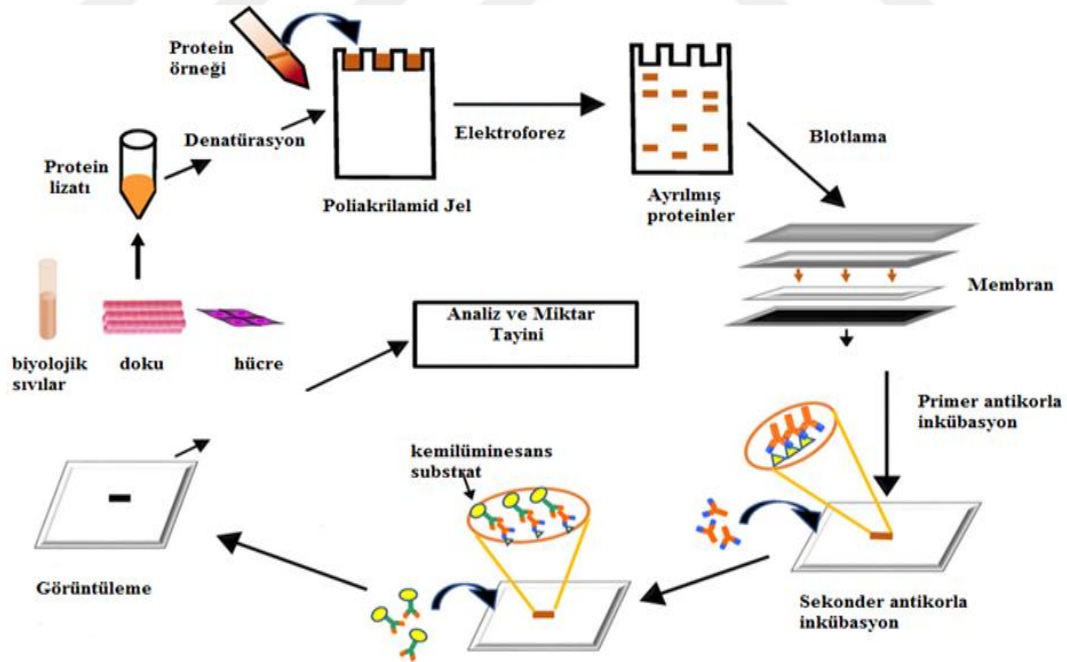
$2^{-\Delta\Delta Ct}$: Değeri ise bunun logaritmik olarak kat değişikliğini göstermektedir (Livak & Schmittgen, 2001).

3.2.5.WASP Geni Protein Analizi

Western blot, spesifik bir proteinin, genetik hastalıklardan sorumlu proteinlerin, proteinler üzerindeki translasyon sonrası modifikasyonların, protein izoformlarının saptanması için moleküler biyoloji ve proteomikte yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir (Mishra ve ark., 2017; Aslım & Bulut, 2021). Hedef protein hakkında yarı nicel veya nicel veriler sağlayabilir. Çok adımlı bir prosedürdür. Genel olarak bir Western blot analizi aşağıdaki adımları içerir:

- Hücrelerden veya doku lizatlarından numune hazırlama (protein ekstraksiyonu ve protein konsantrasyonu ölçümü),
- Elektroforez ile sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jeli üzerinde proteinlerin boyutuna göre ayrılması,
- Ayrılmış proteinlerin bir nitroselüloz veya poliviniliden florür membrana aktarılması,
- Spesifik olmayan proteinlerin membran üzerinde bloke edilmesi,
- Hedef proteinlerin spesifik primer antikorlarla problanması,
- Etiketli kemilüminesans veya floresan molekül ile konjuge sekonder antikor ile inkübasyon,
- Sinyal tespiti antijen/antikor bağlanmasını yansıtan bir yazılım kullanılarak ilgili protein bantlarının dansitometri analizi.

Sürecin herhangi bir adımındaki varyasyonlar sonucu etkileyebilir. Bu nedenle, tekrarlanabilirlik ve yüksek hassasiyet için western blot işleminin her adımını standartlaştırmaya özen gösterilmelidir (Mishra ve ark., 2017).



Şekil 3.1. Western blot metodunun çalışma prensibi (Mishra ve ark., 2017)

3.2.5.1. Protein izolasyonu

Protein izolasyonu T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo, Katalog No:78510, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- ✓ Dokular tartıldı ve mekanik parçalama yapıldı.
- ✓ Parçalanan dokular 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
- ✓ Her bir 1g doku için 20 ml T-PER (Thermo, ABD, Katalog No: 78510), 200µl EDTA ve 200µl Proteaz inhibitör kokteyl eklendi (Bizim dokularımız yaklaşık olarak aynı oranda olduğu için her örnek için 1000µl T-PER, 10µl EDTA, 10µl Proteaz inhibitör kokteyl eklendi).
- ✓ 2-3 sn vorteks yapıldı.
- ✓ 15 dk oda ısısında bekletildi.
- ✓ Soğutmalı santrifüjde 14000xg, 4°C santrifüj yapıldı.
- ✓ Oluşan süpernatant atıldı, izolasyon tamamlandı.
- ✓ Çalışma buz üzerinde gerçekleştirildi.
- ✓ İzole edilen dokular -80°C' de muhafaza edildi.

3.2.5.2. Protein konsantrasyonunun hesaplanması

Protein konsantrasyon ölçümü, Qubit 1.0 Fluorometer cihazında (Life Technologies, ABD) Qubit Protein Assay Kits (İnvitrogen Katalog No:Q33212, Lot:2309216, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçüm yapılırken aşağıdaki adımlar izlendi:

- ✓ Her bir örnek ve standartlar için 199 µl Buffer ve 1 µl Reagent eklenerek çalışma solüsyonu hazırlandı.
- ✓ Bu ölçüm için 3 standart kullanıldı. 0.5 lik PZR tüplerine Standard1,Standard2, Standart3'den 10µL, örneklerden ise 2 µL alınarak çalışma solüsyonu ile son hacimleri 200 µL'ye tamamlandı.
- ✓ Her numune 5sn vortekslendi
- ✓ Tüm örnekler karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilerek ölçüm için hazırlandı.

- ✓ Qubit 1.0 cihazına Standard1, Standard2 ve Standart3 okutularak kalibrasyon tamamlandı ve protein örneklerinin ölçümüne geçildi.
- ✓ Her bir proteinin konsantrasyonu kaydedildi.

3.2.5.3. Protein örneklerinin hazırlanması ve protein lineerizasyonu

Protein konsantrasyonları hesaplandıktan sonra elde edilen protein miktarlarına göre jele yüklenecek protein miktarı belirlendi. Kullanılan jelin her bir kuyucuğu 60 µl hacime sahip olduğu için hesaplamalar kuyucuk hacmi gözetilerek belirlendi.

Kullanılan solüsyonların hazırlanması;

-LDS sample Buffer (4X) (life technology, NOVEX) : $60/4 = 15$ µl (4X olan solüsyonun yoğunluğu 1X yapıldı)

-Reducing Agent (10X) (invitrogen, NU-PAGE): $60/10 = 6$ µl (10X olan yoğunluk 1X yapıldı)

Total kuyu hacmimiz 60 µl olduğu için LDS Buffer 15µl + Reducing 6µl = 21 µl, protein için kalan hacim 39 µl olarak belirlendi.

Protein miktarı eşitleme;

Bu çalışmada sağlıklı gingiva dokularına ait protein miktarları ortalama 1,61 µg/µl

Periodontitis dokularına ait protein miktarları ise ortalama 1,48 µg/µl olarak hesaplandı.

İki miktarın eşit olabilmesi için hasta protein örneklerinden $1,48X 39 = 57,72$

Kontrollerin bu miktara eşit olabilmesi için $1,61X36 = 57,96$ olarak hesaplandı.

Bu karışım hazırlandıktan sonra (protein örnekleri+ LDS Sample Buffer+ Reducing Agent) proteinlerin lineer olması için hazırlanan örnekler 70 °C'de 10 dk inkübe edildi.

3.2.5.4. SDS jel elektroforezi

Elektroforez işlemi için öncelikle yürütme tamponu hazırlandı. Yürütme tamponu için 475 ml Nükleaz free su ve üzerine 25 ml SDS/MES Running Buffer 1X (Novex, B0002) eklendi. Dikey elektroforez tankına jel yerleştirildi (İnvitrogen, Bolt™

4-12% Bis-Tris Jel). Elektroforez tankına hazırlanan yürütme tamponu eklendi. Jel üzerindeki ilk kuyucuğa 10µl markerler yüklendi. Çalışmada, gözle görülebilen (Thermo, Page Ruller Prestained Protein Ladder) ve kemilüminisans ışıma yapan (İnvitrogen, MAgic Mark) olmak üzere iki farklı marker kullanıldı. Kalan kuyucuklara 60 µl hacimde hazırlanan protein örnekleri (WASP ve ACTB için ayrı ayrı hasta ve kontrol protein örnekleri) yüklendi ve 200V da 23 dk yürütme işlemi yapıldı.

3.2.5.5. Transfer aşaması (Blotlama)

Transfer aşaması için iBlot transblotter kuru Blotlama Sistemi kullanıldı. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarıldı, hafifçe kurulandı. Jel kasetten çıkarıldı ve stacklar nitroselüloz membran yerleştirmek için hazırlandı. Transfer stacklar arasına yerleştirilen membran üzerine jel yerleştirildi ve filtre kağıdı eklenerek jelin üzeri kapatıldı. Hazırlanan stack cihaza (IBlot life Technology) yerleştirildi ve 20 V'da 7 dk çalıştırılarak jelin mebrana aktarımı sağlandı. Jelden membrana geçişte jel üzerinde marker kalmışsa bu transferin başarısız olduğunu gösterdiği için jel kontrol edildi.

3.2.5.6. Bloklama

Transfer aşamasından sonra cihaz açıldı ve örneklerin membrana geçip geçmediği kontrol edildi. Bloklama için invitrogen western breeze kemilüminisans kit kullanıldı (İnvitrogen, LOT: 2365112). 14 ml dH₂O, 4 ml diluent A, 2 ml diluent B eklenerek total hacim 20 ml olacak şekilde bloklama solüsyonu hazırlandı. Membranın üzerine hazırladığımız bloklama solüsyonundan 10 ml eklenerek shaker cihazında, 30 dk (oda sıcaklığında) inkübe edildi. Bu işlem tamamlanınca membranlar 20 ml distile su eklenerek 2'şer defa 5 dk shaker cihazında yıkandı. Bu aşamaların tümü WASP ve ACTB için tekrarlandı.

Bu sırada primer antikor solüsyonları üretici firmanın antikor için verdiği protokole uygun olarak hazırlandı. WASP antikoru (FineTest, China) 1/1000 oranında (10 µl antikor +10 ml bloking solüsyonu), ACTB antikoru (Affinity Biosciences,) 1/3000 oranında olacak şekilde hazırlandı.

Yıkaması tamamlanan membranların üzerindeki dH₂O atıldı ve hazırlanan primer antikorlar (WASP, ACTB) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Primer antikorlar membranlardan uzaklaştırıldı ve yıkama aşamasına geçildi. Yıkama aşaması için yıkama solüsyonu hazırlandı (150 ml distile su +10 ml wash buffer).Yıkama aşamasında, membranlar üzerine hazırlanan yıkama solüsyonundan 20 ml eklenerek 3X5 dk shakerda yıkama yapıldı.

Son yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 10 ml sekonder antikor solüsyonu membranlara eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve 20 ml yıkama tamponu eklenerek 3X2 dk yıkama yapıldı. Daha sonra 20 ml distile su ile 2X2 dk yıkama yapıldı.

Yıkama aşaması bittikten sonra kemilüminisansla muamele işlemine geçildi ve öncelikle her bir membran için substrat hazırlandı. Bunun için 2,375 ml kemilüminisans substrat (İnvitrogen, ABD) ve 0,125 ml kemilüminisans substrat enhancer (İnvitrogen, ABD) eklenerek total hacmi 2,5 ml olan solüsyon hazırlandı. Membranlar üzerindeki distile su uzaklaştırıldı ve hazırlanan substrat (2,5 ml) pipet yardımı ile membran üzerinde gezdirilerek uygulandıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Substrat uzaklaştırılmadan membranlar pens yardımı ile uç kısmından tutularak cihaza (Thermo, iBright 1500) konuldu ve görüntü alındı. ImageJ analiz programı yardımı ile bant kalınlıklarındaki kat artışı oranları hesaplandı.

3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışma gruplarının genel özellikleri hakkında bilgi vermek amacı ile tanımlayıcı istatistikler yapılmıştır. Sürekli değişkenlere ait veriler Ortalama±Standart Sapma; kategorik değişkenlere ait veriler ise n(%) şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS yazılım versiyonu 20.0 (SPSS, Inc., IL, Chicago) ile gerçekleştirilmiştir. Normal dişeti ve periodontitis dokularından elde edilen mRNA ve protein ekspresyonlarının analizi Paired Sample Test ile yapıldı. Kantitatif değişkenler için parametrik koşullar karşılandığında, gruplar arasındaki farklılıklar Independent Samples T-testi veya Anova kullanılarak analiz edildi. Parametrik olmayan durumlarda ise Mann Whitney U Testi kullanıldı. Nitel değişkenler açısından gruplar arasındaki farklılıklar χ^2 Testi ile değerlendirildi. 0.05'ten küçük *p* değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma için, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi bölümüne başvurarak periodontitis tanısı alan 20 kişiye ait periodontitis ve aynı kişilere ait sağlıklı dişeti dokusu örneği toplandı. Tüm analizler Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmaya katılan gönüllüler, yaş ortalaması 51.3 ± 10.19 olan 8 kadın ve 12 erkek bireyden oluşmaktaydı. Gönüllülere ait demografik veriler Tablo 4.1’de, Cinsiyet dağılım grafiği ise Şekil 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Periodontitis hastalarının demografik verileri

Periodontitis n=20		
Yaş		51.3±10.19
Cinsiyet	Kadın	8
	Erkek	12



Şekil 4.1. Çalışmaya dahil edilen periodontitis hastaların cinsiyet dağılım grafiği

4.1. Demografik Veri Analizleri

Demografik veriler sonucunda hastalar yaşlarına göre gruplandırılarak analiz edildi. Analizler sonucunda, gingival indeks, plak indeksi, sondalanan cep derinliği, kat değişikliği ve yaş arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken ($p>0.05$), yaş artışı ile plak skoru arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulundu ($p=0.03$). Yaşın değişkenlere göre dağılımı Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Yaşın değişkenlere göre dağılımı

Değişkenler	Yaş	
	ortalama $\pm$ SD	p değeri
Plak skoru	54.75 $\pm$ 9.94	*0.039
Gingival indeks	54.7 $\pm$ 9.9	0.391
Sondalama cep derinliği	0.8 $\pm$ 0.98	0.416
Kat artışı	5.6 $\pm$ 5.4	0.314

(*: 0.05 düzeyinde anlamlılık; SD: standart sapma)

Tablo 4.3. Yaş ve plak skoru ilişkisi

Plak Skoru	Yaş	
	ortalama $\pm$ SD	p değeri
Skor 1	53.5 $\pm$ 2.16	*p=0.03
Skor 2	46 $\pm$ 9.60	
Skor 3	64 $\pm$ 0.81	

(*: 0.05 düzeyinde anlamlılık; SD: standart sapma)

Ayrıca yapılan korelasyon analizleri sonucunda sondalama cep derinliği ve yaş arasında pozitif yönlü, anlamsız ve zayıf bir korelasyon saptanmıştır ($r<0.4$). Yaş ve Sondalama cep derinliği arasındaki korelasyon analizi Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Yaş ve sondalama cep derinliği korelasyon analizi

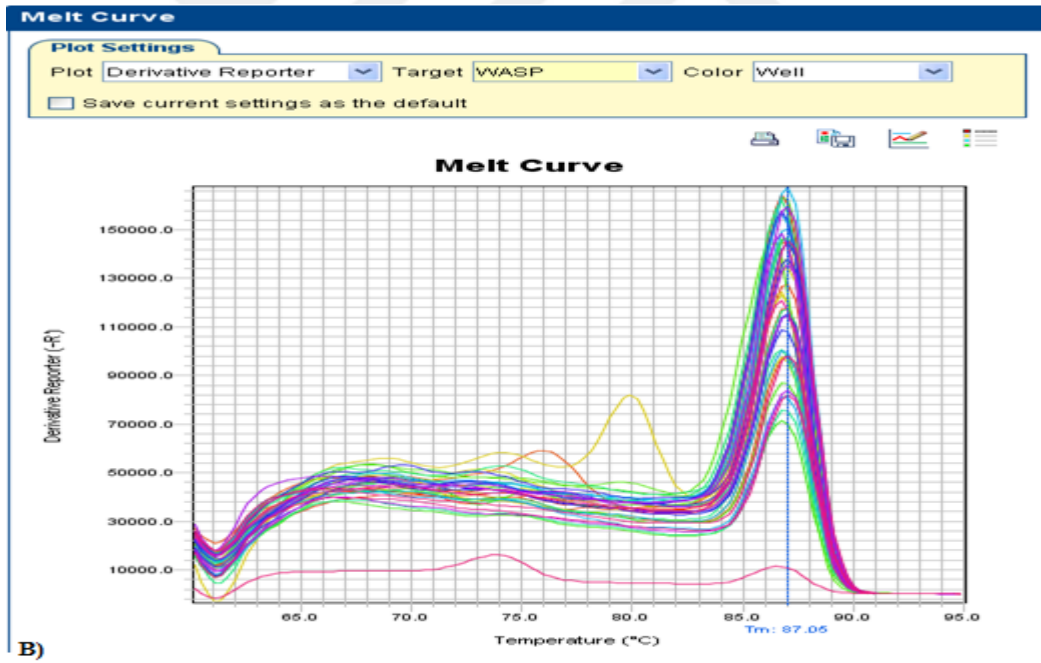
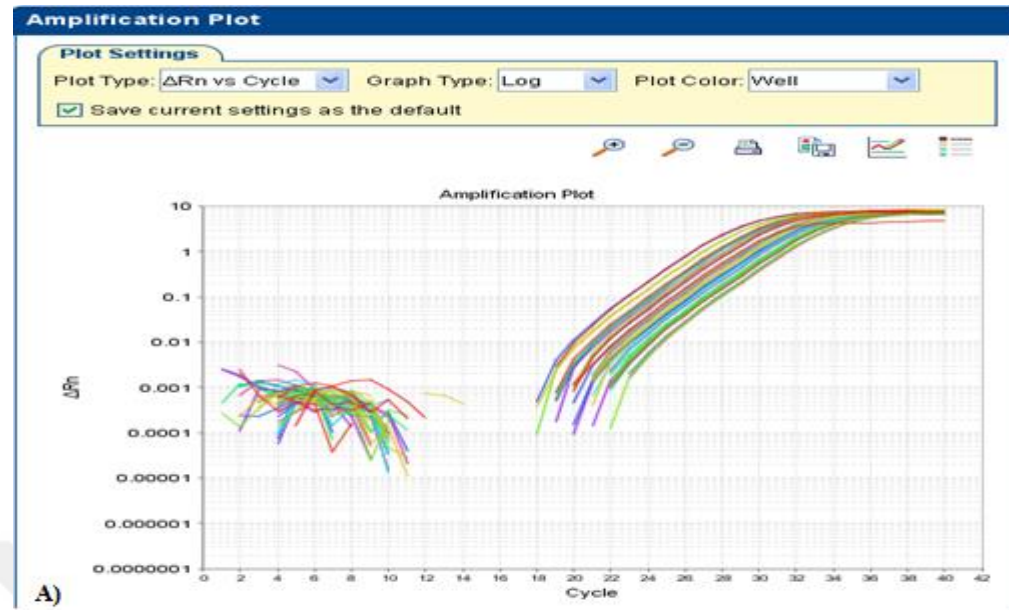
Sondalama cep derinliği	
YAŞ	$r=0.277$
	$p=0.266$

(r=Pearson korelasyon; $r<0.4$ zayıf korelasyon, $r>0.4$ anlamlı korelasyon)

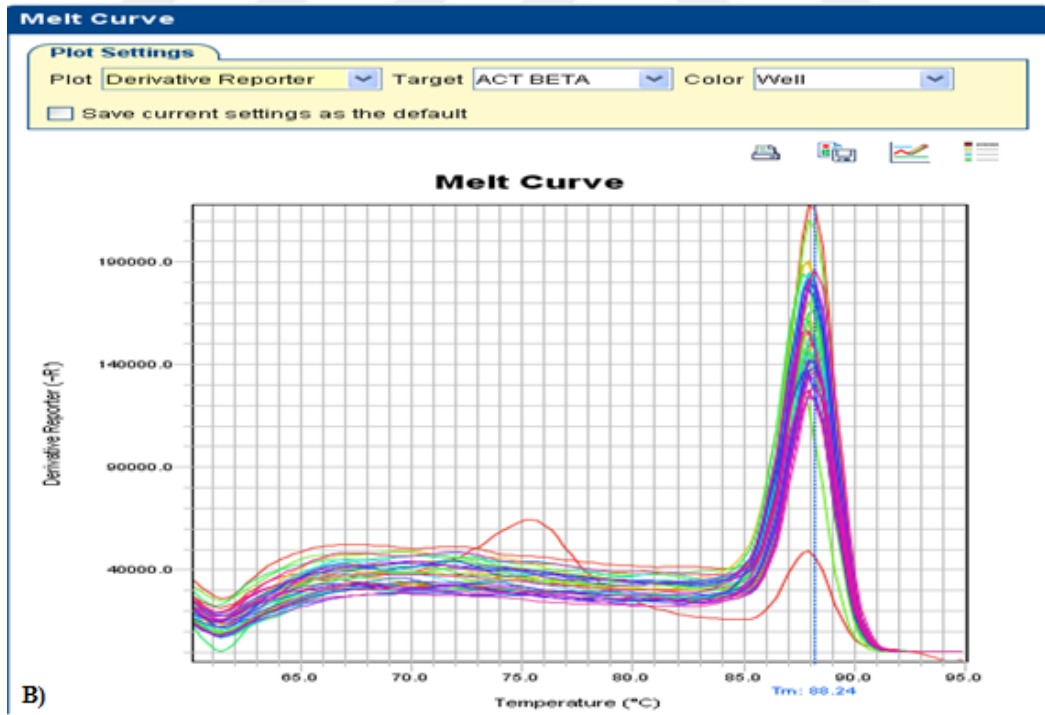
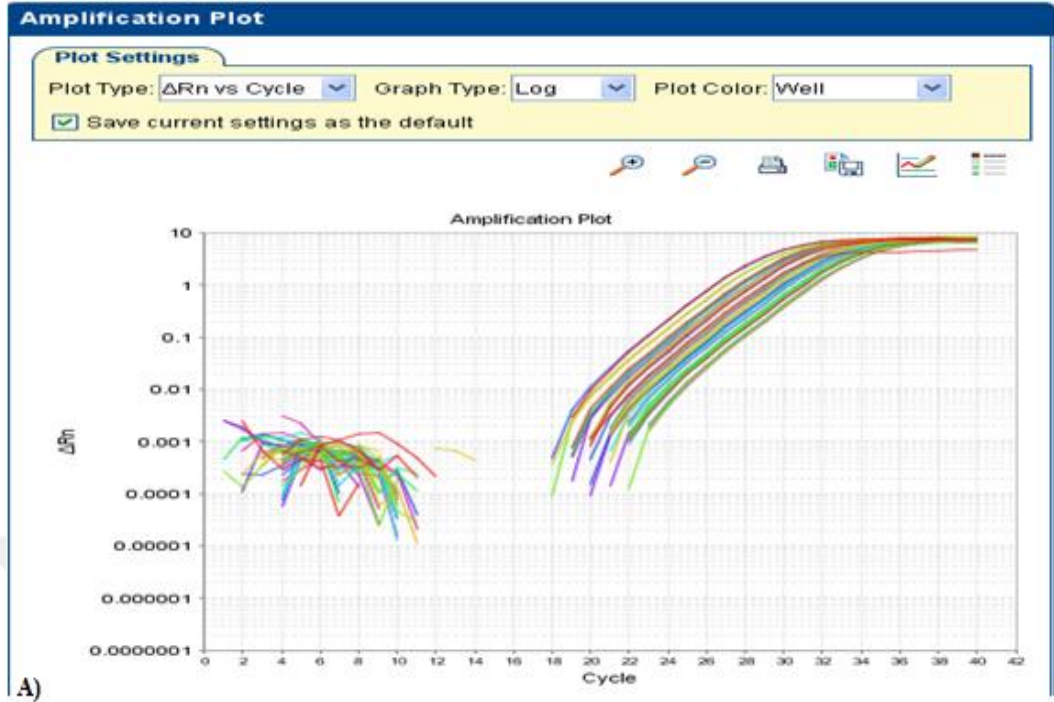
Cinsiyet ile gingival indeks, plak skoru, sondalama cep derinliği, kat artışı ve WASP ekspresyon değişikliği arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$). Aynı şekilde kat değişimi ile yaş, sondalama cep derinliği, plak skoru, gingival indeks ve WASP ekspresyon değişiklikleri arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0.05$).

4.2. Gerçek Zamanlı PZR ile WASP Gen İfade Düzeyinin Belirlenmesi

Periodontitis ve sağlıklı dişeti dokularından total RNA izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (Thermo; ABD) kullanıldı. Total RNA izolasyonundan sonra, Applied Biosystems Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti (Thermo; ABD) kullanılarak cDNA elde edildi. Periodontitis ve normal dişeti dokularında WASP gen ekspresyon analizi SYBR Green temelli RT-PZR yöntemi (Applied Biosystem StepOnePlus) kullanılarak belirlendi. Housekeeping gen olarak ACTB kullanıldı ve WASP geninin ekspresyon seviyeleri ACTB ile normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile kat değişiklik miktarları hesaplanarak elde edilen veriler ile istatistiksel analizler yapıldı. Veriler ort $\pm$ SD olarak verildi. Sonuçlar değerlendirilirken 0.9-1.1 aralığı kullanıldı. 0.9'dan küçük değerler sağlıklı gingiva dokusuna oranla periodontitis dokusunda WASP geninin ifade düzeyinin azaldığı, 0.9' dan büyük değerler sağlıklı gingiva dokusuna oranla periodontitis dokusunda WASP geninin ifade düzeyinin arttığı, 0.9-1.1 arasındaki değerler ise sağlıklı gingiva dokusu ile karşılaştırıldığında ifade düzeyinde bir değişiklik olmadığı kabul edildi (Schmittgen & Livak, 2008). WASP ve ACTB genine ait amplifikasyon ve erime piki sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

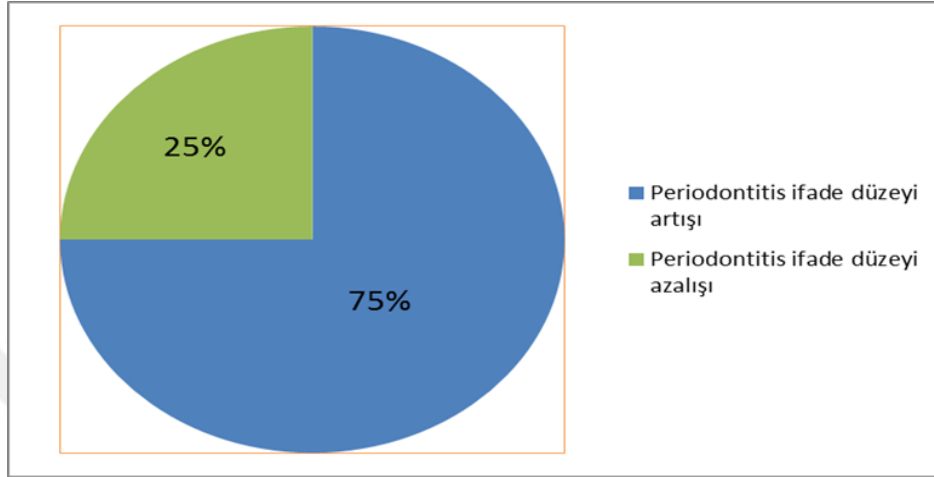


Şekil 4.2. WASP genine ait amplifikasyon eğrisi grafiği (A) ve Erime piki (B)



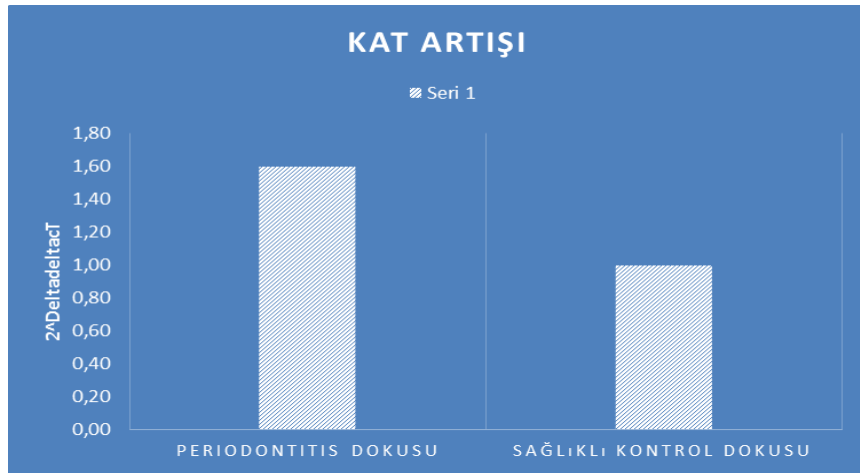
Şekil 4.3. ACTB genine ait amplifikasyon eğrisi grafiği (A) ve Erime piki (B)

RT-PZR sonuçları, WASP gen ekspresyonunun periodontal dokuların %25'inde (5/20) azaldığını, %75'inde (15/20) ise arttığını gösterdi. WASP gen ifade düzeyindeki değişiklikler Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. WASP gen ifade düzeyindeki değişimler

Verilerimiz WASP gen ekspresyonunun periodontitis dokularında sağlıklı dişeti dokularına göre 1.60 kat arttığını göstermiştir. Bu artış Şekil 4.5' de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. WASP geninin periodontitis dokularında (n= 20) normal dişeti dokularına göre kat değişimini gösteren grafik.

(WASP genlerinin nispi nicelendirme değerleri, Gerçek zamanlı PZR kullanılarak ölçüldü. WASP geninin kantitatif ekspresyon verileri ACTB geni ile normalize edildi. Periodontitis dokularının kat değişimi=1.60, sağlıklı dokuların kat değişimi=1 olarak hesaplandı)

Periodontitis dokularında normal gingiva dokularına göre WASP gen ifade düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.021$). Tablo 4.5' de analiz sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Periodontitis ve sağlıklı gingiva dokularındaki WASP ekspresyon seviyelerinin analizi

Periodontitis (n=20)	WASP (ortalama $\pm$ SD)	p Değeri
	0.60 $\pm$ 1.07	
Sağlıklı Gingiva Dokusu (n=20)	1	* $p=0.021$

(SD: standart sapma; *:0,05 düzeyinde anlamlılık)

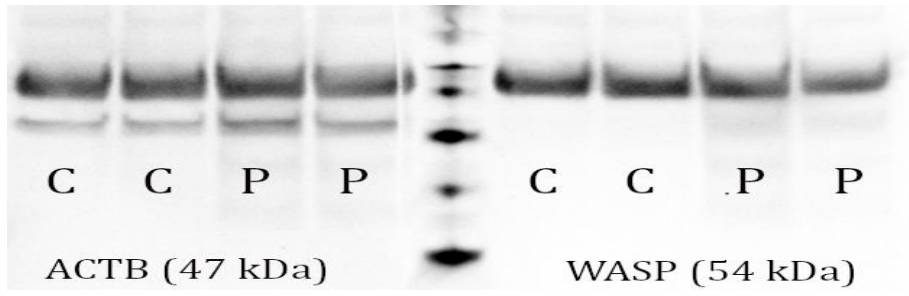
4.3. Western Blot ile WASP Protein Ekspresyon Analiz Sonuçları

Normal dişeti dokularına kıyasla periodontitis dokularında protein ekspresyonunun azaldığı (0.58-kat değişimi) (Şekil 4.6) ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0.001$) (Tablo 4.6) tespit edildi. Western Blot analiz görüntüleri şekil 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Periodontitis ve sağlıklı gingiva dokusunda WASP proteini kat değişimi

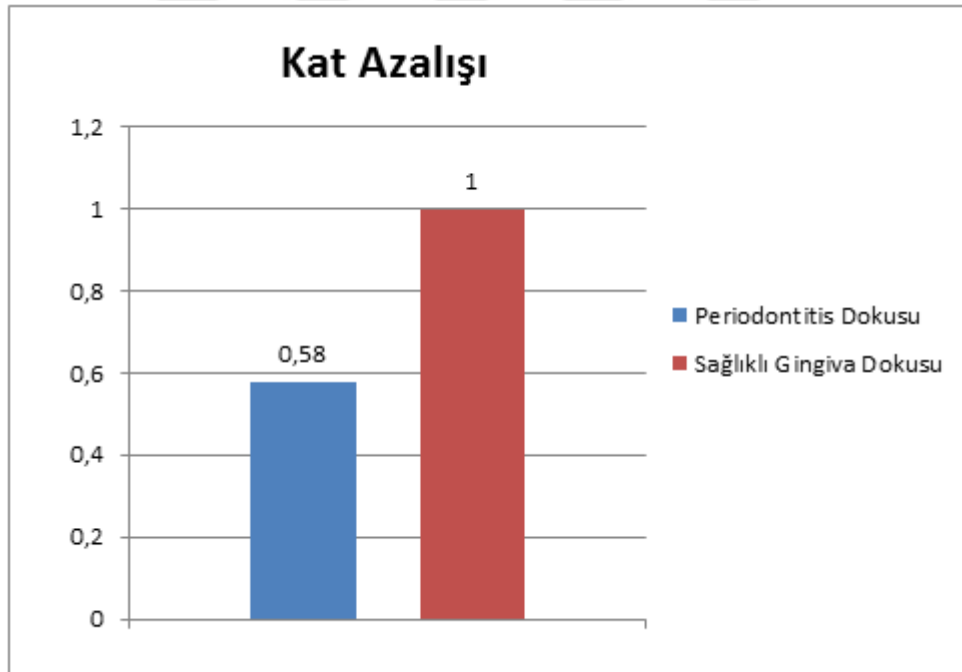
	ortalama $\pm$ SD	p
Periodontitis (n=20)	0.41 $\pm$ 0.067	
Sağlıklı dişeti (n=20)	1	0.001

(SD: standart sapma; *:0,05 düzeyinde anlamlılık)



Şekil 4.6. Sağlıklı dişeti dokularına kıyasla periodontitis dokularında WASP protein seviyeleri

(Periodontitis dokularında (n = 20) ve sağlıklı dişeti dokularında (n = 20) eksprese edilen WASP proteininin (54 kDa) Western blot analizi. ACTB proteini (47 kDa) internal kontrol olarak kullanıldı. C: Sağlıklı dişeti dokusu, P: Periodontitis dokusu)



Şekil 4.7. WASP proteinin periodontitis dokularında normal dişeti dokularına göre kat değişimini gösteren grafik

5.TARTIŞMA

Periodontitis, etiyolojisinde doğal ve edinsel immünitedeki düzensizliklerin önemli rol oynadığı bilinen, yaşam kalitesini ve genel sağlığı olumsuz yönde etkileyen en yaygın kronik inflamatuvar hastalıktır (Aquino-Martinez ve ark., 2020; Xing ve ark., 2021). Periodontitis, dişeti enfeksiyonuna, diş destekleyen periodonsiyumun tahrip olmasına ve sıklıkla dişeti çekilmesine neden olur (Grönkjaer ve ark., 2018). Dişeti iltihabı, patolojik migrasyon, klinik ataşman kaybı, alveolar kemik kaybı, sondalama sırasında kanama, sonda cep derinliği ve motilite ile karakterizedir (Kwon ve ark., 2021). Hastalık, ağız sağlığı ve yaşam standartlarını olumsuz yönde etkilemeden ve daha ileri evrelerde diş kaybına neden olmadan, erken dönemde tedavi edilmelidir. Periodontitis, prevalansının yüksek olması (dünya nüfusunun %11'i), sistemik hastalıklara yatkınlık oluşturmaları, tedavisinin zor ve maliyetli olması nedeniyle önemli bir sağlık sorunu ve ekonomik yük olmaya devam etmektedir (Kwon ve ark., 2021; Yang ve ark., 2021).

Periodontitisin en sık görülen hastalıklardan biri olması ve sistemik hastalıklar için zemin hazırlaması veya sistemik hastalıkların şiddetini artırması periodontiti önemli bir sorun haline getirmektedir (Hajishengallis, 2015; Lee & Lee, 2019). Periodontitis gelişimi birçok çevresel ve genetik faktöre (mikroorganizmalar, yaş, cinsiyet, ailesel geçiş, sistemik durum, ağız bakımı alışkanlıkları, eğitim, profesyonel tavsiyelere uyum ve sosyo-ekonomik durum gibi) bağlıdır (Arweiler ve ark., 2018; Yılmaz ve ark., 2019). Hastalığın multifaktöriyel bir etiyolojiye sahip olması ve özellikle sigara ile ağız hijyeni gibi çevresel faktörlerin hastalığın görülme sıklığını ve şiddetini etkilemesi, genetik faktörlerin periodontal hastalık üzerine etkisinin çevresel faktörler nedeniyle gölgelenebileceği düşüncesini akla getirmektedir. Bu sebeple çalışmalar yatkınlık genleri ve bireyler arasındaki kişisel farklılıklar üzerine yönelmiştir (Ünal Kocaman, 2012). Başka bir deyişle hastalık, mikrobiyal topluluklar ve birkaç bireysel faktörle açıklanması zor olan konak yanıtı gibi genetik ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucudur. Bu nedenle, farklı nedensel bileşenlerin her biri her bir vakanın nasıl gelişebileceğini ve ilerleyebileceğini etkileyen çok sayıda nedensel faktör kombinasyonlarına sebep olur (Loos & Van Dyke, 2020).

Birçok farklı bakteri türünün peridontitiste gözlenen inflamasyon sürecinde yer alması hastalığın polimikrobiyal bir patogeneze sahip olduğunu göstermektedir (Benedetto ve ark., 2013). Konak ve mikroorganizmalar arasındaki dengesizlik hastalığın şiddetini belirler (Cekici ve ark., 2014). Ağız mikrobiyotasına bağlı olarak bozulan konak immün ve inflamatuvar yanıtları, periodontal inflamasyonun ve doku yıkımının başlaması, oluşumu ve ilerlemesinin ana nedeni olarak kabul edilir (Bunte & Beikler, 2019). Bu nedenle immün ve inflamatuvar yanıtların nasıl düzenlendiği periodontitisin patogenezi anlamada önemli bir role sahiptir (Cekici ve ark. 2014).

Periodontitis patogenezinde de majör role sahip olan immün ve inflamatuvar yanıtlar, aktin hücre iskeleti ve aktin hücre iskeleti yeniden düzenlemeleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu sebeple, inflamatuvar ve immün yanıtı regüle eden genler ile periodontitis arasında ilişkiler kurulmaya başlanmıştır. Bu doğrultuda sitokinler, HLA'lar, immün reseptörler, proteazlar ve yapısal proteinler ile periodontitis arasındaki olası ilişkiyi araştıran çalışmalar yapılmıştır (Ünal Kocaman, 2012). Ancak literatür tarandığı kadarıyla, çalışmamızın konusunu oluşturan aktin yeniden düzenleyici proteinlerinden biri olan WASP ile periodontitis arasındaki olası ilişkiyi araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Aktin hücre iskeleti yeniden düzenlemeleri, bölünme, inflamatuvar hücre göçü, endositoz, farklılaşma, sitokinez, immün yanıt üretimi, kanser ilerlemesi ve inflamatuvar hücrelerin hareketi gibi birçok hücresel süreçte rol oynar (Padrick ve ark., 2010; Kopecki ve ark., 2016; Fernandez-Colleja ve ark., 2019). WASP proteinleri aktin hücre iskeleti düzenlenmesinde majör rol oynayan proteinlerden biridir. Çoğunlukla hematopoietik hücrelerde eksprese edilen WASP, hücre yüzeyi reseptörlerinden aktin iskeletine sinyal iletiminde yer alır ve normal hücre hareketi, inflamatuvar hücre göçü, immün sinaps oluşumu ve fagositoz dahil olmak üzere birçok hematopoietik ve immün hücre fonksiyonu için gereklidir (Yapıcı & Kılıç, 2008; Thrasher & Burns, 2010).

WASP'nin hematopoietik hücrelerde hücre iskeleti organizasyonunun korunmasında önemli bir rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir. Literatürde WASP'ın aktin polimerizasyonunu düzenlediğini destekleyen çalışmalar mevcuttur. Fernandez-Calleya ve ark., (2019)'nın yaptığı çalışmada CRISP/Cas9 ile silinen

WASP, hücrelere yeniden transfekte edildiğinde WASP'nin aşırı eksprese edildiği ve aktin hücre iskeletinin normale döndüğü; WASP kaybında ise F aktin ve G aktin dinamiklerinin değiştiği ve anormal hücre iskeleti organizasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Fernández-Calleja ve ark., 2019). Oliver ve ark., (2006)'nın çalışmasında, WASP aşağı regülasyonunun podozom oluşumunu engellediğini ve dendritik hücrelerin hareketliliğini bozduğunu gösterilmiştir. Podozom sayısındaki bu azalmanın anormal hücre hareketliliğine neden olduğu belirtilmiştir (Oliver ve ark., 2006). Jean ve Jean'ın (2020) yaptığı bir çalışmada Dictyostelium'daki 3 WASP'den biri olan WasC'den yoksun hücrelerin vahşi tip hücrelere kıyasla güçlü hücre yapışması ve F-aktin seviyelerinde yaklaşık 1.5 kat artış sergilediği, kusurlu fagositoz gözlemlendiği, kemoatraktan aracılı hücre göçünde göç hızının azaldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, WasC'nin, muhtemelen bir negatif düzenleyici olarak, göç eden hücrelerin ön kenarında F-aktin polimerizasyonunu düzenleyerek hücre yapışması ve göçüne dahil olduğu kanısına varmışlardır (Jean & Jean., 2020).

WASP ifade hataları; bozulmuş T hücre proliferasyonu, bozulmuş makrofaj fagositozu, bağışıklık sistemi hücrelerinin hareket ve aktivasyonunda bozulma, trombosit anormallikleri gibi birçok kusura neden olur (Bouma ve ark., 2007; Yapıcı ve Kılıç 2008). Bu kusurlu işlevler, ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara yatkınlıkla sonuçlanan karmaşık bir hücresel ve humoral immün yetmezliğe yol açar (Ochs ve Thrasher, 2006). WASP geninde 5 farklı domain ve birçok mutasyon (yaklaşık 300 tane) tanımlanmıştır. Bu mutasyonların, otoimmünite, malign potansiyel, kanama, immün yetmezlik ve inflamatuvar semptomlar dahil olmak üzere önemli ölçüde değişen klinik fenotipler sergilediği rapor edilmiştir (Rivers & Thrasher, 2017). Örneğin Ochs'un (2009) yaptığı bir çalışmada, WASP geninde modifikasyona sahip bireylerin WAS klinik fenotiplerinin yüksek oranda mutasyonun tipine ve konumuna bağlı olduğu bildirilmiş ve WASP'ın çoklu fonksiyonel alanlarının hücre/hücre etkileşimi, aktin polimerizasyonu, kemotaksis, hücre sinyali, NK hücre aktivitesi, sinaps oluşumu ve Treg fonksiyonu için önemli olduğu belirlenmiştir (Ochs, 2009). Keszei ve ark., (2018) yaptığı çalışmada WASP GTPaz bağlama alanındaki fonksiyon kazanımı mutasyonlarının, konjenital nötropeni ve tekrarlayan majör bakteriyel enfeksiyonlar ile karakterize edilen XLN hastalığına yol açtığı ve otomatik olarak inhibe edilen konformasyona katlanmayı bloke ederek yapısal olarak aktif WASP'yi indüklediği

bildirilmiştir (Keszei ve ark., 2018). Westerberg ve ark., (2010)'nın yaptığı bir çalışmada ise WASP'ın aşırı ifadesine sebep olan mutasyonların, aktin dinamiğinde düzensizliklere neden olduğu, aşırı aktif WASP ifade eden makrofajlarda, artan anormal podozom agregasyonu ve F-aktin seviyelerinin saptandığı bildirilmiştir (Westerberg ve ark., 2010).

Son yıllarda, bağışıklık sistemi bozukluğu, aktin hücre iskeleti anormallikleri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, bağışıklık hücrelerinde aktin hücre iskeleti düzensizliğinin inflamatuvar belirtilere neden olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Aktin hücre iskeleti düzenlenmeleri ailesel akdeniz ateşi, mevalonat kinaz eksikliği ve PAPA sendromu gibi otoinflamatuvar durumlar; vaskülit ve sitopeni gibi şiddetli ve tekrarlayan enfeksiyonlar ile karakterize inflamatuvar-otoimmün hastalıklar; WAS ve DOCK8 gibi klasik ve primer immün yetmezliklerin gözlemlendiği birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Papa ve ark., 2020). Bu bağlamda inflamasyon ve immüniteyle ilişkili olarak aktin hücre iskeleti yeniden düzenlemeleri, nötrofil ve makrofajların inflamatuvar bölgeye göçü, antijenlerin dendritik hücreler, nötrofiller ve makrofajlar tarafından alınması, inflamatuvar bölgede antijenlerin fagositozisi gibi birçok immün süreçte rol oynar (Banchereau & Steinman 1998; Swanson 2008; Cekici ve ark., 2014). Örneğin; Zhang ve ark., (2006) hem insan hem de murin nötrofillerindeki WASP eksikliğinin $\beta 2$ integrinlerin kümelenmesinde, yapışmada ve transendotelial göçte sorunlara yol açtığını, ayrıca WASP eksikliğine bağlı olarak bozulmuş $\beta 2$ integrin fonksiyonunun immün yetmezliklere de katkı sağlayabileceğini göstermiştir (Zhang ve ark. 2006). Kurisu ve Takenawa (2009), WAS hastalarında T lenfositlerinin kusurlu hücre göçü ve aktin polimerizasyonu göstermesi sebebiyle T hücrelerinin işlevini yerine getiremediğini ve immün yetmezliğe neden olduğunu (Kurisu & Takenawa, 2009); Jain ve Tharanabolu (2015), WASP eksikliğinde makrofajların kemotakside kusurlu olduğunu ve podozom oluşturamadıklarını (Jain & Tharanabolu, 2015); Sereni ve ark., (2018) WASP eksikliğinde trombositlerin yüksek miktarda CD40L salgıladığını, inflamasyonu sürdürdüğünü ve B hücre fonksiyonunun değişmesine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir (Sereni ve ark., 2018).

WASP protein ailesinin bir diğeri üyesi olan N-WASP'ın atopik dermatit patogeneğinde rol oynayabileceğı hipotezi üzerine yapılan bir çalışmada, N-WASP nakavt fareler üretilmiş ve kontrol farelere kıyasla kalınlaşmış epidermis, anormal kornifiye tabaka, mast hücreleri, eozinofiller, T-lenfositler gibi bağışıklık hücrelerinde yoğun infiltrasyon görülmekle birlikte IL-10, IL-6, IL-17, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. İnsan atopik dermatit hastalarında yapılan analizler sonucunda kontrole kıyasla hasta bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da N-WASP ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Kalailingam ve ark., 2017).

Li ve ark., (2021)'nin hem insan hem de fare modellerinde yaptıkları çalışmaya göre, WASP-eksik Germinal Merkez B-Hücreleri (GCB'ler) bağışıklık sistemi yanıtlarında kusurlara ve enfeksiyonlara neden olur. WASP eksikliği, GCB'lerin daha az veya kararsız membran çıkıntıları oluşturmalarına neden olur. Sonuç olarak, GCB'lerin ayırt etme kapasitesinin azaldığı ve B hücre seçim kusurlarının gözlemlendiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2021).

Biswas ve ark., (2018) tarafından yapılan periodontitis gibi inflamatuvar bir hastalık olan inflamatuvar bağırsak hastalığı ile WASP arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada bağırsak iltihabını önlemede önemli olan doğal bağışıklık işlevi için WASP'ın gerekli olduğu gösterilmiştir. Çalışmada seçici olarak WASP'ın makrofaj-spesifik silinmesinin, makrofajların tolerojenik özelliklerini kaybetmesine, proinflamatuvar özellik kazanmasına sebep olduğu ve bunun sonucunda inflamasyonun arttığı, doku homeostazının bozulduğu ve inflamatuvar bağırsak hastalığının ortaya çıkma ihtimalinin arttığı bildirilmiştir (Biswas ve ark., 2018).

Kalailingam ve ark., (2017)'nin periodontitis ile aynı patogenezi paylaşan kronik iltihaplı bir hastalık olan sedef ile hücre iskeleti proteinlerinden N-WASP'ın olası ilişkisini araştırdıkları çalışmada, keratinositlerdeki koşullu N-WASP nakavtının deride atopik dermatit benzeri iltihaplanmaya ve sistemik bir bağışıklık tepkisine yol açtığını rapor etmiştir. N-WASP eksikliğinde, epidermiste immün hücrelerin aktive olduğu, IL-6 ve IL-17 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, N-WASP'ın yetişkin fare

cildinde cilt bariyerini ve cilt homeostazını korumak için gerekli olduğunu göstermektedir (Kalailingram ve ark., 2017).

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde inflamatuvar bir hastalık olan periodontitis ile inflamatuvar-immün süreçlerin regülasyonunda görev aldığı belirlen WASP arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir. Ancak bilğimiz dahilinde literatürde periodontitisin WASP veya diğer hücre iskeleti elemanları ile olası ilişkisine açıklık getirmemizi sağlayacak araştırmaların sayısı oldukça azdır. Literatür tarandığı kadarıyla Wang ve ark., tarafından 2020 yılında yapılan çalışma, periodontitis ve aktin hücre iskeleti düzenlenmeleri arasındaki olası ilişkiye dikkat çeken ilk çalışmadır. Çalışmada, N-WASP nakavt farelerin dişeti epitelinde ve bağ dokusunda inflamatuvar reaksiyon sergilediği gösterilmiş olup aynı zamanda periodontitis ile ilgili bir dizi sitokin ekspresyonuna da bakılmıştır. Literatürle uyumlu olarak, IL-6, IL-8, CXCL2, Superoksit dismutaz-2 ve prostaglandin-endoperoksit sentaz 2'nin mRNA ekspresyonu, insan dişeti fibroblastlarında (HGF'lerde) N-WASP yıkımından sonra artmış ve 48 saatte maksimuma ulaşmıştır. Bununla birlikte, sitokinlerin gen ekspresyon profilleri ile salgılanan protein seviyeleri arasında her zaman korele veriler elde edilmemiştir. HGF'lerde, IL-8 ve CXCL2'nin protein seviyeleri, mRNA ekspresyonu ile korele olan N-WASP'ın yıkımından sonra zamana bağlı olarak artmıştır. Oysa IL-6 protein üretimi, mRNA düzeyine kıyasla nispeten kısa sürede maksimuma ulaşmıştır (Wang ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da Wang ve ark.'larının çalışmasında olduğu gibi gen ekspresyon profilleri ile protein seviyeleri arasında farklılıklar gözlenmiştir.

Sınırlı sayıdaki diğer birkaç çalışmada ise aktin hücre iskeleti proteinlerinden olan N-WASP, WAVE1 ve ARPC1A ile periodontitis arasındaki olası ilişki araştırılmış ve mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarından elde edilen verilere göre N-WASP ve ARPC1A'nın gen ekspresyon seviyelerinin periodontitis dokularında normal gingiva dokularına göre arttığı, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanırken (N-WASP $p=0.74$; ARPC1A $p=0.433$), WAVE1 gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir ($p=0.044$) (Amin Rahim, 2022; Özen, 2022; Selen, 2022). Tüm bu mRNA ekspresyon çalışma sonuçları ile bizim çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde birbirini destekleyen veriler elde edildiği görülmektedir.

Çalışmamıza göre, normal dişeti dokularına kıyasla periodontitis dokularında mRNA ekspresyonu anlamlı olarak artmış ($p=0.021$), ancak protein ekspresyonu anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.001$). Elde ettiğimiz verilerimize dayanarak yapılan literatür taramalarına göre transkripsiyon sonucu oluşan mRNA'ların tümünün her zaman son ürün olan proteine çevrilmediğini göstermektedir. Bir hücredeki transkripsiyon ve translasyon süreçleri çeşitli faktörlerden etkilendiği için mRNA ve protein seviyeleri birbiriyle korele olmayabilir (Abreu ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da mRNA ifade düzeyi artmış olmakla birlikte protein ifade düzeyinde azalma görülmüştür. Protein düzenlenmesi karmaşık bir süreçtir ve farklı seviyeler, farklı zamanlar ve farklı türlerde değişiklik gösterir (Abreu ve ark., 2009). Tek başına mRNA'nın ifadesi, karşılık gelen proteinin üretimini sağlamayabilir, protein yarı ömrü ve sentez hızı gibi faktörler, miRNA'lar, transkripsiyon sonrası modifikasyonlar ve gen regülasyon düzenlenmeleri gibi farklılıklar nedeniyle mRNA ve protein seviyeleri korele olmayabilir (Wang ve ark., 2010; de Klerk & Hoen, 2015).

Bu ekspresyon farklılıklarının sebebi olarak güncel bilgilerimize göre ilk akla gelen sebep miRNA'lar olmakla birlikte, miRNA'lar dışında WASP'ın WASP efektör proteinlerden biri olan WIP ile etkileşimindeki düzensizliklerin de mRNA ve protein ekspresyonları arasındaki farka sebep olabileceğini düşünmekteyiz. Hücrelerde, WASP proteinlerinin çoğu (WASP, N-WASP), bu proteinleri proteasomal bozulmaya karşı koruyan WIP ailesi proteinleri ile bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks WASP'ları protein degradasyonuna karşı korur. WASP-WIP etkileşiminin bozulması ve sonuçta ortaya çıkan WASP degradasyonu, WASP fonksiyonunun kaybına ve immün hücrelerin kusurlu aktin hücre iskeleti morfolojisine neden olur (Kurusu ve Takenawa, 2009). Moulding ve ark. bir WAS vakasının normal WASP gen dizisine ve ekspresyonuna sahip olmasına rağmen düşük WASP protein seviyelerine sahip olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, WIP'in WASP'a stabilite sağlaması nedeniyle, WIP ekspresyonu analizleri yapılmış ve WIP bağlanma bölgesindeki homozigot nonsense mutasyon nedeniyle WASP'ın protein ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Moulding ve ark., 2013). Konno ve ark., WASP ve WIP eksikliğinin sitokin oluşumunu, T hücre proliferasyonunu ve IL-2 transkripsiyonunu bozduğunu göstermiştir. Ayrıca gen transferi ve transfeksiyon yöntemlerinin kullanıldığı ekzojen WASP ekspresyon deneylerinde, WASP gen ekspresyonu saptanabilir düzeylerde olmasına rağmen WASP

protein düzeyleri çok düşük bulunmuştur. Bu nedenle, WASP'ın translasyon veya protein-protein etkileşimi gibi transkripsiyon sonrası mekanizmalarla düzenlenebileceğini öne sürmüşlerdir (Konno ve ark., 2007). de la Fuente ve ark., $WIP^{-/-}$ farelerden alınan T hücrelerinde WASP protein seviyelerinin belirgin şekilde azaldığını ve WIP 'in hücrelere transfekte edilmesiyle WASP ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır. Aynı çalışma, WIP eksikliğinin veya kusurlu WIP -WASP etkileşiminin kalpain ve proteazom tarafından WASP'ın bozulmasına yol açtığını göstermiştir. $WIP^{-/-}$ farelerin T hücrelerinde WASP'ın WIP 'e bağlanmasını engelleyen mutasyonların WASP protein ekspresyon seviyesinde bir azalmaya neden olduğunu, mRNA seviyelerinin normal olduğunu ve proteazom inhibitörlerinin $WIP^{-/-}$ T hücrelerinde WASP protein seviyesini arttırdığını bulmuşlardır, bu yüzden WIP 'in WASP için bir şaperon olabileceği düşünülmektedir (de la Fuente ve ark., 2007). Bu literatür verileri sebebiyle ekspresyon düzeyleri üzerinde WIP 'in bir etkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak literatür verileri ve bulgularımız bir bütün olarak incelendiğinde, WASP protein eksikliklerinin genellikle inflamasyon ve immüniteyle ilişkilendirildiği, bu bağlamda bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olacak şekilde WASP protein düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu da hipotezimizi destekleyen sonuçlar elde ettiğimizi ve WASP'ın periodontitis oluşumu ve gelişimi üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Bu sebeple sonuçlarımız, periodontitis patogenezinin daha iyi anlaşılması için moleküler bir temel sağlayabilir ve hedefe yönelik tedavi stratejileri geliştirmede faydalı olabilir. Periodontitis; ilerleme hızının bireyden bireye, aynı bireyde dönemden döneme ve hatta aynı bireyde bölgeden bölgeye değişkenlik göstermesi sebebiyle klinik seyrinde heterojeniteler gösteren, yaşlanma, epigenetik modifikasyonlar ve komorbiditelerin bağışıklık fonksiyonu üzerindeki değişiklikler göstermesine bağlı olarak hastalığın şiddeti ve homeostazının bozulduğu bir hastalık olmasının yanı sıra WASP'ın farklı domainleri sebebiyle birçok proteinle etkileşime girmesi de periodontitis patogenezindeki rolünün anlaşılmasında zorluklara sebep olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın görece daha büyük bir örneklem grubunda, kişisel farklılıklar gözetilerek oluşturulan daha fazla sayıda parametre ile WASP ve etkili olduğu hücresel yollardaki diğer proteinlerle olası ilişkilerinin de araştırılacağı ileri çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. Çalışma sonuçlarımızın, daha spesifik

destekleyici çalışmalara ışık tutabileceği ve ileri teknolojik yöntemlerle yapılacak olan kişiye özel tedavi seçeneklerine moleküler temel oluşturabileceği kannatindeyiz.



KAYNAKÇA

- Abnet, C.C., Qiao, Y.L., Mark, S.D., Dong, Z.W., Taylor, P.R., & Dawsey, S.M. (2001). Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control*, 12(9):847-854.
- Abreu, R.D., Penalva, L.O., Marcotte, E.M., & Vogel, C. (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular BioSystems*, 5 (12), 1512-1526.
- Ahn, J., Segers, S., & Hayes, R.B. (2012). Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis*, 33(5):1055-1058.
- Al-Alwan, M.M., Rowden, G., Lee, T.D., & West, K.A. (2001). The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J. Immunol*, 166:1452–1456.
- Albandar, J.M., Brunelle, J.A., & Kingman, A. (1999). Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*, 70(1): 13-29.
- Albandar, J.M. (2002). Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000*, 29: 31-69.
- Amato, C., Thomason, P.A., Davidson, A.J., Swaminathan, K., Ismail, S., Machesky, L.M., & Insall, R.H. (2019). WASP Restricts Active Rac to Maintain Cells' Front-Rear Polarization *Curr Biol*, 16; 29(24): 4169–4182.e4
- Amin Rahim, H.M. (2022). Periodontitisde WAVE1 gen ekspresyonunun analizi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji, Tokat.
- Aquino-Martinez, R., Rowsey, J.L., Fraser, D.G., Eckhardt, B.A., Khosla, S., Farr, J.N., & Monroe, D.G. LPS-Induced Premature Osteocyte Senescence: Implications in Inflammatory Alveolar Bone Loss and Periodontal Disease Pathogenesis. *Bone*, 132: 115220.
- Arweiler, NB., Auschill, Tm., & Sculean A. (2018). Patient self-care of periodontal pocket infections. *Periodontol 2000*, 76(1):164-179.
- Aslım, H.P. & Bulut, O. (2021). Western Blot. *J Adv VetBio Sci Tech*, 6(1), 45-56.
- Bachir, A.I., Horwitz, A.R., Nelson, W.J., & Bianchini, J.M. (2017). Actin-Based Adhesion Modules Mediate Cell Interactions with the Extracellular Matrix and Neighboring Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(7): a023234.
- Banchereau, J., & Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245–252.
- Bartold, P.M. & McCulloch, C.A. (2013). Information generation and processing systems that regulate periodontal structure and function. *Periodontoloji 2000*, 63, 7-13.

- Bartold, P.M., & Narayanan, A.S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40, 29–49.
- Barczyk, M., Bolstad, A.I. & Gullberg, D. (2013). Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontology 2000*, Vol. 63, 2013, 29–47
- Becerra-Ruiz¹, J.S., Guerrero-Velázquez, C., Martínez- Esquivias, F., Martínez-Pérez, L.A., & Guzmán-Flores, J.M. (2022). Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. *Oral Diseases*, 28: 1441–1447.
- Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S., & Grano, M. (2013). Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. *Clinical and Developmental Immunology*, 503754; 7.
- Biswas, A., Shouval, D.S., Griffith, A., Goette, J.A., Field, M., Kang, Y.H., Konnikova, L., Janssen, E., Redhu, N.S., Thrasher, A.J., Chatila, T., Kuchroo, V.k., Geha, R.S., Notarangelo, D., Pai, S.Y., Horwitz, B.H., & Snapper, S.B. (2018). WASP-mediated regulation of anti-inflammatory macrophages is IL-10 dependent and is critical for intestinal homeostasis. *Nat Commun*, 9:1779.
- Blundell, M.P., Worth, A., Bouma, G., & Thrasher, A.J. (2010). The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Disease Markers*, 29 (3-4), 157-175.
- Bompard, G., & Caron, E. (2004). Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol*, 27;166(7):957-62.
- Bostanci, N., & Belibasakis, G.N. (2018). Periodontal pathogenesis: Definitions and historical perspectives. In: Bostanci N, Belibasakis G, editors. *Pathogenesis of Periodontal Diseases*. Cham: Springer; 2018. pp. 1-7.
- Bouma, G., Burns, S.O., & Thrasher, A.J. (2009). Wiskott–Aldrich Syndrome: Immunodeficiency resulting from defective cell migration and impaired immunostimulatory activation. *Immunobiology*, 214(9-10): 778–790.
- Bui, F.Q., Almeida-da-Silva, C.L.C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., Asadi, H. & Ojcius, D.M. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J*, 42(1): 27–35.
- Bunte, K. & Beikler, T. (2019). Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*, 20(14): 3394.
- Calle, Y., Antón, I.M., Thrasher, A.J., & Jones, G.E. (2008). WASP and WIP regulate podosomes in migrating leukocytes. *Journal of Microscopy*, 231; 494–505.
- Cappuyns, I., Gugerli, P. & Mombelli, A. (2005). Viruses in periodontal disease-a review. *Oral diseases*, 11, 219–229.
- Caton, J.G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I., Jepsen, S., Kornman K.S., Mealey, B.L., Papapanou, P.N., Sanz, M., & Tonetti, M.S. (2018). A new

- classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*, 45: 1-8.
- Cecoro, G., Annunziata, M., Iuorio, M.T., Nastri, L., & Guida, L. (2020). Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review *Medicina Kaunas*, 56(6): 272.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T.E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 64(1): 57–80.
- Cheng, H. C., Skehan, B.M., Campellone, K.G., Leong, J.M., & Rosen, M.K. (2008). Structural Mechanism of WASP Activation by the Enterohaemorrhagic *E. coli* Effector EspFU. *Nature*, 454(7207): 1009–1013.
- Chou, H.C. Chou, H.C., Antón, I.M., Holt, M.R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A.J., Jones, G.E., & Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr. Biol*, 16, 2337–2344.
- Chrysanthakopoulos, N.A. (2011). Aetiology and Severity of Gingival Recession in an Adult Population Sample in Greece. *Dental Research Journal*, 8 (2): 64–70. 4.
- Ciobanasu, C., Faivre, B., & Le Clainche, C. (2012). Actin Dynamics Associated with Focal Adhesions. *Int J Cell Biol*, 2012: 941292.
- Cobb, C.M. (2000). Lasers and the treatment of periodontitis: the essence and the noise. *Periodontology*, 75 (1).
- Corey, L.A., Nance, W.E., Hofstede, P., & Schenkein, H.A. (1993). Self-reported periodontal disease in a Virginia twin population. *Journal of periodontology*, 64(12), 1205-1208.
- Cory, G.O.C., Cramer, R., Blanchoin, L., & Ridley, A.J. (2003). Phosphorylation of the WASP-VCA Domain Increases Its Affinity for the Arp2/3 Complex and Enhances Actin Polymerization by WASP. *Molecular Cell*, 11, 1229–1239.
- Dahl, J.P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M.E., Mark, R.J., & Kwak, S.P.(2003). Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci*, 23:3343–3352.
- de Klerk, E., & 't Hoen, P.A.C. (2015). Alternative mRNA transcription, processing, and translation: Insights from RNA sequencing. *Trends in Genetics*, 31 (3), 128-139.
- de la Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Antón, I.M., Elhal, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., Rosen, F.S., Geha, R.S.(2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci*, 104(3): 926–931.

- Deeks, M.J., & Hussey, P.J. (2005). Arp2/3 and SCAR: plants move to the fore. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:954-964.
- Derry, J.M., Ochs, H.D., & Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott Aldrich Syndrome. *Cell*, 78: 635-44.
- Ding, L., Han, L., Dube, J., & Billadeau, D.D. (2019). WASH Regulates Glucose Homeostasis by Facilitating Glut2 Receptor Recycling in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, 68(2):377–386.
- Fernández-Calleja, V., Fernández-Nestosa, M.J., Hernández, P., Schwartzman, J.B., Krime, D.B. (2019). CRISPR/Cas9-mediated deletion of the Wiskott-Aldrich syndrome locus causes actin cytoskeleton disorganization in murine erythroleukemia cells. *PeerJ*, 7(15): e6284.
- Fischer, R.G., Genç, R.L., Retamal-Valdes, B., Cristina de Figueiredo, L., Malheiros, Z., Stewart, B., & Feres, M. (2020). Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Braz Oral Res*, 9;34(suppl 1):e026.
- Fletcher, D.A. & Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 28;463(7280):485-92.
- Frugtniet, B., Jiang, W.G., & Martin, T.A. (2015). Role of the WASP and WAVE family proteins in breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 24(7), 99–109.
- Fuchs, E., & Cleveland, D.W. (1998). A Structural Scaffolding of Intermediate Filaments in Health and Disease. *Science*, 279; 5350, 514-519.
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., & Condeelis, J.S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res*, 65:5278–5283.
- Goyal, R., Bulua, A.C., Nikolov, N.P., Schwartzberg, P.L., & Siegel, R.M., (2009). Rheumatologic and Autoimmune Manifestations of Primary Immunodeficiency Disorders. *Curr Opin Rheumatol*, 21(1): 78–84.
- Graziani, F., Karapetsa, D., Alonso, B., Herrera, D. (2017). Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000*, 75(1):152-188.
- Greabu, M., Giampieri, F., Imre, M. M., Mohora, M., Totan, M., Pituru, S.M. & Ionescu, E. (2020). Autophagy, One of the Main Steps in Periodontitis Pathogenesis and Evolution. *Molecules*, 25(18): 4338.
- Greenstein G, & Hart TC. (2002). A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, 73(2):231-47

- Grønkjær, L.L. Holmstrup, P., Schou, S., Kongstad, J., Jepsen P., & Vilstrup, H.(2018). Periodontitis in patients with cirrhosis: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*,18:22.
- Guthmiller, J.M. & Novak, K.F. (2002). Periodontal Diseases. <https://doi.org/10.1128/9781555817947.ch8>
- Hacısengallis, G. (2014). Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol*, 35(1): 3–11.
- Hacısengallis, G. (2015). Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1): 30–44.
- Hawkins, S.F.C., & Guest, P.C. (2017). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol*, 1546:125-133.
- Heng, Y.W., & Koh, C.G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42 (10),1622-1633.
- Hoare, A., Soto, C., Rojas-Celis, V., & Bravo, D. (2019). Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm*. 2019;1029857.
- Hohmann, T., & Dehghani, F. (2021). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4): 362.
- Imai K., Nanayama S., & Ochs, H.D. (2003). WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3:427-36.
- Ishihara, D., Dovas, A., Hernandez, L., Pozzuto, M.,Wyckoff, J., Segall, J.E., Condeelis, J.S. Bresnick, A.R. & Cox, D. (2013). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates leukocyte-dependent breast cancer metastasis. *Cell Rep*, 4:429–436.
- Jain, N., & Thanablu, T. (2015). Molecular difference between WASP and N-WASP critical for chemotaxis of T-cells towards SDF-1 α . *Scientific reports*, 5(1), 1-12.
- Jargin, S.V. (2013). On the minimally invasive approach to the gingival recession. *J Indian Soc Periodontol*, 17(3): 394–396.
- Jeon P.& Jeon T.J. (2020). WasC, a WASP family protein, is involved in cell adhesion and migration through regulation of F-actin polymerization in Dictyostelium. *J Microbiol*, 58(8):696-702.
- Jong, T., Bakker, A.D., Everts, V., & Smit, T.H. (2017). The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodont Res*, 52:965–974.
- Juin, A., Spence, H.J., Martin, K.J., McGhee, E., Neilson, M., Cutiongco, M.F.A., Gadegaard, N., Mackay, G., Fort, L., Lilla, S., Kalna, G., Thomason, P., Koh,

- Y.W.H., Norman, J.C., Insall, R.H., & Machesky, L.M. (2019). N-WASP Control of LPAR1 Trafficking Establishes Response to Self-Generated LPA Gradients to Promote Pancreatic Cancer Cell Metastasis. *Developmental Cell*, 51(4): 431-445.e7.
- Kalailingam, P., Tan, H.B., Jain, N., Sng, M.K., Chan, J.S.K., Tan, N.S., & Thanabalu, T. (2017). Conditional knock out of N-WASP in keratinocytes causes skin barrier defects and atopic dermatitis-like inflammation. *Sci Rep*, 7: 7311.
- Kelly, A. E., Kranitz, H., Dötsch, V., & Mullins, R. D. (2006). Actin Binding to the Central Domain of WASP/Scar Proteins Plays a Critical Role in the Activation of the Arp2/3 Complex. *J Biol Chem*, 281(15): 10589–10597.
- Keszei, M., Record, J., Kritikou, J.S., Wurzer, H., Geyer, C., Thiemann, M., Drescher, P., Brauner, H., Köcher, L., James, J., He, M., Baptista, M.A.P., Dahlberg, C.I.M., Biswas, A., Lain, S., Lane, D.P., Song, W., Pütsep, K., Vandenberghe, P., Snapper, S.B., & Westerberg, L.S.(2018). Constitutive activation of WASp in X-linked neutropenia renders neutrophils hyperactive. *J Clin Invest*, 128(9): 4115–4131.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A., & Rosen, M.K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, 404(6774), 151–158.
- Kim, H.J., DiBernardo, A.B., Sloane, J.A., Rasband, M.N., Solomon, D., Kosaras, B., Kwak, S.P., & Vartanian, T.K. (2006). WAVE1 is required for oligodendrocyte morphogenesis and normal CNS myelination. *J Neurosci*, 26:5849–5859.
- Kim, J., & Amar, S. (2006). Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*, 94(1): 10–21.
- Kinane, D.F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 25(1):8-20.
- Kinane, D.F., Stathopoulou, P.G., & Papapanou, P.N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3: 17038.
- Konno, A., Kirby, M., Anderson, S.A., Schwartzberg, P.L., & Candotti, F. (2007). The expression of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) is dependent on WASP-interacting protein (WIP). *International Immunology*, 19(2): 185–192.
- Kopecki, Z., Ludwig, R.J., & Cowin, A.J. (2016). Cytoskeletal Regulation of Inflammation and Its Impact on Skin Blistering Disease Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Int J Mol Sci*, 17(7): 1116.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3):95-125.
- Kumar, S. (2018). Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis. *Dent Clin North Am*, 63(1):69-81.

- Kurisu, S., & Takenawa, T. (2009). The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biology*, 10 (6): 226.
- Kurisu, S., & Takenawa, T. (2010). WASP and WAVE family proteins: Friends or foes incancer invasion?. *Cancer Sci*, 101(10): 2093–2104.
- Kwon, T., Lamster, I.B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J*, 71(6): 462–476.
- Lafouresse, F., Vasconcelos, Z., Cotta-de-Almeida, V., & Dupre, L. (2013). Actin cytoskeleton control of the comings and goings of T lymphocytes. *Tissue Antigens*. 82: 301 – 311.
- Lane, J., Martin, T., Weeks, H.P., & Wen Guo Jiang, W.G. (2014). Structure and Role of WASP and WAVE in Rho GTPase Signalling in Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics*, 11(3),155-166.
- Lee, E. & Lee, S.W. (2019). Prevalence of Periodontitis and Its Association with Reduced Pulmonary Function: Results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Medicina (Kaunas)*, 55(9): 581.
- Lee, PP., Lobato-Márquez, D., Pramanik, N., Sirianni, A., Daza-Cajigal, V., Rivers, E., Cavazza, A., Bouma, G., Molding, D., Hultenby, K., Westerberg, L.S., Hollinshead, M., Lau, Y.L., Burns, S.O., Mostowy, S., Bajaj-Elliott, M., & Thrasher A.J.(2017). Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates autophagy and inflammasome activity in innate immune cells. *Nat Commun*, 8: 1576.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75. 843-854, 1993
- Li, Y., Bhanja, A., Upadhyaya, A., Zhao, X., & Song, W. (2021). WASp Is Crucial for the Unique Architecture of the Immunological Synapse in Germinal Center B-Cells. *Front Cell Dev Biol*, 9: 646077.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., & Johnson, J.M., Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs, *Nature*, 17,769773, 2005.
- Lindhe, J., Karring, T., & Araujo, M. (2015). Anatomy of Periodontal Tissues. Lindhe, J., Lang, N.P., Karring, T. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. John Wiley&Sons, West Sussex; 2015. s. 3-47.
- Lindhe, J., & Lang, N.P. (2017). Periodontología clínica e implantología odontológica. 6a Edición ed. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana S. A de C.V; pp. 3-37.

- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Loesche, W.J. & Grossman, N.S. (2001). Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. *Clin Microbiol Rev*, 14(4): 727–752.
- Loos, B.G & Van Dyke, T.E.(2020).The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 83(1): 26–39.
- Löe H, & Silness J. (1963). Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*, 21:533–551.
- Machesky, L.M., & Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8(25),1347–1356.
- MacTaggart, B., & Kashina, A. (2021). Posttranslational modifications of the cytoskeleton Cytoskeleton. *Hoboken*, 78(4): 142–173.
- Marcaccini, A.M., Meschiari, C.A., Sorgi, C.A., Saraiva, M.C.P., de Souza, A.M., Faccioli, L.H., Tanus-Santos, J.E., Novaes, A.B., & Gerlach, R.F. (2009). Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *Journal of Periodontology*, 80, 594-602.
- Massaad, M. J., Ramesh, N., & Geha, R. S. (2013). Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Anne. NY Acad. Sci*, 1285 (2013) 26–4.
- Melekoğlu, A., & Karahan, O. (2019). Structures of Cytoskeleton and Disease Interactions. *Acta Medica Alanya*, 3(2):197-202.
- Meyle, J. & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontoloji 2000*, 69, 7-17.
- Miki, H., & Takenawa, T. (2003). Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem*. 134,309-313.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., & Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, 391(6662),93–96
- Millard, T.H., Sharp, S.J., & Machesky, L.M. (2004) Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J*, 380:1-17.
- Mishra, M., Tiwari, S. & Gomes, A.V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*, 14(11): 1037–1053.

- Moulding, D.A, Record, J., Malinova, D., & Thrasher, A.J. (2013). Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. *Immunol Rev*, 256(1): 282–299.
- Muñoz-Carrillo, J.L., Hernández-Reyes, V.E., García-Huerta, O.E., Chávez-Ruvalcaba, F., Chávez-Ruvalcaba, M.I., Chávez-Ruvalcaba, K.M. & Díaz-Alfaro, L. (2019). Pathogenesis of Periodontal Disease. Periodontal Disease - Diagnostic and Adjunctive Non-surgical Considerations,
- Nazir, M.A. (2017). Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*, 11(2): 72–80.
- Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B. & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Scientific World Journal*, 2146160, 8
- Nguyen, D.D., Wurbel, M.A. Goettel, J. A., Eston, M.A., Ahmed, O.S., Marin, R., Boden, E. K., Villablanca, E.J., Paidassi, H., Ahuja, V., Reinecker, H.C., Fiebiger, E., Lacy-Hulbert, A., Horwitz, B.H., Mora, J.R., & Snapper S.B. (2012). Wiskott–Aldrich Syndrome Protein Deficiency in Innate Immune Cells Leads to Mucosal Immune Dysregulation and Colitis in Mice. *Gastroenterology*, 143;3, 719-729.e2.
- Nwizu, N., Wactawski-Wende, J., & Genco, R.J. (2020). Periodontal disease and cancer: Epidemiologic studies and possible mechanisms. *Periodontol 2000*, 83(1): 213–233.
- Ochs, H.D., & Thrasher, A.J. (2006). The Wiskott–Aldrich syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol*, 117:725–738.
- Ochs, H.D. (2009). Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. *Immunol Res*, 44 (1-3):84-8.
- Ohlrich, E.J., Cullinan, M.P. & Seymour, G.J. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54(1), 2-10.
- Olivier, A., Jeanson-Leh, L., Bouma, G., Compagno, D., Blondeau, J., Seye, K., Charrier, S., Burns, S., Thrasher, A.J., Danos, O., Vainchenker, W., & Galy, A. (2005). A Partial Down-regulation of WASP Is Sufficient to Inhibit Podosome Formation in Dendritic Cells. *Molecular Therapy*, 13 (4).
- Olivier, A., Jeanson-Leh, L., Bouma, G., Compagno, D., Blondeau, J., Seye, K., Charrier, S., Burns, S., Thrasher, A.J., Danos, O., Vainchenker, W., & Galy, A. (2006). A partial down-regulation of WASP is sufficient to inhibit podosome formation in dendritic cells. *Mol. Ther*, 13: 729–737.
- Özdil, B., Gürel, Ç., Kılıç, K. D., Kuşçu, G. C., Adalı, Y., & Aktuğ, H. (2017). Hücre içi trafik ve hücre davranış özellikleri (Intracellular trafficking and cell behaviour characteristics). *Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine*, 56(1):102-110.

- Özen, A.(2022). Periodontitis gelişiminde hücre iskeleti proteinlerinden N-WASP'IN rolü. Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji, Tokat.
- Padrick, S. B., & Rosen, M. K. (2010). Physical Mechanisms of Signal Integration by WASP Family Proteins. *Annu Rev Biochem*, 79: 707–735.
- Page R.C., & Schroeder, H.E., 1976. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, 34(3):235-249
- Pan, W., Wang, Q., & Chen, Q. (2019). The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*, 11(3): 30.
- Papa, R., Penco, F., Volpi, S., & Gattorno, M. (2020). Actin Remodeling Defects Leading to Autoinflammation and Immune Dysregulation. *Front Immunol*, 7:11,604206.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 1;29(9):e45.
- Pini Prato, G., Baccetti, T., Giorgetti, R., Agudio, G., & Cortellini, P. (2000) Mucogingival interceptive surgery of buccally-erupted premolars in patients scheduled for orthodontic treatment. II. Surgically treated versus nonsurgically treated cases. *J Periodontol*, 71: 182-187.
- Place, R.F. Li, L.C., Pookot, D., Noonan, E.J., & Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences, *PNAS* 105, 1608-1613.
- Placak, D., Jorgic-Srdjak, K., & Curilovic, Z. (20019. New Classification of Periodontal Diseases. *Acta Stomat Croat*, 2001; 89-93.
- Plemmenos, G., Evangeliou, E., Polizogopoulos, N., Chalazias, A., Deligianni, M., & Piperi, C. (2021). Central Regulatory Role of Cytokines in Periodontitis and Targeting Options. *Curr Med Chem*, 28(15):3032-3058.
- Pollard, T.D., & Cooper J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326:1208–12.
- Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D., & Lim, W.A. (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science*, 290 (5492),801–806.
- Ram, V.S., Parthiban, A. Sudhakar, U., Mithradas, N., & Prabhakar R. (2015). Bonebiomarkers in Periodontal Disease: A Review Article. *J Clin Diagn Res*, 9(1): ZE07–ZE10.
- Ramaekers, F. C. S. & Bosman, F. T. (2004). The cytoskeleton and disease. *J Pathol*, 204: 351 – 354
- Ramesh, N., & Geha, R. (2009). Recent advances in the biology of WASP and WIP. *Immunol Res* 2009; 44: 99–111.

- Rivers, E., & Thrasher, A.J. (2017). Wiskott-Aldrich syndrome protein: Emerging mechanisms in immunity. *Eur J Immunol*, 47(11): 1857-1866.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y., & Kirschner, M.W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*, 150(6), 1299–1310.
- Sadok, A., & Marshall, C.J. (2014). Rho GTPases, Masters of cell migration. *Small GTPases*, 5: e29710.
- Sanz, M., del Castillo, A.M., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J.R., D’Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, L., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J.B., Perel, P., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Tonetti, M., Vlachopoulos, C., & Wimmer, G. (2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*, 47(3): 268–288.
- Selen, Y. (2022). Hücre iskeleti proteini ARPC1A ‘nın periodontitis gelişimindeki rolünün araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji, Tokat.
- Sereni, L., Castiello, M.C., Marangoni, F., Anselmo, A., di Silvestre, D., Motta, S., Draghici, E., Mantero, S., Thrasher, A.J., Giliani, S., Aiuti, A., Mauri, P., Notarangelo, L.D., Bosticardo, M., & Villa, A. (2018). MD a, fAutonomous role of Wiskott-Aldrich syndrome platelet deficiency in inducing autoimmunity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 208; 142(4): 1272–1284.
- Shellard, A., & Mayor, R. (2020). All Roads Lead to Directional Cell Migration. *Trends in Cell Biology*, 30 (11): 852-868.
- Silness, J., & Loe H.(1964). Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*, 22(1):121–135.
- Stricker, J., Falzone, T., & Gardelabd, M. L. (2010). Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of Biomechanics*, 43(1): 9-14
- Sudhakar, M., Rikhi, R., Loganathan, S. K., Suri, D., & Singh, S. (2021). Autoimmunity in Wiskott–Aldrich Syndrome: Updated Perspectives. *The Application of Clinical Genetics*, 14 363–388.
- Suetsugu, S. & Takenawa, T. (2003). Translocation of N-WASP by Nuclear Localization and Export Signals into the Nucleus Modulates Expression of HSP90. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (43), 42515–42523.
- Sun, J., Zhong, X., Fu, X., Miller, H., Lee, P., Yu, B., & Liu, C. (2022). The Actin Regulators Involved in the Function and Related Diseases of Lymphocytes. *Front. Immunol*, 13: 799309.
- Sun, X., Wei, Y., Lee, P. P., Ren, & B., Liua, C. (2019). The role of WASp in T cells and B cells. *Cellular Immunology*, 341: 103919

- Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 639–649.
- Taba, J.M, Souza, S.L., & Mariguela, V.C. (2012). Periodontal disease: a genetic perspective. *Brazilian oral research*. 2012;26(spe1):32-8
- Takenawa, T., & Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins. key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement,. *J Cell Sci*, 114(10),1801–1809.
- Takenawa, T., & Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1),37–48.
- Tang, D.D., Zhang, W., & Gunst, S.J. (2005). The adapter protein CrkII regulates neuronal wiskott-aldrich syndrome protein, actin polymerization, and tension development during contractile stimulation of smooth muscle. *J Biol Chem*, 280:23380–9.
- Tang, D.D., & Gerlach, B.D. (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respiratory Research*,18: 54.
- Thornton, B & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39: 2,145–154.
- Thrasher, A.J. & Burns, O.S.(2010). WASP: a key immunological multitasker. *Nature Reviews Immunology* 10: 182–192.
- Tolar, P. (2017). Cytoskeletal control of B cell responses to antigens. *Nat Rev Immunol*, 17(10):621-634.
- Tonetti, M.S., Greenwell, H, & Kornman, K.S.(2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, 89: 159-172.
- Toscano, M.G., Muñoz, P., Sánchez-Gilabert, A., Cobo, M., Benabdellah, K., Anderson, P., Ramos-Mejía, V., Real, P.J., Neth, O., Molinos-Quintana, A., Gregory, P.D., Holmes, M.C., & Martin, F. (2016). Absence of WASp Enhances Hematopoietic and Megakaryocytic Differentiation in a Human Embryonic Stem Cell Model. *Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy*, 24;2, 342–353.
- Trepat, X., Chen, Z., & Jacobson, K. (2012). Cell Migration. *Compr Physiol*, 2(4): 2369–2392.
- Umesh, S. G., Ramachandran, L., Karthikeyan, J., & Mani, A., 2021. Genetics and Periodontal Disease: An Explicit Insight. *Periodontology - Fundamentals and Clinical Features*,1 p, Londra, İngiltere.
- Ünal Kocaman, G., 2012. Kronik periodontitisli hastalarda metilentetrahidrofolat redüktaz geni 677 C→T ve 1298 A →C polimorfizmlerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi, Peridontoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

- Van Dyke, T.E, & Kornman KS.(2008).Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol*, 79: 1503–7.
- Vartiainen, M.K., & Machesky, L.M. (2004). The WASP-Arp2/3 pathway: genetic insights. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 174-181.
- Vicente-Manzanares M., & Sanchez-Madrid F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol*, 4: 110–122.
- Vijayalakshmi R, Geetha A, Ramakrishnan T, & Emmadi P. (2010). Genetic polymorphisms in periodontal diseases: an overview. *Indian Journal of Dental Research*, 1;21(4):568
- Wang, H.Y., Wang, Q., Pape, U.J., Shen, B.R., Huang, J.H., Wu, B. et al. (2010). Systematic investigation of global coordination among mRNA and protein in cellular society *BMC Genomics*, 11 (2010), 364.
- Wang, R.S., Hu, X.Y., Gu, W.J., Hu, Z., & Wei, B. (2013). Tooth loss and risk of head and neck cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 8(8):e71122.
- Wang, Y., Kang, W., Shang, L., Song, A., & Ge, S. (2020). N-WASP knockdown upregulates inflammatory cytokines expression in human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol*, 110:104605.
- Weninger, W., Biro, M., & Jain, R. (2014). Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol*, 14 (4): 232-46.
- Wennstrom, J.L. (1996). Mucogingival therapy. *Ann Periodontol*,1: 671-701.
- Westerberg, L.S., Meelu, P., Baptista, M., Eston, M.A., Adamovich, D.A., Cotta-de-Almeida, V., Seed, B., Rosen, M.K., Vandenberghe, P., Thrasher, A.J., Klein, C., Alt, F.W., Snapper, S.B. (2010). Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med*, 207(6):1145–1152.
- Wickramarachchi, D.C., Theofilopoulos, A.N., & Kono, D.H. (2010). Immune Pathology Associated with Altered Actin Cytoskeleton Regulation. *Autoimmunity*, 43(1): 64–75.
- Worthylake R.A., & Burridge K. (2001). Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol*, 13: 569–577.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Yarong, Wang., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall,J., & Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*, 64: 7022–7029.
- Xing, L., Meng, G., Chen, T., Zhang, X., Bai, D., & Xu, H. Crosstalk between RNA-Binding Proteins and Immune Microenvironment Revealed Two RBP

- Regulatory Patterns with Distinct Immunophenotypes in Periodontitis. *Journal of Immunology Research*, 5588429: 17.
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*, 17: 559–564.
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion, *Biochim Biophys Acta*, 1773 (5),642–652.
- Yang, B., Pang, X., Li, Z., Chen, Z., & Wang, Y. (2021). Immunomodulation in the Treatment of Periodontitis: Progress and Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 781378.
- Yao, Y., Nellaker, C., & Karlsson, H. (2006). Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 5, 311–316.
- Yapıcı, S. & Kılıc, S.S. (2008). Wiskott Aldrich Sendromu (Wiskott Aldrich Syndrome). *Güncel Pediatri*, 6: 119-23
- Yarar, D., To, W., Abo, A., & Welch, M.D. (1999). The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 9(10),555–558.
- Yılmaz, M., Özmen, S., Kinolu, N.G., & Karaduman, B. (2019) Determination of periodontal, behavioral and systemic conditions of patients with gingivitis and mild-to-moderate periodontitis. *Yeditepe J Dent*, 16(1): 37-42.
- Yucel-Lindberg, T., & Båge, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*, 5 (15):e7.
- Zhang, H., Schaff, U.Y., Green, C.E., Chen, H., Sarantos, M.R., Hu, Y., Wara, D., Simon, S.I., & Lowell, C.A. (2006). Impaired integrin-dependent function in Wiskott–Aldrich syndrome protein-deficient murine and human neutrophils. *Immunity*, 25:285–295.
- Zhang, X., Han, N, Li, G., Yang, H., Cao, Y., Fan Z., & Zhang, F. (2018). Local icariin application enhanced periodontal tissue regeneration and relieved local inflammation in a minipig model of periodontitis. *International Journal of Oral Science* 10: 19.
- Zhu, Q., Watanabe, C., Liu, T., Hollenbaugh, D., Blaese, R.M., Kanner, S.B., Aruffo, A., & Ochs, H.D. (1997). Wiskott Aldrich Syndrome/X-linked thrombocytopeniae: WASP mutations, protein expressions and phenotype. *Blood*, 90: 2680-9.

ÖZGEÇMİŞ

