

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLESTEROL TAŞIYICI ABCG1'İN İNSAN
MAKROFAJLARINDAKİ ROLÜ**

**DUYGU ÜNÜVAR PURCU
ORCID: 0000-0001-6139-2042**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Doktora Programı**

DOKTORA TEZİ

**İZMİR
HAZİRAN 2022**

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970074

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLESTEROL TAŞIYICI ABCG1'İN İNSAN
MAKROFAJLARINDAKİ ROLÜ**

**DUYGU ÜNÜVAR PURCU
ORCID: 0000-0001-6139-2042**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI**

DOKTORA TEZİ

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. DUYGU SAĞ
ORCID: 0000-0003-1690-6846**

Bu araştırma TÜBİTAK 2236 Co-Funded Brain Circulation Scheme programı tarafından 115C074 sayı ile; Türkiye Bilimler Akademisi GEBİP programı; ve Bilim Akademisi BAGEP programı tarafından desteklenmiştir.

**İZMİR
HAZİRAN 2022**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Kolesterol Taşıyıcı ABCG1’in İnsan Makrofajlarındaki Rolü” başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Duygu Ünüvar Purcu

08/06/2022

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince verdiği bilimsel desteğin yanında manevi olarak da beni her zaman destekleyen ve cesaretlendiren, hayata bakışı ile ilham veren, yolumu aydınlatan çok değerli danışman hocam **Doç. Dr. Duygu Sağ'a**,

Tez çalışmalarım sırasında bilgi birikimlerini paylaşan, değerli yorumları ile çalışmalarımı yönlendiren, tez izleme komitemdeki sayın hocalarım **Prof. Dr. Neşe Atabey'e ve Dr. Öğr. Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez'e**; bir makalenin nasıl değerlendirileceğini anlatan, farklı bakış açısı ile çalışmalarımıza her zaman destek olan **Dr. Öğr. Üyesi Gerhard Wingender'e**,

Doktora eğitimim süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen **Moleküler Tıp Anabilim Dalındaki saygıdeğer hocalarıma ve sevgili arkadaşlarıma**; her karışık durumun üstesinden gelen, tüm sorularıma güler yüzle yanıt veren ve yardımcı olan **Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrenci işleri çalışanlarına**; Deneyisel çalışmalarımı yürüttüğüm **İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'ne**; Projemizin gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan **TÜBİTAK'a, Türkiye Bilimler Akademisi'ne ve Bilim Akademisi'ne**,

Sağ Kanser İmmünolojisi lab'da birlikte çalıştığım, dostlukları ve sevgileri ile çalışma arkadaşının çok ötesinde artık kız kardeşlerim olan **Aslı Korkmaz, Sinem Günalp, Meltem Altunay ve Ayşenur Öner'e**; her zaman desteklerini hissettiğim, **Gizem Eylem Başlar, Derya Göksu Helvacı, Yonca Erdal ve Resul Özbilgiç'e**; Western blot deneylerindeki destekleri için **Dr. Zehra Tavşan** ve Wingender lab'daki arkadaşlarıma; her olayın pozitif yönünü ve katkısını bulan, dünyayı başka bir gözle görmemi sağlayan, dostum **Dr. Gülçin Çakan Akdoğan'a**,

Bu uzun yolda sonsuz sevgi ve şefkati ile bana her zaman inanan ve destek olan, canım annem **Sevilay Uyanık** ve canım kardeşim **Murat Ali Ünüvar'a**; disiplini ve çalışma azmini her zaman örnek aldığım canım babam **Osman Nuri Ünüvar'a**; sonsuz sevgisi, sabrı, inanılmaz sorun çözme kabiliyeti, ve esprileri ile hayatımı güzelleştiren, biricik eşim **Savaş Purcu'ya**; bana sevgilerin en güzelini yaşatan, bana beni yeniden öğreten, her gün kaç sayfa yazdığımı kontrol ederek tezimin ilerleyişini yakından takip eden, ödev arkadaşım, neşe kaynağım, canım oğlum **Alper Purcu'ya**,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum....

Duygu Ünüvar Purcu

Haziran, 2022

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR.....	xv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER (LİTERATÜR BİLGİSİ).....	3
2.1. Makrofajlar	3
2.2. Makrofaj Polarizasyonu.....	5
2.3. ABC Taşıyıcılar Ailesi	8
2.3.1. ABCG Taşıyıcılar Alt Ailesi.....	9
2.4. ABCG1	10
2.4.1. ABCG1'in Yapısı ve Düzenlenmesi	10
2.4.2. ABCG1 ve Makrofajlar.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Araştırmanın Tipi.....	14
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı	14
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grupları	15
3.4. Çalışma Materyali.....	15
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	15
3.6. Veri Toplama Araçları	16
3.6.1. Deney Akış Şemaları.....	16
3.6.1.1. Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	16
3.6.1.2. ABCG1 Ekspresyonunun siRNA ile Baskılanmış Makrofajların Polarizasyonu	17
3.6.1.3. Tip 2 Diyabet ve Kontrol Grubu örneklerinin Makrofaj Polarizasyonu	18
3.6.2. Çalışma Sırasında Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	19
3.6.3. Hücre Kültürü.....	23
3.6.3.1. Buffy Coat'tan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu.....	23
3.6.3.2. Periferik Kan'dan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu.....	23
3.6.3.3. Mononükleer Hücrelerden Monositlerin İzole Edilmesi	24

3.6.3.4. Monositlerden Makrofaj Üretilmesi	24
3.6.4. Makrofaj Polarizasyonu	26
3.6.5. M1/M2 Makrofaj Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarının RT-qPCR ile Belirlenmesi	26
3.6.5.1. RNA İzolasyonu	26
3.6.5.2. cDNA Sentezi	28
3.6.5.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)	28
3.6.6. Akış Sitometrisi	29
3.6.7. ELISA	30
3.6.8. siRNA Aracılıklı Gen Ekspresyonu Baskılanması	31
3.6.9. Western Blot Yöntemi	32
3.6.9.1. Protein İzolasyonu	32
3.6.9.2. Proteinlerin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
3.6.9.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	33
3.6.9.3.1. SDS-Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması	34
3.6.9.3.2. SDS-Poliakrilamid Jellerin Yürütülmesi	35
3.6.9.4. Proteinlerin Membrana Transferi	35
3.6.9.5. Membranın Bloklanması, Primer ve Sekonder Antikorların Bağlanması ve Kemilüminesans Görüntüleme	36
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	37
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları	37
3.9. Etik Kurul Onayı	37
4. BULGULAR	38
4.1. M1, M2a ve M2c Makrofajlarda Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	38
4.1.1. M1 Makrofajlarda Uyarım Süresinin, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	38
4.1.2. M2a Makrofajlarda Uyarım Süresinin, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	42
4.1.3. M2c Makrofajlarda Uyarım Süresinin, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	45
4.2. M1, M2a ve M2c Makrofajlarda Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Yüzey Belirteçlerinin Protein Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler	47
4.3. M1, M2a ve M2c Makrofajlarda Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Sitokin Üretim Düzeylerindeki Değişimler	52
4.4. Makrofajlarda siRNA ile ABCG1 Ekspresyonunun Baskılanması	55

4.4.1. siRNA Optimizasyon Çalışmaları	55
4.4.2. ABCG1 Ekspresyonunun Baskılanmasının Protein Düzeyinde Gösterilmesi..	57
4.4.3. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda Polarizasyon	57
4.4.3.1. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda, M1 Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim.....	58
4.4.3.2. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda, M2a Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim.....	60
4.4.3.3. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda, M2c Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim.....	63
4.5. Tip 2 Diyabetli Hastalarda Makrofaj Polarizasyonu	64
4.5.1. Tip 2 Diyabetli Hastaların Makrofajlarında, M1 Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim	66
4.5.2. Tip 2 Diyabetli Hastaların Makrofajlarında, M2a Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim.....	68
4.5.3. Tip 2 Diyabetli Hastaların Makrofajlarında, M2c Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim.....	71
4.6. ABCG1 Ekspresyonu ile M1/M2 Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasındaki Korelasyonun Karşılaştırılması	72
4.6.1. Kontrol grubunda, ABCG1 Ekspresyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasındaki Korelasyonun Karşılaştırılması.....	73
4.6.2. Diyabet grubunda, ABCG1 Ekspresyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasındaki Korelasyonun Karşılaştırılması.....	78
5. TARTIŞMA.....	84
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
7. KAYNAKLAR	92
8. EKLER	99
EK 1 ETİK KURUL ONAYI	99
EK 2 ARBİS ÖZGEÇMİŞ.....	103

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Projede Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Kitlerin Listesi	19
Tablo 2.	Projede Kullanılan Cihazların Listesi	21
Tablo 3.	Makrofaj Polarizasyonu için Stimulanlar	26
Tablo 4.	Yükleme Tamponu (Laemni Tamponu)	33
Tablo 5.	%8'lik Ayırıcı Jel	34
Tablo 6.	%5 Paketleyici Jel.....	34
Tablo 7.	10X Yürütme Tamponu	35
Tablo 8.	10X Transfer Tamponu.....	36
Tablo 9.	TBS-T	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Doku yerleşik makrofajlar, embriyonik dönemde yolk kesesi ya da fetal karaciğerden kaynaklanabileceği gibi, erişkin dönemde kemik iliği kaynaklı da olabilir (21'den düzenlenmiştir). 3
- Şekil 2.** Farklı doku ve organlardaki, fonksiyonel ve morfolojik olarak özelleşmiş makrofajların isimleri (26'dan düzenlenmiştir). 4
- Şekil 3.** Makrofaj Polarizasyonu. M1 ve M2 makrofajlarının görevleri. M2 makrofajlarının alt tipleri; M2a, M2b ve M2c makrofajlar (29'dan düzenlenmiştir).. 5
- Şekil 4.** Patolojik süreçlerde makrofaj polarizasyonu ve plastisitenin şematik gösterimi (4'ten düzenlenmiştir). 7
- Şekil 5.** ABC taşıyıcı ailesinin üyeleri, ATP hidrolizi ile sağlanan enerjiyi kullanarak çeşitli lipofilik substratları taşıır (50'den düzenlenmiştir). 8
- Şekil 6.** Bir ABCG yarı taşıyıcının yapısı. Tipik bir ABCG yarı taşıyıcı, tek bir polipeptidin amino ucunda ABC alanı (NBD) ardından, karboksi ucunda altı transmembran heliks (TMD) içerir. Fonksiyonel bir taşıyıcının oluşması için, iki yarı taşıyıcı bir araya gelerek on iki transmembran heliksten oluşan bir homodimer ya da heterodimer oluşturur (12'den düzenlenmiştir). 9
- Şekil 7.** ABCG1'in yapısı. Polipeptid zincirinin amino ucunda yer alan NBD, ABC bölgesini içerir. Karboksi ucunda ise membranı geçen 6 α -heliksten oluşan TMD bulunur. Bir yarı taşıyıcı olan ABCG1, homodimer ya da heterodimer oluşturarak fonksiyonel hale geçer (67'den düzenlenmiştir). 11
- Şekil 8.** Tez projesinde gerçekleştirilen çalışmaların zaman çizelgesi. 14
- Şekil 9.** Makrofaj polarizasyonunda kullanılacak uygun uyarım süresinin belirlenmesi çalışmaları deney akış şeması. 16
- Şekil 10.** ABCG1 ekspresyonunun siRNA ile baskılanmış makrofajların polarizasyonu ve polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonlarının belirlenmesi çalışmaları deney akış şeması. 17
- Şekil 11.** Tip 2 diyabetli hastalarda ve kontrol grubunda makrofaj polarizasyonu ve polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonlarının belirlenmesi çalışmaları deney akış şeması. 18
- Şekil 12.** İnsan monositlerinden türetilmiş makrofajlar. 25
- Şekil 13.** Uyarım zamanına göre CXCL9 gen ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. 39
- Şekil 14.** Uyarım zamanına göre CXCL10 gen ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. 39
- Şekil 15.** Uyarım zamanına göre TNF gen ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. 40

Şekil 16. Uyarım zamanına göre IL-1 β gen ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	40
Şekil 17. Uyarım zamanına göre IL-12 gen ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	41
Şekil 18. Uyarım zamanına göre IDO1 gen ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	41
Şekil 19. Uyarım zamanına göre MRC1 gen ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	42
Şekil 20. Uyarım zamanına göre TGM2 gen ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	43
Şekil 21. Uyarım zamanına göre CCL17 gen ekspresyonundaki değişim (2 ^{-$\Delta\Delta$CT}). IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA	43
Şekil 22. Uyarım zamanına göre CCL22 gen ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı	44
Şekil 23. Uyarım zamanına göre IL-10 gen ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	44
Şekil 24. Uyarım zamanına göre IL-10 gen ekspresyonundaki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	45
Şekil 25. Uyarım zamanına göre IL-10 gen ekspresyonundaki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	46
Şekil 26. Uyarım zamanına göre TGF β gen ekspresyonundaki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	46
Şekil 27. Zamanla CD86 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	48
Şekil 28. Zamanla CD64 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	49
Şekil 29. Zamanla HLA-DR yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	49

Şekil 30.	Zamanla CD200R yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	50
Şekil 31.	Zamanla CD206 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	50
Şekil 32.	Zamanla CD163 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	51
Şekil 33.	Zamanla TNF sitokin üretimindeki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	52
Şekil 34.	Zamanla IL12p70 sitokin üretimindeki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	53
Şekil 35.	Zamanla IL1 β sitokin üretimindeki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	54
Şekil 36.	Zamanla IL-10 sitokin üretimindeki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	54
Şekil 37.	Zamanla TGF β sitokin üretimindeki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.	55
Şekil 38.	Primer insan makrofajlarında ABCG1 ekspresyonu, ABCG1 siRNA grubunda kontrol siRNA grubuna göre baskılanmıştır.	57
Şekil 39.	ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CXCL9 gen ekspresyonundaki değişim.	58
Şekil 40.	ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CXCL10 gen ekspresyonundaki değişim.	59
Şekil 41.	ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), TNF gen ekspresyonundaki değişim.	59
Şekil 42.	ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), IDO1 gen ekspresyonundaki değişim.	60
Şekil 43.	ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), MRC1 gen ekspresyonundaki değişim.	61

Şekil 44. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), TGM2 gen ekspresyonundaki değişim.....	61
Şekil 45. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CCL17 gen ekspresyonundaki değişim.....	62
Şekil 46. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CCL22 gen ekspresyonundaki değişim.....	62
Şekil 47. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2c (IL-10 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), IL-10 gen ekspresyonundaki değişim.....	63
Şekil 48. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2c (IL-10 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CD163 gen ekspresyonundaki değişim.....	64
Şekil 49. Tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.	65
Şekil 50. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CXCL9 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	66
Şekil 51. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CXCL10 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.....	67
Şekil 52. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, TNF gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	67
Şekil 53. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, IDO1 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	68
Şekil 54. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, MRC1 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	69
Şekil 55. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, TGM2 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	69
Şekil 56. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CCL17 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	70
Şekil 57. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CCL22 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	70

Şekil 58. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, IL-10 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	71
Şekil 59. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CD163 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.	72
Şekil 60. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL9 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	73
Şekil 61. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	74
Şekil 62. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TNF ekspresyonu arasındaki korelasyon.	74
Şekil 63. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IDO1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	75
Şekil 64. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile MRC1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	75
Şekil 65. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TGM2 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	76
Şekil 66. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL17 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	76
Şekil 67. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL22 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	77
Şekil 68. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IL10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	77
Şekil 69. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CD163 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	78
Şekil 70. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL9 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	79
Şekil 71. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	79

Şekil 72. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TNF ekspresyonu arasındaki korelasyon.	80
Şekil 73. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IDO1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	80
Şekil 74. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile MRC1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	81
Şekil 75. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TGM2 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	81
Şekil 76. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL17 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	82
Şekil 77. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL22 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	82
Şekil 78. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IL-10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	83
Şekil 79. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CD163 ekspresyonu arasındaki korelasyon.	83

KISALTMALAR

ABC: ATP Bağlayıcı Kaset

ABCA: ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı A1

ABCG1:ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı G1

APS: Amonyumpersülfat

ATP: Adenozin Trifosfat

BCA: Bi Sinkronik Asit

BSA: Sığır Serum Albumini

FBS: Fötal Sığır Serum

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

LPS: Lipopolisakkarit

LXR: Karaciğer X Reseptörü

NBD: Nükleotid Baęlanma Alanı

TMD: Transmembran Alan

PBS : Fosfat Tamponu

SDS-PAGE : Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

siRNA: small interfering RNA

TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletildiamid

qPCR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-qPCR: Reverse-Transkriptaz-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

KOLESTEROL TAŞIYICI ABCG1'İN İNSAN MAKROFAJLARINDAKİ ROLÜ

Doktora Tezi

Duygu ÜNÜVAR PURCU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

ABCG1, ters kolesterol transportu yolu ile hücredeki kolesterolün, HDL parçacıklarına akmasına aracılık eden bir taşıyıcı proteindir. Farelerde ABCG1 ekspresyonu baskılanmış tümörle ilişkili makrofajların, tümörü destekleyici M2 fenotipinden tümörle savaşan M1 fenotipine doğru içsel bir eğilim gösterdiği ve *in-vivo*'da mesane kanseri büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. ABCG1 ekspresyonunun, makrofaj polarizasyonunun yönlendirilmesi üzerindeki etkisi, onu kanser tedavisinde cazip bir hedef molekül haline getirmektedir. Amacımız; ABCG1 ekspresyonunun baskılanmasının, insan makrofaj polarizasyonu üzerine etkilerini araştırmaktır. Tip 2 diyabet hastalarında, makrofajların ABCG1 ekspresyonunun düşük olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle diyabet hastalarından elde edilen makrofajları, ABCG1 ekspresyonunun doğal olarak susturulduğu modeller olarak ele aldık.

İn-vitro'da makrofaj polarizasyonunda kullanılan stimülanların uygulama süresi, polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarını dramatik bir şekilde değiştirmektedir, ancak literatürde bu konuda bir fikir birliğinin olmaması, çalışmaların sonuçlarını ve doğruluğunu olumsuz etkilemektedir. Çalışmamızda kullanacağımız uyarım süresinin belirlenmesi ve makrofaj polarizasyonunun doğrulanması için makrofajlar; stimülanlarla altı farklı zamanda uyarıldı ve M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonundaki değişim RT-qPCR, akış sitometrisi ve

ELISA ile belirlendi. Ardından siRNA kullanılarak ABCG1 ekspresyonu baskılanmış primer insan makrofajları, tip 2 diyabet hastalarından elde edilmiş ABCG1 ekspresyonu doğal olarak düşük olan makrofajlar ve tüm kontrol grupları dört saat süre ile polarize edildi. Polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonundaki değişim RT-qPCR ile belirlendi.

Çalışmamız makrofaj polarizasyonunda kullanılan belirteçler için uygun uyarım süresinin belirlenmesinde ve belirteç seçiminde, araştırmacılara yol gösterici niteliktedir ve literatürdeki büyük bir boşluğu doldurmaktadır. ABCG1 ekspresyonu siRNA ile baskılanmış, M1 makrofajlarda CXCL9, CXCL10, TNF ve IDO1 ekspresyonu artarken, M2 makrofajlarda MRC1 ve CCL22 ekspresyonu azalmaktadır. Diyabet hastalarından elde edilmiş ve M1 makrofajlarda CXCL10 ve IDO1 ekspresyonu artarken, M2 makrofajlarda MRC1, TGM2, CCL17, CCL22, IL-10 ve CD163 ekspresyonları azalmaktadır. Ayrıca, insan makrofajlarında ABCG1 ekspresyonu ile M1 belirteçlerinin ekspresyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Sonuçlarımız, ABCG1 eksikliğinin, insan makrofajlarında da M1 polarizasyonuna eğilim yarattığını göstermektedir. Bulgularımız ABCG1'in, makrofajların önemli rol aldığı çeşitli hastalıkların tedavisi için makrofaj polarizasyonunu modüle etmede yeni bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: ABCG1, makrofaj polarizasyonu, M1/M2 makrofajlar, uyarım süresi

Tezin sayfa adedi: 126

Danışman: Doç. Dr. Duygu SAĞ

THE ROLE OF THE CHOLESTEROL TRANSPORTER ABCG1 IN HUMAN MACROPHAGES

Doctorate Thesis

Duygu ÜNÜVAR PURCU

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

ABCG1 mediates the influx of cholesterol in the cell to HDL particles via reverse cholesterol transport. Tumor-associated macrophages with suppressed ABCG1 expression in mice have been shown to have an intrinsic trend from the tumor-promoting M2 to the tumor-fighting M1 phenotype and suppress bladder cancer growth *in vivo*. The effect of ABCG1 expression on macrophage polarization makes it an attractive target in cancer therapy. Hence, our aim is to investigate the effects of suppressed ABCG1 expression on human macrophage polarization. It has been shown that macrophages have low ABCG1 expression in patients with type-2 diabetes. Therefore, we considered macrophages obtained from diabetic patients as models in which ABCG1 expression is naturally silenced.

The application time of the stimulants used in macrophage polarization *in-vitro* dramatically changes the expressions of polarization markers, and the lack of consensus in the literature negatively affects the results and accuracy of the studies. To determine the stimulation time used in this study and to determine the macrophage phenotypes; primary macrophages were polarized at six different times and the change in expression of M1/M2 polarization markers was determined by RT-qPCR, flow cytometry, and ELISA. Then, primary macrophages with suppressed ABCG1 expression using siRNA, macrophages with naturally low expression of ABCG1 obtained from type-2-diabetes patients and all control groups were polarized for four

hours. The change in gene expressions of polarization markers were determined by RT-qPCR.

Our study provides a guide for researchers in determining the appropriate stimulation time and selection of markers used in macrophage polarization and fills a large gap in the literature. While the expression of CXCL9, CXCL10, TNF and IDO1 was increased in ABCG1 suppressed M1 macrophages, MRC1 and CCL22 expression were decreased in ABCG1 suppressed M2 macrophages. Furthermore, while the expression of CXCL10 and IDO1 is increased in M1 macrophages obtained from diabetic patients, the expressions of MRC1, TGM2, CCL17, CCL22, IL-10 and CD163 are decreased in M2 macrophages. In addition, we showed that there is a negative correlation between ABCG1 expression and the expression of M1 markers in human macrophages. Therefore, according to our results, ABCG1 deficiency predisposes human macrophages to M1 polarization. Our findings suggest that ABCG1 may be a novel target for modulating macrophage polarization for the treatment of various diseases in which macrophages play an important role.

Keywords: ABCG1, macrophage polarization, M1/M2 macrophages, stimulation time

Page Number: 126

Advisor: Doç. Dr. Duygu SAĞ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Makrofajlar, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkta önemli görevleri olan, uzmanlaşmış fagositik hücrelerdir. Plastisite ve çeşitliliklerinin çok yüksek olması ile karakterize edilen bu hücreler, çevrelerinden aldıkları sinyallere yanıt olarak, farklı fonksiyonel özellikler sergileyen farklı aktivasyon durumlarına geçerler (1–3). Makrofaj polarizasyonu olarak adlandırılan bu durum, organizmanın normal işleyişinde çok önemli role sahiptir. Ancak makrofaj polarizasyonunun dengesinin bozulması, bir çok patolojik durumu da beraberinde getirmektedir (3,4). Klasik olarak aktive edilmiş ve M1 polarizasyonu gösteren makrofajlar inflamatuvar özellikteyken, alternatif olarak aktive edilmiş M2 makrofajlar anti inflamatuvar özelliktedir (4–6).

ABCG1, ters kolesterol transportu yolu ile hücre içindeki fazla kolesterolün, HDL parçalarına aktararak hücre dışına atılmasını sağlar (7,8). Ayrıca hücre içine kolesterol taşınmasında da görev alır (9,10). ABCG1 kolesterol homeostazının sürdürülmesinde çok önemli rol oynayan bir kolesterol taşıyıcısı olduğu gibi (11,12), makrofajların immün yanıtlarının düzenlenmesinde de rol alır (13–16). ABCG1^{-/-} farelerde, tümörle ilişkili makrofajların fenotipinin, tümörü destekleyen M2'den tümörle savaşan M1'e dönüştüğü ve tümör büyümesinin baskılandığı gösterilmiştir. Fareler üzerinde gerçekleştirilen bu çalışma, ABCG1'in makrofaj polarizasyonunu yönlendirdiğini göstermiştir ve makrofajlardaki ABCG1'in kanser immünoterapisinde yeni bir moleküler hedef olabileceğini önermektedir (16). ABCG1'in kanser tedavisinde bir hedef molekül olarak belirlenebilmesi için, ABCG1'in primer insan makrofajlarında da farelerle aynı etkiyi gösterip göstermediğinin araştırılması gerekmektedir. Tip 2 diyabet hastalarının makrofajlarında ABCG1 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (17). Tip 2 diyabet hastalarında ABCG1 ekspresyonunun doğal olarak az olması nedeni ile, bu hasta grubu makrofajlarda ABCG1'in susturulduğu insan modeli olarak çalışılabilir.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, tez projesindeki amacımız; ABCG1 eksikliğinin, insan makrofajlarının polarizasyonundaki rolünü araştırmaktır.

Bu çalışmadaki hipotezimiz; “İnsanlarda ABCG1 ekspresyonundaki düşüş, farelerdeki benzer şekilde, makrofajlarda M1 polarizasyonuna doğru bir eğilime neden olur”.

Projemizi gerçekleştirmek için planladığımız hedeflerimiz řu şekildedir:

- Makrofaj polarizasyonunda kullanılan stimölanların en etkin olduğu sürenin belirlenmesi ve makrofaj polarizasyonunun doğrulanması için, 6 ayrı uyarım süresinde makrofaj polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarının incelenmesi ve en uygun uyarım süresinin belirlenmesi.

- Primer insan makrofajlarında, ABCG1 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajlarda, 4 saatlik uyarım sonrası polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarının incelenmesi.

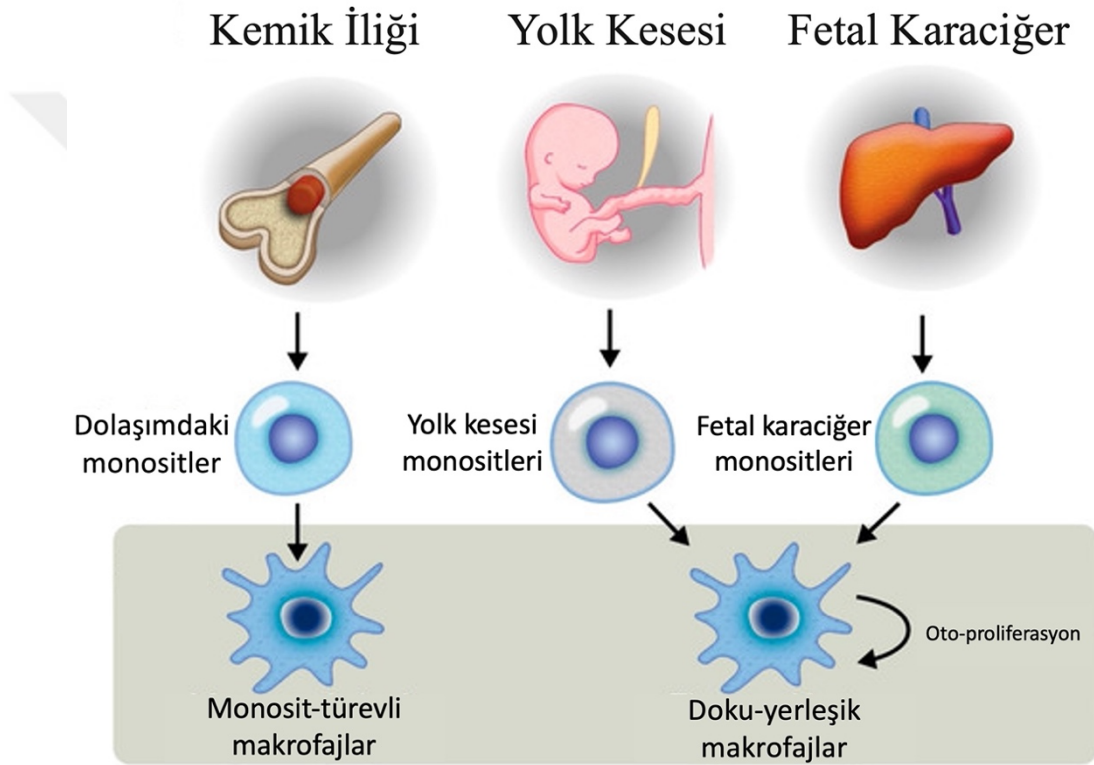
- Tip 2 diyabet hastalarında ve sağlıklı kontrollerde, makrofaj polarizasyonu sonrası, polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarının karşılaştırılması.

- Tip 2 diyabet hastalarında ve sağlıklı kontrollerde, ABCG1 ekspresyonu ile M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonu arasındaki korelasyonun araştırılması.

2. GENEL BİLGİLER (LİTERATÜR BİLGİSİ)

2.1. Makrofajlar

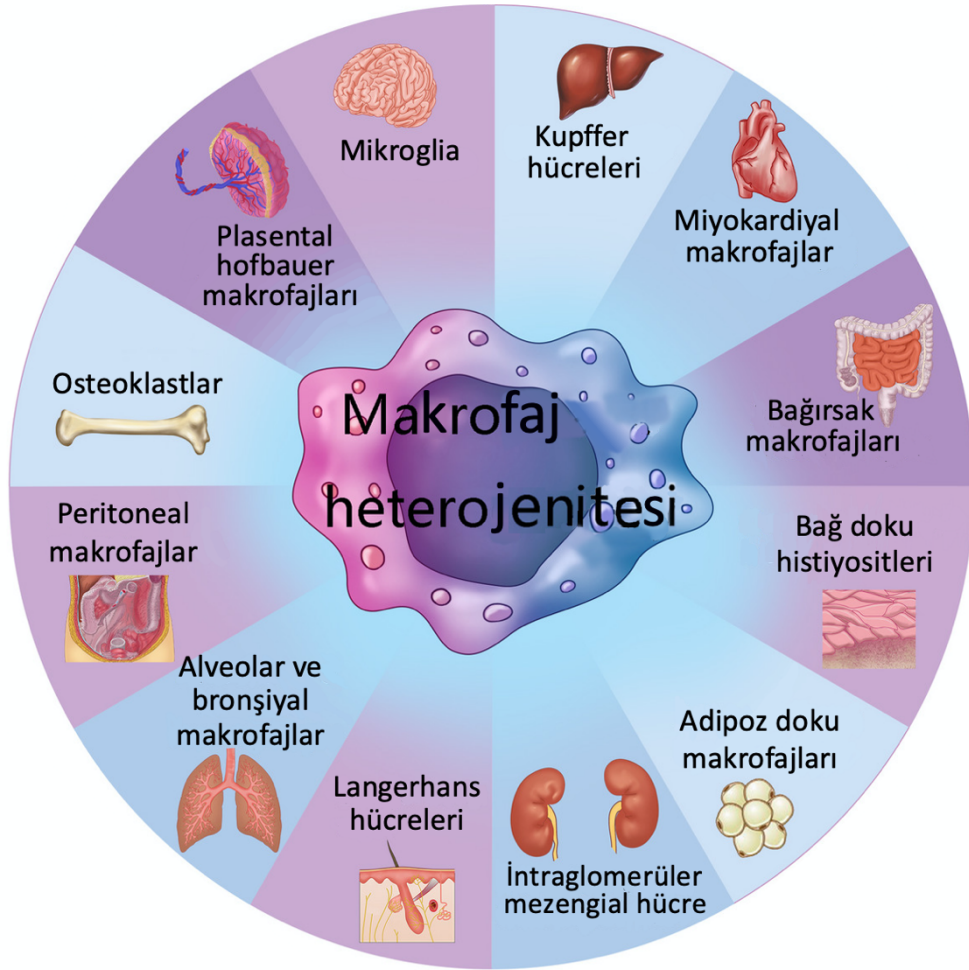
Hedeflerini belirleme ve yok etme kabiliyetine sahip, özelleşmiş fagositler olan makrofajlar, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkta önemli rollere sahip immün hücrelerdir. İnflamasyon ve konak savunmasındaki önemli görevlerinin yanı sıra makrofajlar, ontogeneizde doku yeniden şekillenmesi, metabolizmanın düzenlenmesi ve hasarlı dokunun onarımı gibi hayati homeostatik rollere de sahiptir (1–3,18).



Şekil 1. Doku yerleşik makrofajlar, embriyonik dönemde yolk kesesi ya da fetal karaciğerden kaynaklanabileceği gibi, erişkin dönemde kemik iliği kaynaklı da olabilir (21’den düzenlenmiştir).

Çeşitliliği ve heterojenliği yüksek bir popülasyon olan makrofajlar, dokularda yerleşik olarak bulunur ya da kan monositlerinin dokulara sızarak makrofajlara farklılaşması ile oluşur (19,20). Monositler myeloid kökenlidir ve kemik iliğinde gelişip kan dolaşımına geçerler. Yakın zamana kadar dokularda bulunan tüm makrofajların kemik iliği kökenli olduğu düşünülüyordu, ancak son kanıtlar dokularda yerleşik bulunan makrofajların, monositlerden türemiş-kemik iliği kökenli olabileceği gibi, embriyonik dönemde yolk kesesinden ya da fetal karaciğerden de kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Şekil 1) (20–23). Embriyonik kökenli doku yerleşik

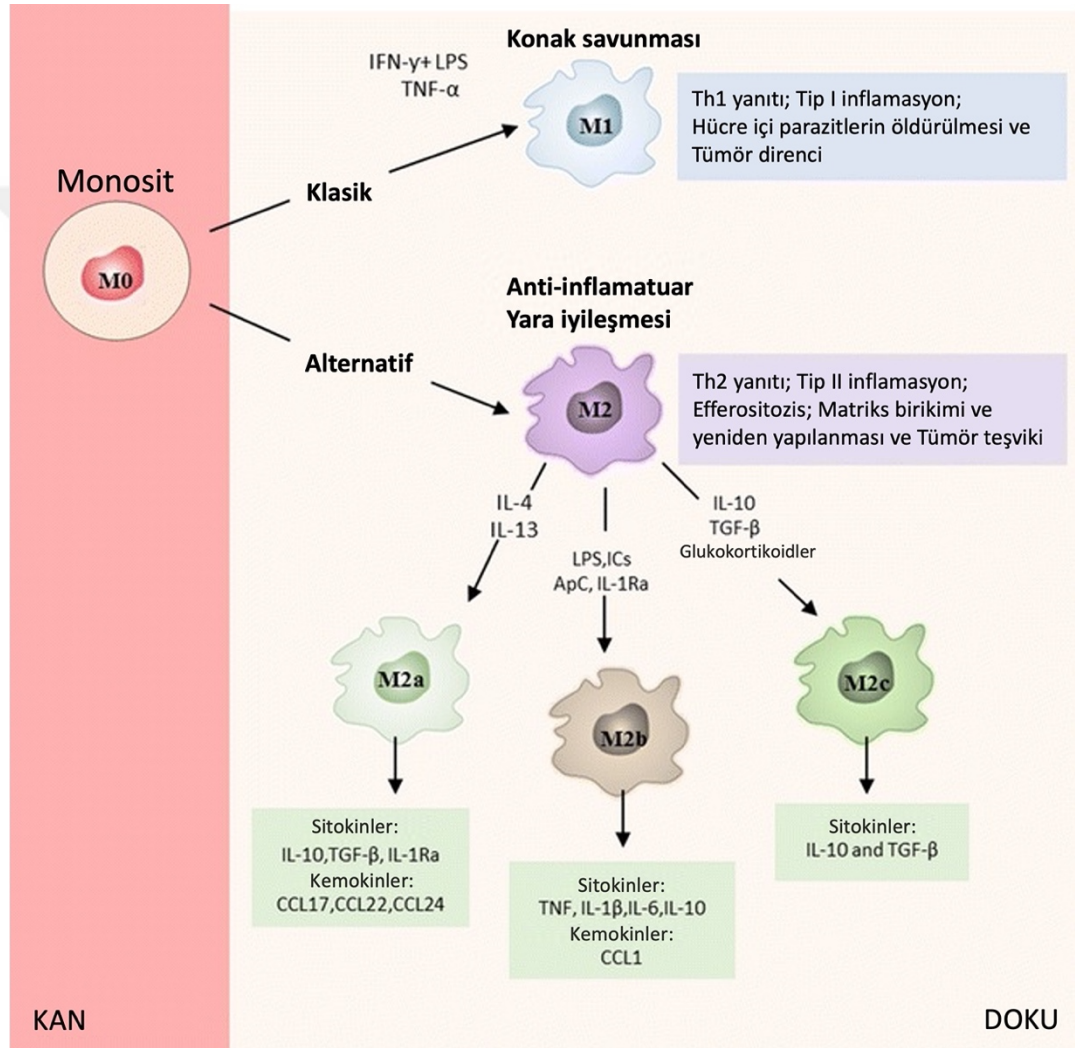
makrofajların kendi kendini yenileme özelliği vardır, ayrıca erişkin dönemde de dokulardaki makrofajlar, yaralanma, enfeksiyon ya da inflamasyonu takiben, kemik iliği kaynaklı monositlerden türemiş makrofajlar ile yenilenir (23). Makrofajlar fonksiyonel uzmanlaşma için inanılmaz bir kapasiteye sahiptir, yerleşik bulundukları dokulardaki ve organlardaki homeostatik fizyolojik koşullar altında, görevlerine göre özelleşirler ve belirgin morfolojik özellikler kazanırlar; örneğin karaciğerde kupfer hücreleri, beyinde mikrogliya hücreleri, deride langerhans hücreleri, akciğerde alveolar makrofajlar ve kemikte osteoklastlar (Şekil 2) (21,24–26).



Şekil 2. Farklı doku ve organlardaki, fonksiyonel ve morfolojik olarak özelleşmiş makrofajların isimleri (26'dan düzenlenmiştir).

2.2. Makrofaj Polarizasyonu

En karakteristik özellikleri plastisite ve çeşitlilik olan makrofajlar (4,27), geniş bir spektrumda değişen çevresel sinyallere yanıt olarak farklı aktivasyon durumlarına geçerler (28). Th1/Th2 paradigmasının bir yansıması olarak makrofajlar, klasik olarak aktive edilmiş M1 veya alternatif olarak aktive edilmiş M2 fenotipine polarize olabilirler (Şekil 3) (4–6,29).



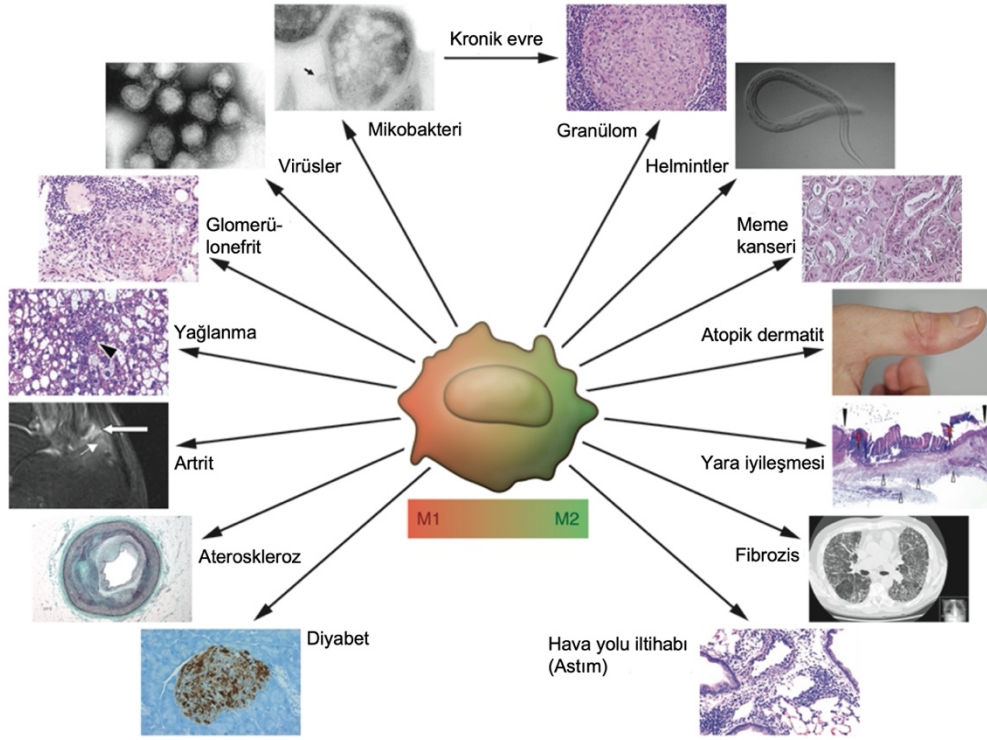
Şekil 3. Makrofaj Polarizasyonu. M1 ve M2 makrofajlarının görevleri. M2 makrofajlarının alt tipleri; M2a, M2b ve M2c makrofajlar (29'dan düzenlenmiştir).

M1 makrofajlar, anti-tümör ve anti-mikrobiyal aktiviteler sergileyen, inflamatuvar hücrelerdir; pro-inflamatuvar sitokinlerin ve reaktif nitrojen/oksijen ara ürünlerinin üretiminde görev almalarının yanı sıra Th1 yanıtını da desteklerler (30,31). M1 aktivasyonu, tek başına IFN γ , ya da IFN γ 'nın LPS veya TNF ile kombinasyonu tarafından indüklenir (6,32). M1 makrofajları, TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, ve IL-23 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra CXCL9 ve CXCL10 gibi kemokinleri de salgılar. Ayrıca M1 makrofajlar: MHC sınıf II grubundan insanda HLA-DR; kostimülatör moleküller CD80 ve CD86; M2 sitokin sinyalizasyonunun baskılayıcısı olan SOCS3 ve triptofanı katabolize eden enzim IDO1 eksprese eder (6,33–36).

M2 makrofajlar, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve doku yeniden şekillenmesinde rol oynayan anti-inflamatuvar hücrelerdir (3,37); M2a, M2b, M2c ve M2d alt tiplerine ayrılabilirler (34,38,39). M2a makrofajlar, IL-4 ve/veya IL-13 tarafından indüklenebilir ve anti-inflamatuvar faaliyetlerde ve doku yeniden şekillenmesinde görev alır; CD206 (MRC1), CD200R, dekoy reseptör IL-1RII, TGM2 (transglutaminaz 2) ve kemokinler CCL17, CCL22 ve CCL24 eksprese eder. M2b makrofajlar, immün kompleksler ve TLR agonistleri veya IL-1 reseptör ligandları tarafından indüklenebilir ve immünregülasyon ve Th2 aktivasyonunda görev alır; IL-6, IL-10, IL-1 β ve TNF eksprese eder (32,39,40). M2c makrofajlar, IL-10, glukokortikoidler veya TGF β tarafından indüklenebilir ve anti-inflamatuvar aktivitelerde yer alır; CD163, IL-10 ve TGF β eksprese eder (32,41). Son olarak, M2d makrofajlar, TLR agonistleri veya adenosin reseptör aktivasyonu tarafından indüklenir ve anjiyogenez ve tümör ilerlemesinde rol alır; IL-10, IL12, TNF ve TGF β eksprese eder (42,43).

Makrofaj polarizasyon belirteçlerinin ifadesi, fareler ve insanlar arasında bazı önemli farklılıklar göstermektedir. Örneğin, fare M1 makrofajları, L-arginin metabolizmasında yer alan indüklenebilir NO sentazı (iNOS) eksprese ederken, insan M1 makrofajları bunu yapmaz (44). Ayrıca, IL-4 ve/veya IL-13 tarafından indüklenen fare M2a makrofajları, Arg1, Ym1 ve Fizz1'i eksprese eder, ancak bu genlerin insan homologları yoktur (20,34,38,45).

Makrofaj polarizasyonu, gerek sağlıklı ve gerekse patolojik koşullarda in vivo olarak gösterilmiştir. Fonksiyonel polarizasyon: embriyogenez, gebelik, testis ile yağ dokusu gibi bazı özel dokuların normal homeostazı gibi sağlıklı koşullardaki süreçlerde olduğu kadar; kronik inflamasyon, yara iyileşmesi, metabolik ve vasküler problemler, enfeksiyon ve kanser gibi patolojik koşullardaki süreçlerde de önemli rol almaktadır (Şekil 4). Makrofaj popülasyonu, yer aldığı sürece göre M1 veya M2 fenotipini işaret edebilir veya karışık fenotipler de gözlenebilir. Örneğin M1'den M2 makrofaj polarizasyonuna geçiş, enfeksiyonun erken evrelerinden kronik evrelerine geçişi karakterize eder (3,4)

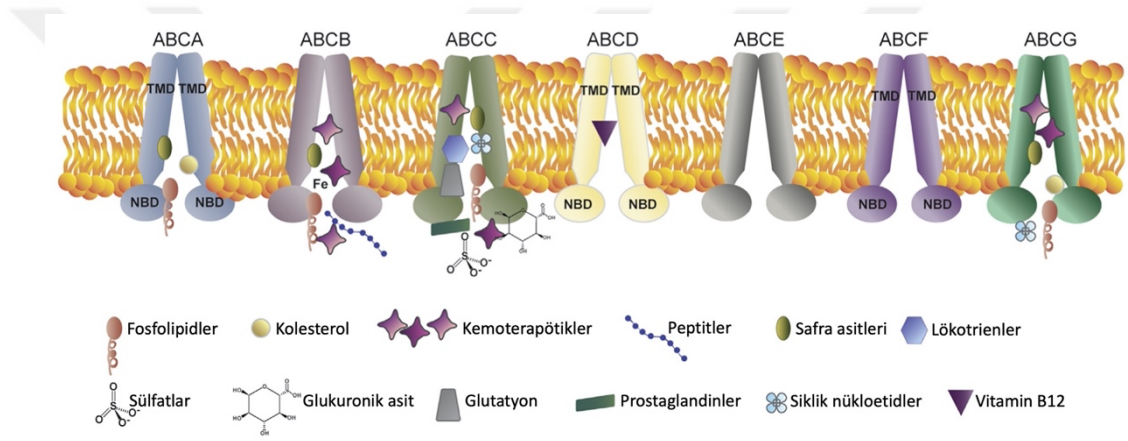


Şekil 4. Patolojik süreçlerde makrofaj polarizasyonu ve plastisitenin şematik gösterimi (4'ten düzenlenmiştir).

Temelde birçok hastalığın kökeninde, M1 ve M2 makrofaj fenotipleri arasındaki dengenin bozulması yatmaktadır. Örneğin, obezite ve tip 2 diyabet gibi hastalıklarda M1 makrofajları artarken, alerji ve kanser gibi hastalıklarda ise M2 makrofajları artmaktadır (46,47). Makrofaj polarizasyonunu yönlendirmek bu tür hastalıklar için umut verici bir tedavi yöntemi olabilir.

2.3. ABC Taşıyıcılar Ailesi

ATP bağlayıcı kaset (ABC; ATP-Binding Cassette) taşıyıcılar, 250'den fazla üyesi olan ve bakterilerden omurgalılara kadar neredeyse tüm taksonomik şubelerde korunmuş, geniş bir transmembran protein süper ailesidir. İnsanda en az 49 üyesi bulunan ABC taşıyıcıların substratlarını; lipidler, proteinler, peptidler, safra asitleri ve ilaçlar oluşturur (48–50). Substratların taşınması için ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanan (51) ABC taşıyıcılar, plazma membranının ve mitokondri, peroksizom, golgi ve endoplazmik retikulum gibi organel membranlarının çift katmanları boyunca yerleşmişlerdir (52–54). ABC taşıyıcılar, sekans homolojileri ve korunmuş bölgelerin organizasyonuna göre 7 alt aileye (ABCA-G) bölünmüştür (Şekil 5) (48).

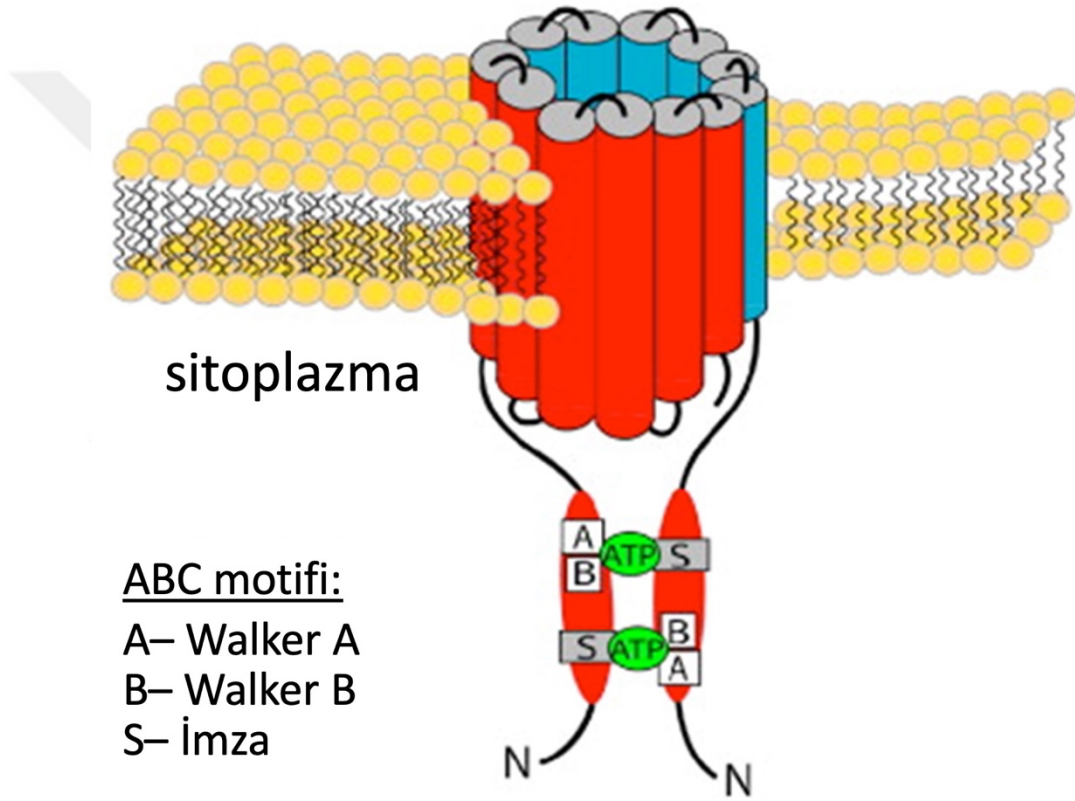


Şekil 5. ABC taşıyıcı ailesinin üyeleri, ATP hidrolizi ile sağlanan enerjiyi kullanarak çeşitli lipofilik substratları taşır (50'den düzenlenmiştir).

ABC taşıyıcılar, transmembran alan (TMD; transmembrane domain) ve nükleotid bağlama alanı (NBD; nucleotide binding domain) içerir. Her bir TMD, genellikle membran boyunca uzanan altı α -heliksten oluşur. ABC bölgesi olarak da anılan her bir NBD; Walker A motifi, Walker B motifi ve C-loop adında bir imza motifi gibi korunmuş bölgeleri kapsayan, yaklaşık 120 amino asitlik bir bölgedir. Walker A ve B motifi tüm ATP bağlayan taşıyıcılarda bulunurken, C-loop yalnızca ABC taşıyıcılarda bulunur. Fonksiyonel bir ABC taşıyıcısı, iki TMD ve iki NBD içerir. Tam taşıyıcılar bir polipeptid zinciri üzerinde iki TMD ve iki NBD taşır, ancak yarı taşıyıcılar bir polipeptid zinciri üzerinde bir TMD ve bir NBD taşıdığından, homodimer ya da heterodimer oluşturarak fonksiyonellik kazanır (55,56).

2.3.1. ABCG Taşıyıcılar Alt Ailesi

ABCG taşıyıcılar; ABC bölgesi olarak anılan NBD'in, polipeptidin amino ucuna, TMD'in ise polipeptidin C ucuna yerleştiği, ters oryantasyonla düzenlenmiş benzersiz yarı taşıyıcılardır (12,48). Bu ailenin memelilerde, ABCG1, ABCG2, ABCG3, ABCG4, ABCG5 ve ABCG8 olmak üzere 6 üyesi vardır. ABCG1, ABCG5 ve ABCG8 gibi yarı taşıyıcılar birbirleri ile homodimer ya da heterodimer oluşturarak fonksiyonel hale geçerler (Şekil 6). ABCG1 ve ABCG4 aminoasit seviyesinde yüksek özdeşlik (%70) sergilerken, diğerleri daha düşük özdeşlik (%30) gösterir (57).



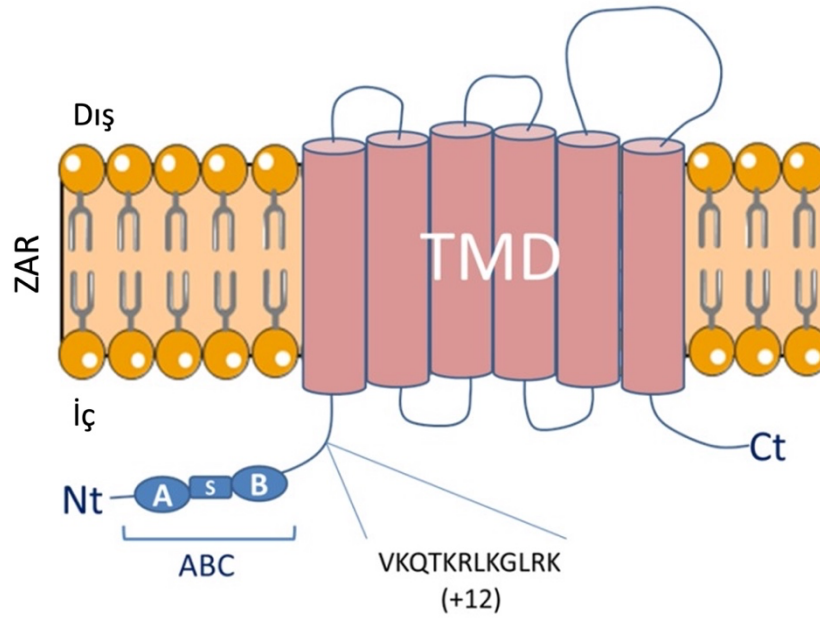
Şekil 6. Bir ABCG yarı taşıyıcının yapısı. Tipik bir ABCG yarı taşıyıcı, tek bir polipeptidin amino ucunda ABC alanı (NBD) ardından, karboksi ucunda altı transmembran heliks (TMD) içerir. Fonksiyonel bir taşıyıcının oluşması için, iki yarı taşıyıcı bir araya gelerek on iki transmembran heliksten oluşan bir homodimer ya da heterodimer oluşturur (12'den düzenlenmiştir).

2.4. ABCG1

2.4.1. ABCG1'in Yapısı ve Düzenlenmesi

ABCG1 ilk olarak, *Drosophila melanogaster* White geninin homoloğu olarak tanımlanmıştır (58–60). ABCG1 cDNA'sı klonlandığında, *Drosophila* White geni ile yaklaşık %30 amino asit benzerliği olan 74 kDa'lık bir proteini kodladığı gösterilmiştir (59,60). İnsanlarda, ABCG1 geni 21q22.3 kromozomuna haritalanmıştır ve 23 adet ekzon içermektedir (60). Alternatif kesim ya da farklı transkripsiyon başlangıçları ile üretilmiş çeşitli ABCG1 varyantlarının tamamı, sadece amino ucunda farklılıklar olan ABCG1 proteinlerini kodlamaktadır (61–63). ABCG'in bozulması ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyon ile sağlanmaktadır (64). ABCG1'in, sitoplazmik bölgesinde, TMD ile NBD arasında 12 aminoasitin eksik olduğu bir izoformu bulunmaktadır. İnsanlarda ABCG1(+12) ve ABCG1(-12) eksprese edilirken, farelerde yalnızca ABCG1(-12) eksprese edilmektedir (63,65). ABCG1 proteini bir polipeptid zinciri üzerinde, amino ucunda ABC motif içeren bir NBD ve ardından karboksil ucunda membranı geçen altı α -heliks içeren bir TMD içerir (66,67). Bir yarı taşıyıcı olan ABCG1, homodimer veya diğer ABCG taşıyıcılar ile heterodimer oluşturarak fonksiyonel hale geçer (Şekil 7) (68).

ABCG1'in hücredeki yerleşimi hala tartışmalı bir konudur, ABCG1'in hücre zarında ve iç zarlarda lokalize olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. İç zarlarda ABCG1; endozomlarda, lizozomlarda, endoplazmik retikulumda ve golgi aygıtında tespit edilmiştir (9,10,69–71). Kolesterol, sfingomyelin, oksisteroller (7-ketokolesterol, 7 β -hidroksikolesterol ve 25-hidroksikolesterol) gibi çok çeşitli lipit türlerini taşıyan bir lipit taşıyıcı olarak düşünülen ABCG1'in, E vitamini gibi yağda çözünen moleküller de dahil olmak üzere, geniş bir substrat yelpazesi bulunmaktadır (72–76). ABCG1'in ekspresyonu, karaciğer X reseptörleri (LXR) yolağı üzerinden, kolesterol yüklemesi ve oksidatif kolesterol türevleri (oksisteroller) tarafından uyarılır (77,78). LXR hücrede kolesterol konsantrasyonu arttığında, oksisteroller tarafından aktive edilen bir kolesterol sensörü olarak iş görür (62,78). ABCG1, myeloid hücreler, lenfositler ve endothelial hücreler gibi pek çok hücre çeşidinde eksprese edilmektedir (12).



Şekil 7. ABCG1'in yapısı. Polipeptid zincirinin amino ucunda yer alan NBD, ABC bölgesini içerir. Karboksi ucunda ise membranı geçen 6 α -heliksten oluşan TMD bulunur. Bir yarı taşıyıcı olan ABCG1, homodimer ya da heterodimer oluşturarak fonksiyonel hale geçer (67'den düzenlenmiştir).

ABCG1 fazla kolesterolün hücre dışına atılmasını sağlayarak, hücrelerin hayatta kalmasında ve işlevinde büyük öneme sahip olan, hücre içi kolesterol homeostazının sürdürülmesinde rol oynar (11,12). ABCG1 kolesterolün vücuttan elimine edilebilmesi için, ters kolesterol transportu (reverse cholesterol transport) yolu ile fazla kolesterolü hücrelerden alarak, yüksek yoğunluklu lipoprotein [high-density lipoprotein (HDL)] parçalarına aktarır (7,8). ABCG1 aynı zamanda kolesterolün hücre içinde taşınmasında da rol almaktadır (9,10).

2.4.2. ABCG1 ve Makrofajlar

ABCG1 makrofajlarda yüksek oranda eksprese edilir ve 22-OH kolesterol tarafından aktive edilen LXR ile indüklenir (62,77). Makrofajların LXR aktivatörleri ile tedavisi, ABCG1 ekspresyonunu ve HDL'ye kolesterol akışını artırır (7). Makrofajlarda ABCG1'in susturulması, hücre dışına kolesterol akışının bozulmasına neden olur. ABCG1 tarafından gerçekleştirilen, ters kolesterol transportundaki azalma, makrofajlarda köpük hücre oluşumunu tetikler, ancak ateroskleroz üzerinde etkisi belirsizdir (79,80). Makrofajlarda kolesterol akışının gerçekleştirilmesinde önemli rol oynayan diğer bir molekül ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A1'dir (ABCA1)

ve lipid içermeyen apoA-1'e kolesterol akışına aracılık eder. ABCA1 ekspresyonundaki azalma, ateroskleroza teşvik eder (81,82). ABCG1 ve ABCA1 kolesterolün hücrelerden uzaklaştırılması için işbirliği içerisinde çalışır (73). Makrofajların immün yanıtlarının düzenlenmesinde de ABCG1'in rolü olduğu gösterilmiştir. Örneğin, gene ABCG1'in susturulduğu makrofajlarda lipit birikimi ve inflamatuvar sitokin üretimi artmaktadır (13–15).

ABCG1^{-/-} farelerle yapılan bir çalışmada; batı tarzı diyet (Western Diyet) ile beslenen farelerde subkutan MB49 mesane kanserinin, büyümesinin baskılandığı ve farelerin hayatta kalma süresinin arttığı gösterilmiştir. ABCG1^{-/-} farelerde tümör gelişiminin baskılanmasının, tümörle ilişkili makrofajların fenotipinin tümörü destekleyen M2'den tümörle savaşıyor M1'e dönüşmesiyle bağlantılı olduğu bulunmuştur. ABCG1^{-/-} makrofajların M1 polarizasyonuna doğru intrinsik bir eğilim sergilediği ve M1 fenotipindeki makrofajların MB49 tümör hücrelerini direk olarak öldürebildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ABCG1'in tümör bağışıklığında bir aracı olarak rol aldığı ve bir kolesterol taşıyıcı proteinin tümörle ilişkili makrofajların polarizasyonunda rolü olduğunun ilk defa saptanmış olması bakımından bir buluş niteliğindedir ve ABCG1'in kanser tedavisinde bir hedef olabileceğini göstermiştir (16).

Diyabetik farelerden elde edilen makrofajlarda ABCG1 ekspresyonunun düşük olduğu ve HDL'ye kolesterol akışında bozukluk olduğu tespit edilmiştir (83,84). Diyabetik farelerdeki yüksek düzeydeki glukozun, ABCG1 ekspresyonundaki düşüşle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (83). Tip 2 diyabetli hastalardan elde edilmiş insan makrofajlarında da ABCG1 ekspresyonunun düşük olduğu bildirilmiştir (17). Tip 2 diyabetli hastalardan elde edilen monositlerde de makrofajlarda olduğu gibi ABCG1 ekspresyonunun düşük olduğu rapor edilmiştir (85). Hem diyabetik fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, hem de tip 2 diyabetli insanlar üzerinde yapılan çalışmalar; diyabette ABCG1 ekspresyonundaki azalma ve HDL'ye kolesterol akışındaki azalmanın, makrofajlarda hücre içinde kolesterol birikimine sebep olduğunu göstermiştir. Bu durum makrofaj köpük hücre oluşumuna neden olmakta ve ateroskleroz ile birlikte damarlarda aterosklerotik plak oluşumu ile ilişkilendirilmektedir (17,83–85). Bu çalışmalar; tip 2 diyabet hastalarında,

makrofajlardaki ABCG1 ekspresyonunun düzenlenmesinin, makrofaj köpük hücre oluşumu kaynaklı komplikasyonların tedavisine katkıda sağlayabileceğini düşündürmektedir.



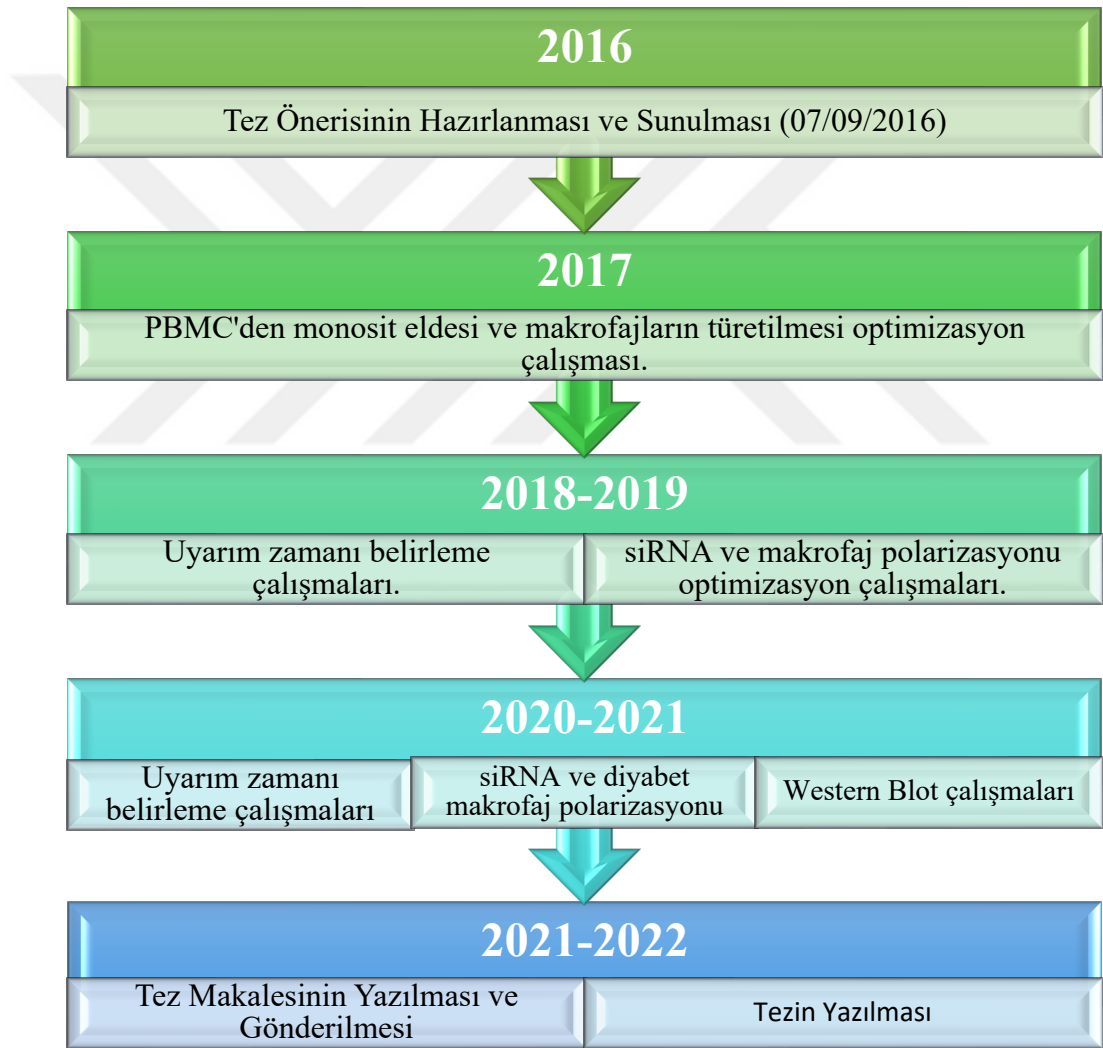
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneysel nitelikli bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Araştırmamız Nisan 2017 ile Ocak 2022 tarihleri arasında, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi laboratuvarlarında (iBG) gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın zaman çizelgesi Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. Tez projesinde gerçekleştirilen çalışmaların zaman çizelgesi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grupları

Araştırmamızın evreni, kan bağışı yapan sağlıklı donörler ve Tip 2 diyabet hastası donörlerdir. Örneklem 2017-2022 yılları arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Kan merkezine, kan bağışı yapan sağlıklı donörlerin artık buffy coat'ları ve Dokuz Eylül Üniversitesi Endokrin ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı tarafından izlenen Tip 2 diyabet hastalarının artık kanlarıdır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmamızın birinci bölümü için çalışma materyali buffy coat, ikinci bölümü için ise kandır. Donörler, beyan ettikleri sağlık durumu ve sağlık muayenesine göre seçilmiştir. Kronik hastalıklara sahip ya da anormal kan değerlerine sahip donörler çalışma dışı bırakılmıştır. Kabul kriterlerimize uyan gönüllülere “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” imzalatıldıktan sonra alınan buffy coat ve kandan, periferik kan monositleri elde edilmiş ve monositler makrofajlara olgunlaştırılmıştır. Tüm deneysel çalışmalar, makrofajlar üzerinde yapılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

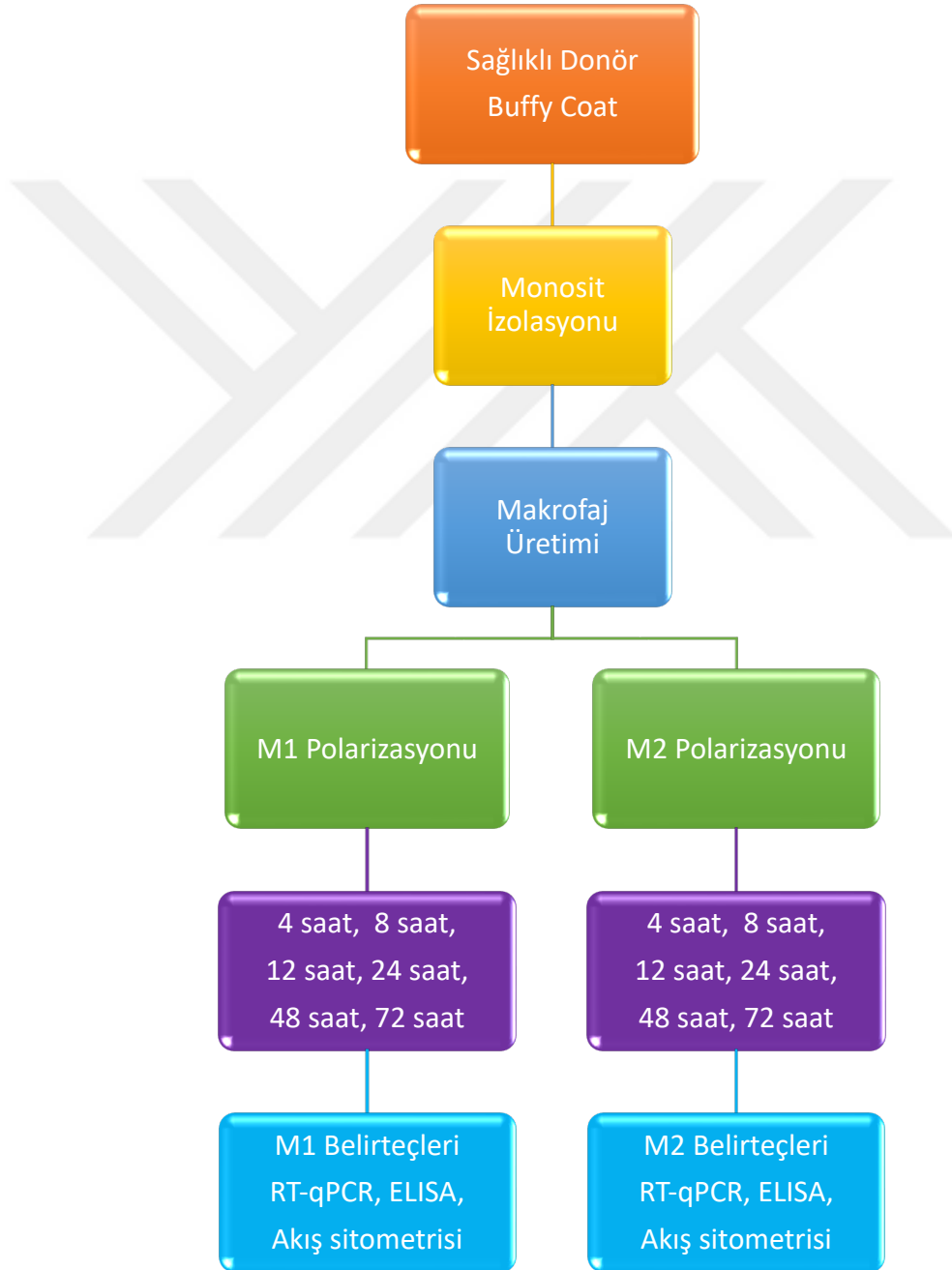
ABCG1 ekspresyonu ve M1/M2 makrofaj belirteçlerinin ekspresyonu, araştırmamızın bağımlı değişkenleridir. ABCG1 ekspresyonunun baskılanması ve M1/M2 makrofaj polarizasyonu ise araştırmamızın bağımsız değişkenleridir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Deney Akış Şemaları

3.6.1.1. Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

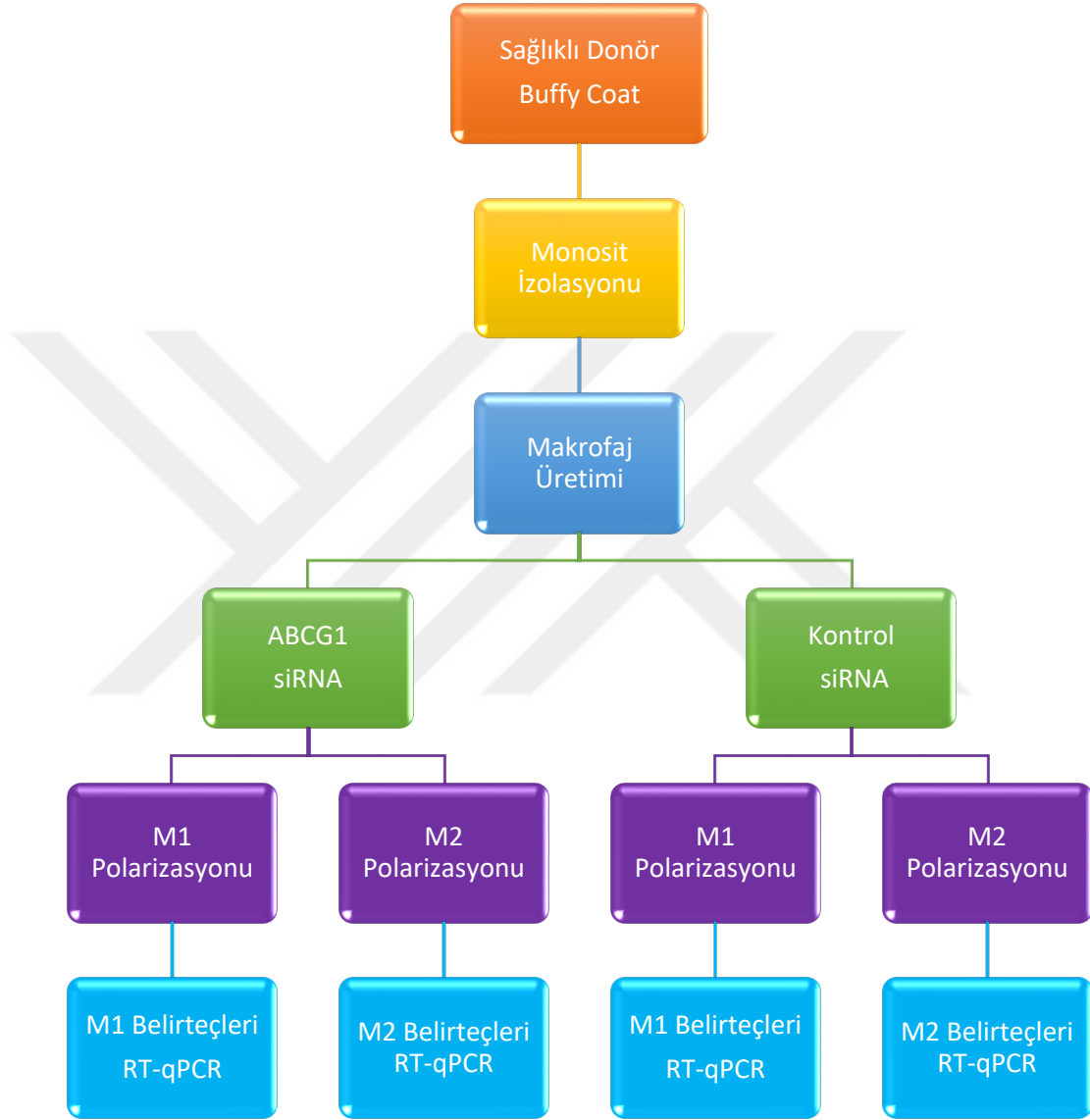
Uyarım süresi belirleme deneyleri için akış şeması Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9. Makrofaj polarizasyonunda kullanılacak uygun uyarım süresinin belirlenmesi çalışmaları deney akış şeması.

3.6.1.2. ABCG1 Ekspresyonunun siRNA ile Baskılanmış Makrofajların Polarizasyonu

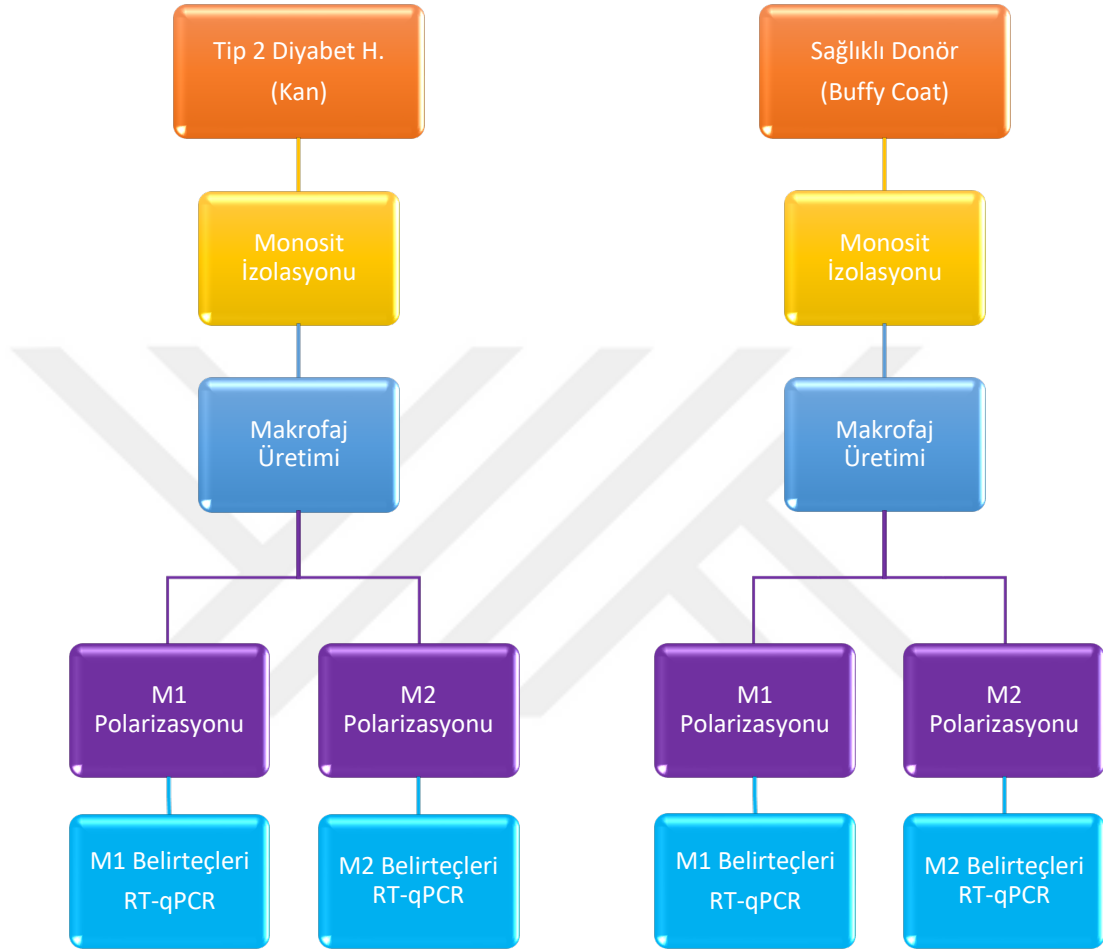
siRNA deneyleri için akış şeması Şekil 10'da verilmiştir



Şekil 10. ABCG1 ekspresyonunun siRNA ile baskılanmış makrofajların polarizasyonu ve polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonlarının belirlenmesi çalışmaları deney akış şeması.

3.6.1.3. Tip 2 Diyabet ve Kontrol Grubu örneklerinin Makrofaj Polarizasyonu

Diyabet deneyleri için akış şeması Şekil 11’de verilmiştir



Şekil 11. Tip 2 diyabetli hastalarda ve kontrol grubunda makrofaj polarizasyonu ve polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonlarının belirlenmesi çalışmaları deney akış şeması.

3.6.2. Çalışma Sırasında Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Bu proje sırasında kullanılan kimyasal malzeme ve kitlerin listesi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Projede Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Kitlerin Listesi

<i>Malzeme Adı</i>	<i>Marka</i>	<i>Katalog Numarası</i>
Nucleo-Spin RNA kit	MN	740955.50
EvoScript Universal cDNA Master, 200 rxn	Roche	7912455001
Fast Start Essential DNA Probes Master,10x5 mL	Roche	6924492001
CXCL9 Real Time Ready Single Assay	Roche	100137998
CXCL10 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134759
TNF Real Time Ready Single Assay	Roche	100134777
IDO1 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134768
MRC1 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134731
TGM2 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134722
CCL17 Real Time Ready Single Assay	Roche	100138007
CCL22 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134713
IL10 Real Time Ready Single Assay	Roche	100133437
CD163 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134801
ACTB (β -actin) Real Time Ready Single Assay	Roche	100074091
ABCG1 Real Time Ready Single Assay	Roche	100134698
FastStart Essential DNA Green Master	Roche	06402712 001
IL1 β QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00021385
IL12A QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00000357
IL-10 QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00041685
TGF β QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00000728
ACTB QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00095431
LightCycler 480 Plates	Roche	4729692001
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche	4729757001
MicroAmp Fast 96 -Well Reaction Plate	ABI	4346907
ELISA Pro: Human TNF α	Invitrogen	#88-7346-88
ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-12 p70	BioLegend	#431704
ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL- β	BioLegend	#437004
ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-10	BioLegend	#430604
Human TGF β DuoSet ELISA	R&D	DY240
Ultra-Low Attachment 6 well plates	Corning	3471
Recombinant Human IFN- γ	R&D	285-IF/CF

Recombinant human IL-10	R&D	217-IL
Recombinant Human IL-4	R&D	204-IL
Recombinant Human M-CSF	Peptrotech	300-25
Ultrapure LPS	Invivogen	tlrl-3pelps
Trypsin-EDTA Solution	Sigma	
Trypan Blue (0.4%)	BI	BI03-102-1B
1X PBS	Gibco	10010-015
RPMI 1640 W/ L-Glutamine	Lonza	BE12-702F
RPMI 1640, w/o Phenol red	Cegrogen	E0500-350
Fetal Bovine Serum, certified (FBS)	Gibco	10500-064
Ficoll-Paque PLUS density gradient media	GE Healthcare	17144003
Percoll PLUS density gradient media	GE Healthcare	17544501
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Gibco	15140122
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Applichem	A3672
Dithiothreitol (DTT)	Bioshop	Dtt001.5
Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo	78425
Halt Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo	78428
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo	89901
BCA Protein Assay Kit	Thermo	23227
Color protein standard	NEB	P7712S
PVDF membrane Immobilon-FL	Millipore	IPFL00010
β mercaptoethanol	Applichem	A4338
ABCG1 Antibody	Novus	NB400-132
β -Actin Antibody	Cell Signaling	#4970
StemPro™ Accutase™ Cell Dissociation Reagent	Gibco	A1110501
Zombie UV Fixable Viability Kit	Biolegend	423108
CD86-BV605	Biolegend	305430
HLA-DR-APC-Cy7	Biolegend	307618
CD64-PerCP-Cy5.5	Biolegend	305024
CD200R-PE-Dazzle594	Biolegend	329310
CD206-AF700	Biolegend	321132
CD163-PE-Cy7	Biolegend	333614
Human TruStain FcX™ (Fc Receptor Blocking)	Biolegend	422302
Aquaguard-1	BI	01-867-1B
Aquaguard-2	BI	01-916-1E
2-Propanol	Applichem	A3465
Skim Milk Powder, For Microbiology	Sigma	70166
Trizma Base, BiotPerformanceCertified	Sigma	T6066
Acrylamide/Bis-Acrylamide, 30% Solution	Sigma	A3574
Ammonium persulfate	Sigma	A3678

Bu proje sırasında kullanılan cihazların listesi ise Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Projede Kullanılan Cihazların Listesi

<i>Cihaz Adı</i>	<i>Marka</i>	<i>Model</i>
CO ₂ ’li inkübatör	Memmert	INCO153
Laminar kabinet	Thermo Scientific	Thermo Safe 2020
Hücre kültürü santrifüjü	Eppendorf	5702
-80°C soğutucu	Thermo Scientific	Forma 700 series
Sıvı Azot Hücre Saklama Tankı	Thermo Scientific	8031
Nanodrop cihazı	Thermo Scientific	Nanodrop 2000
Real Time PCR Cihazı	Roche	LightCycler 480 II
Real Time PCR Cihazı	ABI	7500 FAST
Jel Dökümantasyon Sistemi	BioRad	Gel Doc XR+
Western Blot Görüntüleme Sistemi	LI-COR	ODYSSEY CLX
Vertikal elektroforez ve blotlama sistemi	Bio-Rad	1658004
Roller	Labnet	Labroller-II
Hibridizasyon fırını	Atto	AB-1950
Mikrotüp Karıştırıcı	Eppendorf	Thermomixer
Plate Okuyucu	Thermo	Multiskan GO
Hazırlayıcı santrifüj	Beckman	Avanti J-301
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf	5415R
Buz Makinası, Yüksek Kapasiteli Kar Tipi	Hoshizaki	FM300
Mikro Santrifüj	Thermo Scientific	Micro CL 17R
Genel Amaçlı Su Banyosu	Nüve	NB 9
pH Metre	Hanna instruments	ELED
Mikrodalga Fırın	Beko	2000EXN
Thermal Cycler	Applied Biosystems	SimpliAmp A24811
Orbital Sallayıcı	Thermo Scientific	Compact Digital Rocker

Erlen Çalkalayıcı	Thermo Scientific	Compact Digital Rotator
Basit Terazı	Sartorius	ENTRIS822-1S
Vortex Cihazı	Thermo Scientific	LP Mixer ELED88880018
Tüp Döndürücü	Thermo Scientific	Tube Revolver
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific	SP 131320-33Q
Çeker Ocak	Köttermann	2-401-GAAAAY
Yüksek Akımlı Güç Kaynağı	Biorad	Power Pac Universal
Cell Analyzer	BD Biosciences	LSR Fortessa

3.6.3. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan monositler ve makrofajlar RPMI 1640 kültür ortamı (%5 ısı ile inaktive edilmiş FBS, 2mM L-Glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren) içerisinde idame edildi. Hücre kültürü çalışmaları Laminar akımlı kabinet içerisinde gerçekleştirildi ve hücreler 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücre sayımı için; hücre süspansiyonu yoğunluğuna göre seyreltildi, 25 µL hücre süspansiyonu, 0,5 mL’lik tüp içerisinde 1:1 oranında Tripan mavisi ile karıştırıldı ve Neubauer lamına ekildi. Ters bakışlı faz kontrast mikroskopunda boyanmayan hücreler sayıldı ve sayılan alanların ortalaması alındı. Hücre süspansiyonunun bir mililitresindeki hücre sayısını belirlemek için; ortalama hücre sayısı, dilusyon faktörü ve 10⁴ ile çarpıldı. Deneyler için gerekli miktarda hücre, plaklara ekildi.

3.6.3.1. Buffy Coat’tan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Buffy coat’tan mononükleer hücreler, ficol yoğunluk gradient santrifüj yöntemi ile izole edildi. Buffy coat, PBS çözeltisi ile 1:1 oranında dilüe edildi. 20 mL dilüe edilmiş buffy coat, 15 mL ficol üzerine fazlar karışmayacak şekilde dikkatlice yayıldı. Oda sıcaklığında, 400 g’de, 30 dakika fren olmaksızın santrifüj edildi. Beyaz kan hücrelerinin yer aldığı ortadaki bulutsu tabaka bir pastör pipeti yardımı ile toplandı. Toplanan beyaz kan hücreleri RPMI 1640 kültür ortamı ve PBS (1:1) iki kere yıkandı. Son yıkamadan sonra hücreler RPMI 1640 kültür ortamı ile süspanse edildi ve sayıldı.

3.6.3.2. Periferik Kan’dan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Periferik kandan mononükleer hücreler, ficol yoğunluk gradient santrifüj yöntemi ile izole edildi. Periferik kan, PBS çözeltisi ile 2:1 oranında dilüe edildi. 20 mL dilüe edilmiş periferik kan, 15 mL ficol üzerine fazlar karışmayacak şekilde dikkatlice yayıldı. Bu aşamadan itibaren, 3.6.2.1’de anlatıldığı gibi mononükleer hücreler izole edildi.

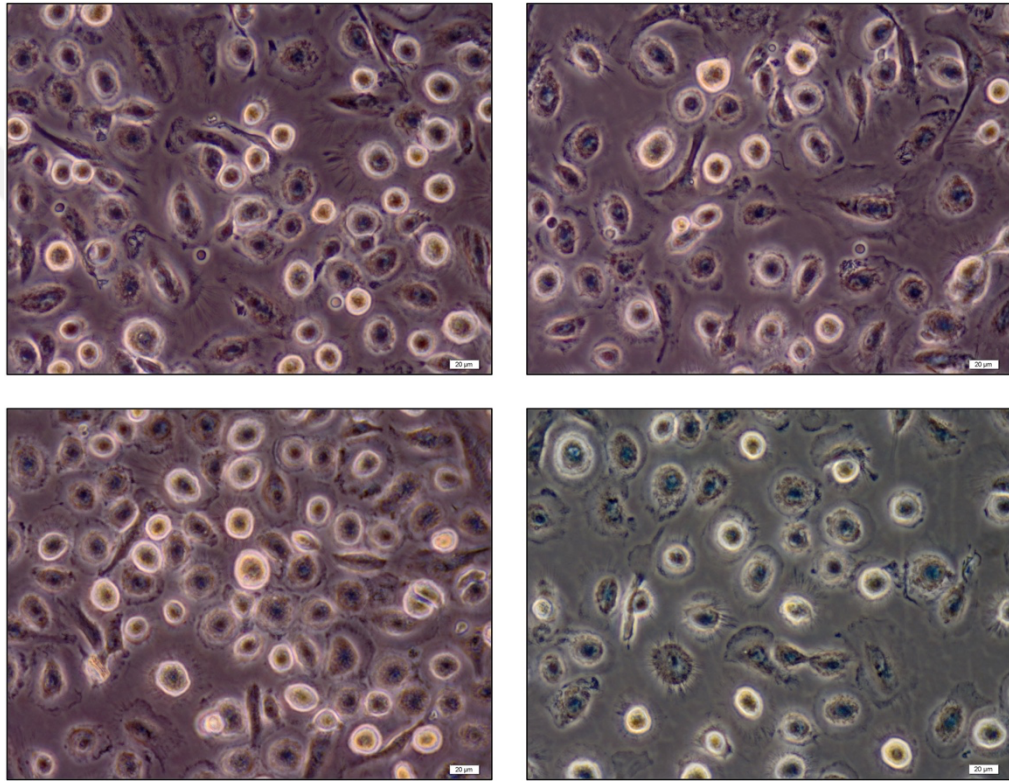
3.6.3.3. Mononükleer Hücrelerden Monositlerin İzole Edilmesi

23 mL Perkol, 2 mL 10X PBS çözeltisi karıştırıldı. Perkol-10X PBS karışımından 23 mL alındı ve üzerine 27 mL fenol kırmızısı içeren (renkli) RPMI 1640 kültür ortamı eklendi. Elde edilen 50 mL'lik karışım, 50 mL'lik tüplere 25'er mL olarak bölündü. Bir önceki aşamada izole edilen mononükleer hücreler, 20 mL fenol kırmızısı içermeyen (renksiz) RPMI 1640 besiyerinde, her tüpte en fazla 1×10^8 hücre olacak şekilde süspanse edildi. 25 mL'lik Perkol çözeltisi üzerine, 20 mL mononükleer hücre süspansiyonu, fazlar karışmayacak şekilde yayıldı. Bu aşamada hücrelerin olduğu süspansiyon şeffaf, Perkol çözeltisi ise fenol kırmızısı nedeni ile pembe renkli olduğundan, fazların karışıp karışmadığını ayırmak mümkündür. Ardından tüpler oda sıcaklığında, 550g'de, 30 dakika fren olmaksızın santrifüj edildi. Pembe renkli ve şeffaf fazların arasında kalan bulutsu tabaka bir pastör pipeti yardımı ile toplandı. Toplanan monositler RPMI 1640 kültür ortamı ve PBS (1:1) iki kere yıkandı. Yıkamanın ardından monositler, RPMI 1640 kültür ortamı ile süspanse edildi ve sayıldı.

3.6.3.4. Monositlerden Makrofaj Üretilmesi

Monositler, makrofajlara farklılaştırılmak için 10 ng/mL konsantrasyonunda rekombinant insan M-CSF'i içeren RPMI 1640 kültür ortamında süspanse edildi ve her kuyucukta 4 mL kültür ortamı içinde 4×10^6 hücre olacak şekilde, yapışkanlığı az 6 kuyulu plaklara ekilerek, 37°C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 7 gün inkübe edildi. Monositler ekildikten sonra 3. ve 5. günde, her bir kuyucuğa 10 ng/mL konsantrasyonunda rekombinant insan M-CSF'i içeren 1 mL RPMI 1640 kültür ortamı eklendi. 7.gün yapışkanlığı az 6 kuyulu plaklardaki tüm hücreler pipetaj yapılarak toplandı. Hücre kaybı olmaması için plaklar, RPMI 1640 kültür ortamı ve PBS (1:1) ile yıkandı ve kalan hücreler de toplandı. Toplanan hücreler RPMI 1640 kültür ortamı ve PBS (1:1) ile yıkandı. Yıkamadan sonra hücreler RPMI 1640 kültür ortamı ile süspanse edildi ve sayıldı.

Makrofajlara farklılaşmamış monositlerin tamamen elemine edilmesi için toplanan hücreler, 24 kuyulu hücre kültürü plaklarına her kuyucukta bir mL RPMI 1640 kültür ortamı içine 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Plaklar, makrofajların tamamen yapışması için 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bir gün inkübe edildi. Ardından plaklardaki kültür ortamı, plağa yapışmış olan makrofajlara zarar vermeden uzaklaştırıldı ve makrofajlar PBS ile bir kere yıkandı. İnsan monositlerinden türetilmiş makrofajların görüntüleri Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12. İnsan monositlerinden türetilmiş makrofajlar.

3.6.4. Makrofaj Polarizasyonu

Makrofajlar, 24 kuyulu hücre kültürü plaklarına, her kuyucukta 1 mL RPMI 1640 kültür ortamı içerisinde $6,5 \times 10^5$ makrofaj olacak şekilde ekildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde bir gece inkübe edildi. Kültür ortamı uzaklaştırıldı. Stimülanlar RPMI 1640 kültür ortamında, Tablo 3'deki konsantrasyonlar ile hazırlandı. Makrofajlar deneye uygun uyarım süresi boyunca, stimülanlar ile inkübe edildi.

Uyarım süresine bağlı olarak, polarizasyon belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi deneylerinde $6,5 \times 10^5$ makrofaj, polarizasyon için M1, M2a ve M2c stimülanları ile 4, 8, 12, 24, 48 ve 72 saat boyunca uyarıldı.

Transfeksiyon deneylerinde 5×10^5 makrofaj, ABCG1 siRNA ve kontrol siRNA ile 72 saat inkübe edildikten sonra polarizasyon için M1, M2a ve M2c stimülanları ile 4 saat uyarıldı.

Tablo 3. Makrofaj Polarizasyonu için Stimülanlar

<i>Polarizasyon</i>	<i>Stimülan</i>	<i>Konsantrasyon</i>
M1 Polarizasyonu	LPS	100 ng/mL
	IFN γ	20 ng/mL
M2a Polarizasyonu	IL4	20 ng/mL
M2c Polarizasyonu	IL10	20 ng/mL

3.6.5. M1/M2 Makrofaj Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarının RT-qPCR ile Belirlenmesi

3.6.5.1. RNA İzolasyonu

Makrofajlardan RNA izolasyonu için MN (Macherey Nagel) NucleoSpin RNA izolasyon kiti kullanıldı.

- Süpernatant uzaklaştırıldı ve makrofajlar PBS ile yıkandı.

- Her kuyucuk için 348,25 µL lizis solüsyonu (RA1) başına 1,75 µl 2mM DTT eklenerek, RA1 çalışma solüsyonu hazırlandı. Makrofajların üzerine 350 µL RA1 çalışma solüsyonu eklendi, viskoz yapı seyrelene kadar pipetleme yapıldı.
- Hücre-lizis solüsyonu karışımı 1,5 mL'lik tüpe aktarıldı, 20 saniye vortekslendi ve kit içeriğinden çıkan mor renkli filtreli kolonlara yüklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli kolon atıldı ve eluatın üzerine 350 µL %70 etanol eklendi ve pipetajla iyice karıştırıldı.
- Karışım kit içeriğinden çıkan mavi renkli filtreli kolona yüklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA kolona bağlandı.
- Bu sefer elüat atıldı ve mavi renkli filtreli kolon korundu.
- Kolondaki tuz kalıntılarının uzaklaştırılması için 350 µL MDB solüsyonu eklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Örnekteki DNA'ların parçalanması için kolon başına, 10 µL DNaz ve 90 µL DNaz reaksiyon karışımı eklenerek, DNaz çalışma solüsyonu hazırlandı ve kolona 95 µL eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kolona 200 µL RAW2 yıkama solüsyonu eklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolona 600 µL RA3 yıkama solüsyonu eklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolona 250 µL RA3 yıkama solüsyonu eklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 11000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek, filtreli kolon kurutuldu.
- Kolona 40 µL RNaz içermeyen H₂O eklendi ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA'nın elüsyonu sağlandı.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları, spektrofotometrik olarak Nanodrop cihazı kullanılarak belirlendi. RNA'ların 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans (A) değerleri ölçüldü. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi için; $A_{260} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 40 = 1 \text{ mL'deki RNA miktarı (g)}$ formülü kullanıldı.

RNA'ların saflığı için ise A260 / A280 oranlarının 1,6 - 1,8 arasında olmasına dikkat edildi. RNA'lar cDNA sentezi yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.6.5.2. cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 1 µg'a eşitlendi. cDNA sentezi için EvoScript Universal cDNA Master kit kullanıldı. Bu amaçla 0,2 mL tüpe; dNTP'ler, random primerler, reaksiyon tamponu ve RNaz inhibitörü içeren 5X reaksiyon karışımından 4 µL, RNA'dan 1 µg eklendi ve son hacim 18 µL olacak şekilde RNaz içermeyen su ile tamamlandı. Tüp buzda 5 dakika inkübe edilerek primerlerin, RNA kalıbına bağlanması sağlandı. Ardından tüpe, reverse transkriptaz enzimi içeren 2 µL 10X enzim karışımı eklenerek, son hacim 20 µL'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı, termal döngü cihazında 42°C'de 15 dk, 85°C'de 5 dk, 65°C'de 15 dk inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar, RNaz içermeyen su ile 1/5 dilüe edildi ve -20°C'de saklandı.

3.6.5.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

M1/M2 makrofaj belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri, TaqMan problemleri kullanılarak, LightCycler® 480 II (Roche) cihazı ile belirlendi. Çalışmada kullanılan Real Time Ready Catalog Assay'ler ticari olarak satılan gene özel dizayn edilmiş primer-prob karışımlarıdır. qPCR reaksiyon karışımı; dNTP'ler, Mg⁺², reaksiyon tamponu ve Taq polimeraz enzimini içeren 2X TagMan Prob Master'dan 5 µL, 20X primer-prob karışımından 0,5 µL, nükleaz içermeyen sudan 2 µL ve dilüe edilmiş cDNA'dan 2,5 µL eklenerek, 20 µL son hacimle hazırlandı. Kantitatif PCR koşulları; enzim aktivasyonu için başlangıç denatürasyonu 95°C'de 15 dakika; amplifikasyon, 45 döngü, 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye ve cihazın soğuması için 40°C'de 30 saniye olarak uygulandı. Reaksiyon karışım oranları ve PCR koşulları, üretici firmanın önerdiği şekilde kullanıldı. Her bir örnek üç teknik replika olarak çalışıldı. Normalizasyon için referans gen olarak β-Aktin kullanıldı. Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, 2^{-ΔΔCT} metodu kullanılarak belirlendi.

3.6.6. Akış Sitometrisi

Primer insan monositlerinden türetilmiş makrofajlar, her kuyucukta RPMI 1640 kültür ortamı içerisinde 5×10^5 makrofaj olacak şekilde, 48 kuyulu hücre kültürü plaklarına ekildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Makrofajlar “Makrofaj Polarizasyonu” bölümünde anlatıldığı şekilde polarize edildi, ardından yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- Hücre kültürü plağından makrofajların kaldırılabilmesi için, PBS ile yıkanmış hücreler üzerine, 200 μL StemPro Accutase solüsyonu eklendi ve bir saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edildi. Daha sonra 200 μL RPMI 1640 kültür ortamı eklendi ve hücreler toplanarak V-tabanlı 96 kuyulu plaklara aktarıldı, 400 g'de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü ve PBS ile yıkandı.
- Canlı hücreleri belirlemek için, hücreler Zombie UV Fixable Viability Kit ile (1x PBS içerisinde 1/1000 oranında seyreltilmiş) buz üzerinde 20 dakika boyandı.
- Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, 1 mL FACS tamponu (1X PBS içerisinde, %0.25 Na-azid ve %1BSA) ile süspanse edildi, 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı. Ardından 5 dakika boyunca 400 g'de santrifüj edildi.
- Süpernatanın alınmasından sonra, her bir tüpteki hücreler Fc reseptörlerinin bloke edilmesi için 50 μL Human TruStain FcX antibody kit ile (FACS tamponu içerisinde 1/200 oranında seyreltilmiş) süspanse edildi ve ardından buz üzerinde 15 dakika süreyle inkübe edildi.
- Daha sonra hücre yüzey belirteçlerini tanıyan antikorlar kokteyl olarak 1/200 oranında dilüsyonla FACS tamponu içinde hazırlandı ve içinde Fc Blok tamponu bulunan tüplere, antikor kokteyli 50 μL olarak eklendi.
- Hücreler karanlıkta, buz üzerinde 45 dakika inkübe edildi.
- Antikorlarla boyama işlemini durdurmak için her bir tüpe 1 mL FACS tamponu eklendi ve tüpler 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatat atılarak yıkama işlemi tekrar edildi.

- Fiksasyon işlemi için her bir tüpe 100 µL Cytotfix fiksasyon tamponu eklendi ve buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi.
- Fiksasyon işlemini durdurmak için her bir tüpe 1 mL FACS tamponu eklendi ve tüpler 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak hücreler FACS tamponu ile bir kez yıkandı.
- Son olarak hücreler 100 µL FACS tamponu ile süspanse edildi ve 4°C'de muhafaza edildi ve ardından akış sitometrisi analizleri gerçekleştirildi.

3.6.7. ELISA

Primer insan monositlerinden türetilmiş makrofajlar, her kuyucukta RPMI 1640 kültür ortamı içerisinde 5×10^5 makrofaj olacak şekilde, 48 kuyulu hücre kültürü plaklarına ekildi ve 37°C 'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Makrofajlar "Makrofaj Polarizasyonu" bölümünde anlatıldığı şekilde polarize edildi, ardından süpernatantlar toplanarak, sitokin üretim düzeylerinin tayini için ELISA analizi yapılana kadar -20°C'de saklandı. Saklanan süpernatantlardaki TNF, IL12p70, IL1β, IL-10 ve TGFβ sitokin düzeyleri, üretici firmaların önerdiği protokollere uygun olarak tayin edildi. Primer antikorlar (capture antibody), yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyulu plaklara konularak, 4°C de gece boyu (16 saat) inkübe edildi. Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için inkübasyonun ardından plaklar, 1X PBS içerisinde %0.05 Tween-20 içeren yıkama tamponu ile yıkandı. Ardından, plaklar 1 saat boyunca bloklama tamponu kullanılarak blokladı. Sonrasında, uygun şekilde seyreltilen örnek ve standart dilüsyonlar, plaklara eklendi ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Plaklar yıkandıktan sonra, streptavidin içeren ikincil antikorlar eklenip 1 saat daha inkübe edildi. Sonrasında yıkamaların ardından, plaklar ikincil antikorunu tanıyan, avidin-HRP solüsyonu eklenerek 30 dakika daha inkübe edildi. Son kez yıkanan plaklar, TMB substrat solüsyonu ile 5-30 dakika arası karanlıkta inkübe edildi ve reaksiyon, 2N HCl ile durduruldu. Örneklerin absorbanları, 450nm ve 570 nm dalga boylarında Multiskan GO (Thermo Scientific) cihazı ile tayin edildi.

3.6.8. siRNA Aracılıklı Gen Ekspresyonu Baskılanması

Liyofilize haldeki ABCG1 (Hedeflenen, Targeted) ve kontrol (Hedeflenmeyen, Non Targeted; NT) siRNA'lar, 1X siRNA tamponu kullanılarak süspanse edildi ve 100 µM'lık stok siRNA solüsyonları olarak alikotlandı. Her deney için kullanılacak Accell siRNA çalışma solüsyonu, 100 µM'lık alikotların Accell siRNA kültür ortamı kullanılarak dilüe edilmesi ile 1 µM'lık son konsantrasyonda taze olarak hazırlandı. Transfekte edilmiş makrofajlarda ABCG1 ekspresyonunun baskılanma oranı, protein düzeyinde Western blot yöntemi ile kontrol edildi. Daha sonra M1/M2 polarizasyon deneylerine devam edildi.

- Makrofajlar transfeksiyon için, 24 kuyulu hücre kültürü plaklarına, her kuyucukta 1 mL RPMI 1640 kültür ortamı içinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gece inkübe edildi.
- Ertesi gün RPMI 1640 kültür ortamı uzaklaştırıldı ve makrofajlar PBS ile 1 kere yıkandı.
- Her kuyucuğa, 1 µM konsantrasyonunda siRNA içeren 500 µl Accel siRNA çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 72 saat inkübe edildi.
- FBS, Accell siRNA'ların transfeksiyon verimini düşürdüğünden, Accell kültür ortamı FBS içermemektedir. Bu nedenle 72 saatlik inkübasyonun 8. saatinde, son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde ve inkübasyonun 48. saatinde son konsantrasyon %1 olacak şekilde ortama FBS eklendi.
- İnkübasyonun sonunda ABCG1 siRNA ve kontrol siRNA ile transfekte edilmiş makrofajların üzerindeki Accell Kültür ortamı uzaklaştırıldı ve makrofajlar PBS ile yıkandı.

3.6.9. Western Blot Yöntemi

3.6.9.1. Protein İzolasyonu

Transfekte edilmiş makrofajlar soğuk PBS ile buz üzerinde 2 defa yıkandı. İnhibitör (1X proteaz ve fosfotaz inhibitörü, 1 mM PMSF ve 44 μ M Calpain inhibitörü) içeren soğuk PBS ve hücre kazıyıcı kullanılarak, hücreler kazındı ve 1,5 mL'lik tüpe toplandı. Tüpler 1500 g'de 4 dakika santrifüj edildi. Hücre pelletine zarar vermeden, süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Pellet çok hızlı bir şekilde, -80°C'ye kaldırıldı ve bir gece bekletildi. Ertesi gün hücre pelleti buz üzerine alınarak, üzerine inhibitör (1X proteaz ve fosfotaz inhibitörü, 1 mM PMSF ve 44 μ M Calpain inhibitörü) içeren RIPA tamponu eklendi. Tüpler beş dakikada bir vortekslenerek, buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Bu sırada pellet tamamen çözündüğünde her bir tüpteki hücreler 5 defa enjektörden geçirilerek, daha fazla parçalanmaları sağlandı. Hücre lizatı +4°C'de 14.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellete dokunmadan, proteinleri içeren süpernatant dikkatlice alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı. Proteinler -80°C'de saklandı.

3.6.9.2. Proteinlerin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonunun ölçümünde biçinkonik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Biçinkonik asit ile bakır sülfat karışımı, yeşil bir renk vermektedir. Bu karışım protein çözeltisi ile bir araya gelince, alkali koşullarda proteinlerin peptid bağları ile etkileşir ve Cu^{+2} iyonları Cu^{+1} iyonlarına indirgenerek mavi-mor bir renk verir. Protein ölçümü için BCA kiti kullanıldı.

- Sığır serum albümininden (Bovine Serum Albumin; BSA) 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 μ g/mL konsantrasyonda seri dilüsyonlar hazırlanarak, standartlar oluşturuldu.
- Konsantrasyonu ölçülecek protein örnekleri, RIPA tamponu ile 1/12 dilüe edildi.
- 96 kuyulu hücre kültürü plağına, protein örnekleri ve standartlardan 25'er μ L eklendi.

- Biçinkonik asit içeren Reaktif A ve bakır sülfat içeren Reaktif B, 50:1 oranında karıştırılarak, çalışma solüsyonu hazırlandı.
- Her kuyucuğa 200 µL çalışma solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Mikroplak aliminyum folyoya sarılarak, 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Örnek ve standartların 562 nm dalga boyundaki Absorbans (A) değeri, spektrofotometrik olarak mikroplak okuyucuda ölçüldü.
- Absorbans değerlerine karşı çizilen standart konsantrastrasyon grafiği üzerinden protein örneklerinin konsantrasyonu hesaplandı.

50 µg protein örneği, RIPA tamponu ve DTT içeren 4X yükleme tamponu (Tablo 4) ile son hacimleri eşit olacak şekilde karıştırıldı. Isı bloğunda 95°C’de 15 dakika denatüre edildikten sonra, -80°C’de saklandı. DTT proteinlerin disülfid bağlarının indirger. Denatürasyon işlemi ve SDS de proteinlerin primer yapıya geçmelerini sağlar. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere kütleleri oranında bağlanarak negatif yüklenmelerini sağlar.

Tablo 4. Yükleme Tamponu (Laemni Tamponu)

<i>Bileşenler (1X)</i>	<i>4X, 50 mL için</i>
50 mM Tris Baz (pH 6,8)	20 mL 0,5 M
% 10 Gliserol (v/v)	20 g
% 2 SDS (w/v)	4 g
% 0,025 Bromfenol Mavisi (w/v)	0,05 g
10 mM DTT	2 mL 1 M

3.6.9.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, negatif yüklü proteinlerin elektrik alan varlığında moleküler kütlelerine göre ayrımlanmasını sağlayan analitik bir yöntemdir. Farklı yapı, yük ve büyüklüğe sahip proteinler, SDS ile muamele edilerek, eşit yük yoğunluğunda ve lineer halde kalırlar. Bu sayede farklı büyüklükteki proteinler, elektriksel alanda farklı hızlarda göç ederek, birbirinden ayrılır. Bio-Rad marka dikey elektroföres sistemi kullanılmıştır.

3.6.9.3.1. SDS-Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

- Jelin döküleceği camlar, jel hazırlama standına aralarında 1 mm boşluk olacak şekilde yerleştirildi.
- % 8'lik ayırıcı jel çözeltisi hazırlanarak (Tablo 5), iki cam arasına serolojik pipet yardımı ile döküldü.
- Jelin hava ile temasını kesmek ve üst kısmının düzgün polimerleşmesini sağlamak için, üzerine 600 µl izopropanol eklendi.
- Jel polimerleştikten sonra, izopropanol döküldü ve jelin üst kısmı kurulandı.
- %5'lik paketleyici jel çözeltisi hazırlanarak (Tablo 6), ayırıcı jelin üzerine döküldü.
- Paketleyici jel polimerleşmeden, 10 kuyulu tarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi.

Tablo 5. %8'lik Ayırıcı Jel

<i>Bileşenler</i>	<i>20 mL için</i>
dH ₂ O	9,3 mL
% 30 Akrilamid/Bis akrilamid	5,3 mL
1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)	5,0 mL
% 10 SDS	200 µL
%10 APS	200 µL
TEMED	12 µL

Tablo 6. %5 Paketleyici Jel

<i>Bileşenler</i>	<i>6 mL için</i>
dH ₂ O	4,1 mL
% 30 Akrilamid/Bis akrilamid	1,0 mL
0,5 M Tris-HCL (pH 6,8)	750 µL
% 10 SDS	60 µL
%10 APS	60 µL
TEMED	6 µL

3.6.9.3.2. SDS-Poliakrilamid Jellerin Yürütülmesi

- Hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve tank işaretli yere kadar 1X yürütme taponu (Tablo 7) ile dolduruldu. Jelden tarak çıkarıldı.
- Proteinler jele yüklenmeden önce, ısı bloğunda 95°C’de 5 dakika denatüre edildi. Ardından yüklenene kadar oda sıcaklığında bekletildi.
- Tarak jelden dikkatlice çıkartıldı. Örnekler kuyulara yüklendi. Kuyulardan birine, büyüklüğü belli olan proteinlerin takip edilebileceği şekilde işaretlendiği büyüklük belirteci yüklendi.
- Protein örnekleri paketleyici jelde aynı hizaya gelene kadar 70 V, proteinler ayırıcı jele geçince 110 V gerilim uygulandı. Protein belirtecinde, izlenen büyüklükteki protein yeterince ayrılınca kadar, elektroforeze devam edildi.

Tablo 7. 10X Yürütme Tamponu

<i>Bileşenler (1X)</i>	<i>10X, 1L için</i>
25 mM Tris Baz	30,3 g
192 mM Glisin	144,1 g
% 0,1 SDS (w/v)	10 g

3.6.9.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Proteinler membrana, ıslak transfer yöntemi ile aktarıldı. Jel yüzeyine dik bir elektrik akımı uygulandığında, proteinler negatif yükleri sebebi ile jelden çıkıp, jelin üzerine yerleştirilmiş olan membrana geçer.

- Elektroforez sonrası jel, cam aparatların içerisinden çıkarıldı ve transfer tamponu (Tablo 8) içinde inkübe edildi.
- Membran ve Whatmann kağıtları ayrı kaplarda, 1X transfer tamponu içinde inkübe edildi.
- Islak transfer sistemine ait kasetin siyah tarafı altta kalacak şekilde sırası ile sünger, Whatmann kâğıdı, jel, membran, Whatmann kâğıdı ve sünger kasete yerleştirildi.
- Transfer tankının içerisine, manyetik balık, kaset ve buz kalıbı yerleştirildi, ardından tank 1X transfer tamponu ile işaretli yere kadar dolduruldu.

- Tank bir buz kabı içerisinde manyetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi. Tankın etrafı buzla dolduruldu, manyetik karıştırıcı çalışırken, 2 saat süre ile 250 mA akım uygulandı.

Tablo 8. 10X Transfer Tamponu

<i>Bileşenler (1X)</i>	<i>10X, 1L için</i>
48 mM Tris Baz	58,15 g
39 mM Glisin	29,28 g
% 0,1 SDS (w/v)	3,7 g
% 20 Methanol (v/v)	200 mL

3.6.9.5. Membranın Bloklanması, Primer ve Sekonder Antikorların Bağlanması ve Kemilüminesans Görüntüleme

- Transfer sonrası membran, spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacı ile bloklandı. Membran, ABCG1 için % 5 süt tozu, β -Aktin için ise %5 BSA içeren 1X TBS-T (Tablo 9) içerisine konularak, çalkalayıcıda 2 saat boyunca 20 rpm’de çalkalandı.
- Bloklanan membranlar 1X TBS-T ile 3 kez 5’er yıkandı.
- Primer antikor solüsyonları hazırlandı. ABCG1 antikoru 1:500 oranında %5 süt tozu içeren 1X TBS ile; β -Aktin antikoru ise 1:2000 oranında %5 BSA içeren 1X TBS-T ile dilüe edildi. Membranlar, primer antikor solüsyonları ile birlikte 50 mL’lik tüplere alındı. Bu tüpler roller cihazında döndürülerek +4°C’de bir gece inkübe edildi.
- Membranlar, bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için 1X TBS-T ile 4 kez 10’ar dakika yıkandı.
- Anti-Rabbit sekonder antikoru 1:2000 oranında 1X TBS-T ile dilüe edildi. Membranlar, sekonder antikor solüsyonları ile birlikte 50 mL’lik tüplere alındı. Bu tüpler roller cihazında döndürülerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Membranlar, bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için 1X TBS-T ile 4 kez 10’ar dakika yıkandı.
- Membran kemilüminesans görüntüleme cihazının tablasına yerleştirildi, ECL reaktif membran üzerine yayılarak 1 dakika inkübe edildi ve görüntü alındı.

- Protein bantlarının dansitometrik analizi IMAGE-J programı ile yapıldı.

Tablo 9. TBS-T

<i>Bileşenler (1X)</i>	<i>10X, 1L için</i>
20 mM Tris Baz	24,23 g
137 mM NaCl	80,06 g
% 0,1 Tween-20 (w/w)	3,7 g

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sırasında elde edilen verilerin istatistiksel analizleri IBM SPSS version 25.0 ve GraphPad Prism 7.0 istatistik programları kullanılarak yapılmıştır. Deneylere ait sonuçlar ortalama±standart sapma (SD) ve ortalama±standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. Çoklu grupların birbirleri ile karşılaştırılması ve değerlendirilmesinde “ANOVA”; Gruplar arasındaki farklılıkların anlamlılığının değerlendirilmesinde “student's t” testi kullanılmıştır. Testlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. Korelasyonun gücü, 0,00-0,24 arası zayıf; 0,25-0,49 arası *orta; 0,50-0,74 arası ** güçlü ve 0,75-1,00 arası *** çok güçlü olarak değerlendirilmiştir.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmanın başlangıcında tip 2 diyabetli hasta ve sağlıklı kontrol örneği sayısı 30 olarak planlanmıştır. Ancak Covid-19 pandemisi ve örnek toplamadaki güçlükler ve sebebi ile, 13 diyabetli hasta ve 25 sağlıklı kontrol örneği ile çalışma tamamlanmıştır.

3.9. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulunun, 21/07/2016 tarih ve 2016/20-24 karar numarası ile izin verilmiştir. Daha sonra içerik değişikliği nedeni ile Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulundan 30/01/2019 tarih ve 2019/02-39 karar numarası ile yeniden etik kurul izni alınmıştır (EK-1)

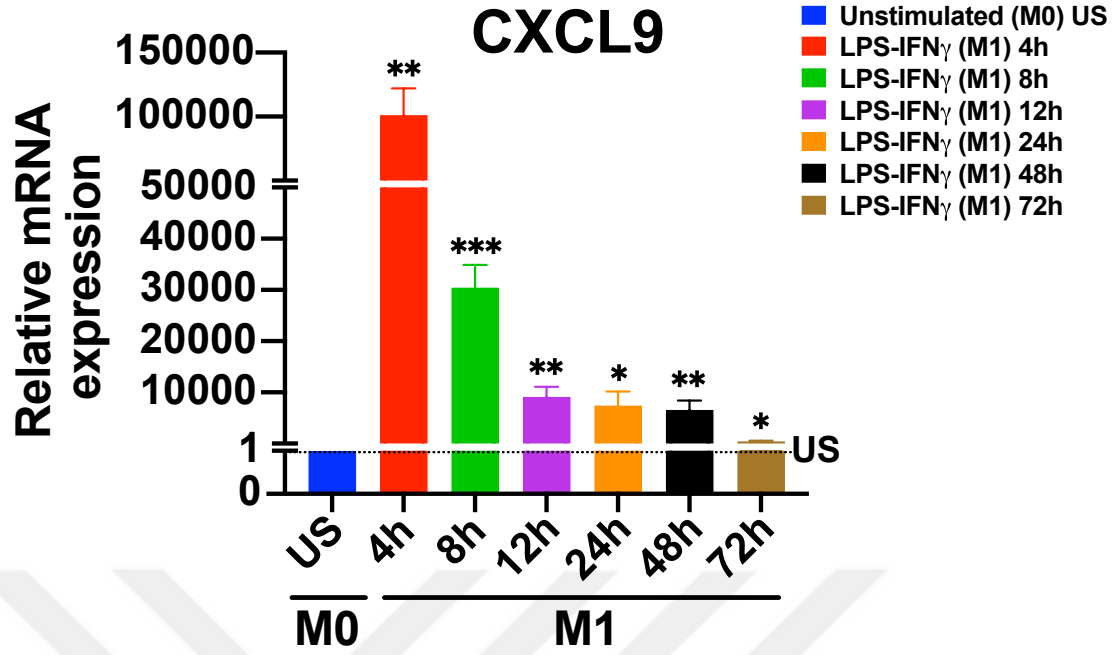
4. BULGULAR

4.1. M1, M2a ve M2c Makrofajlarda Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

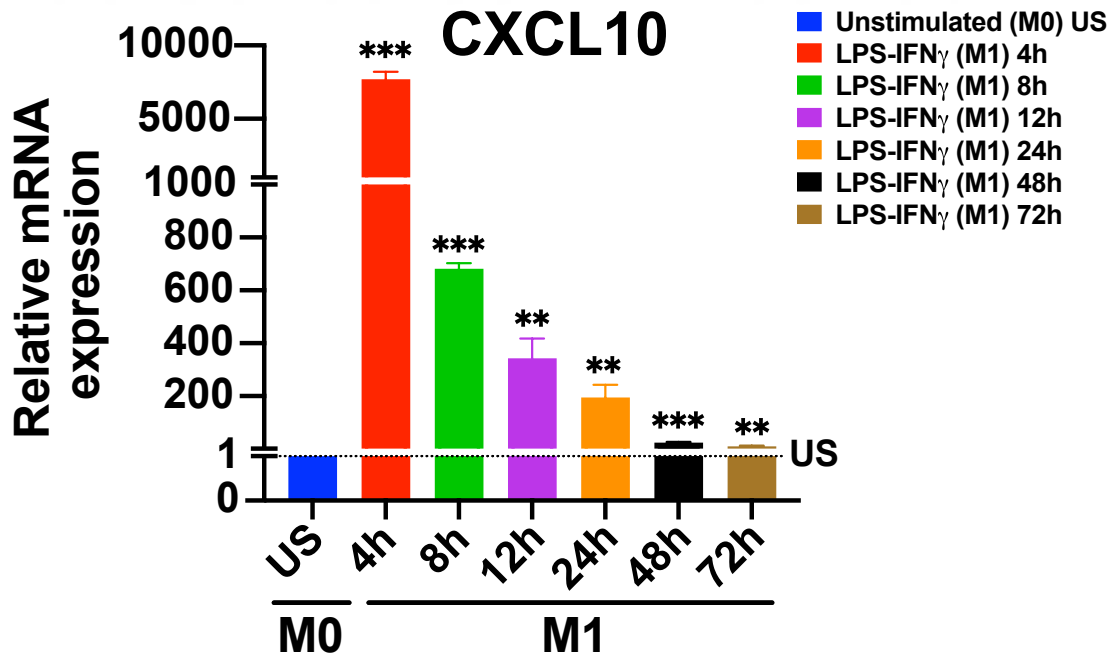
Makrofaj polarizasyonunu gerçekleştiren stimülanların optimum etkiyi gösterdiği uyarım süresinin ve tüm stimülanlar için ortak kullanılabilecek optimum sürenin belirlenmesi amacı ile monositlerinden türetilmiş makrofajlar, M1 polarizasyonu için 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN γ ile, M2a polarizasyonu için 20 ng/mL IL-4 ile, M2c polarizasyonu için ise 20 ng/mL IL-10 ile 4-8-12-16-20-24-48 ve 72 saat boyunca uyarıldı. M1 polarizasyon belirteçleri CXCL9, CXCL10, TNF, IL-1 β , IL-12 ve IDO1; M2a polarizasyon belirteçleri MRC1, TGM2, CCL17, CCL22 ve IL-10; M2c polarizasyon belirteçleri IL10 ve CD163 ve TGF β genlerinin ekspresyonundaki değişim RT-qPCR yöntemi ile belirlendi. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için, referans gen olarak β -Aktin kullanıldı. Uyarım yapılan her saat aralığında polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonundaki değişim; uyarılmış makrofajların, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla (US: Un Stimulated) karşılaştırılması ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak belirlendi (Şekil 3-13). Sunulan veriler; 3 bağımsız donörün ortalamasıdır.

4.1.1. M1 Makrofajlarda Uyarım Süresinin, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

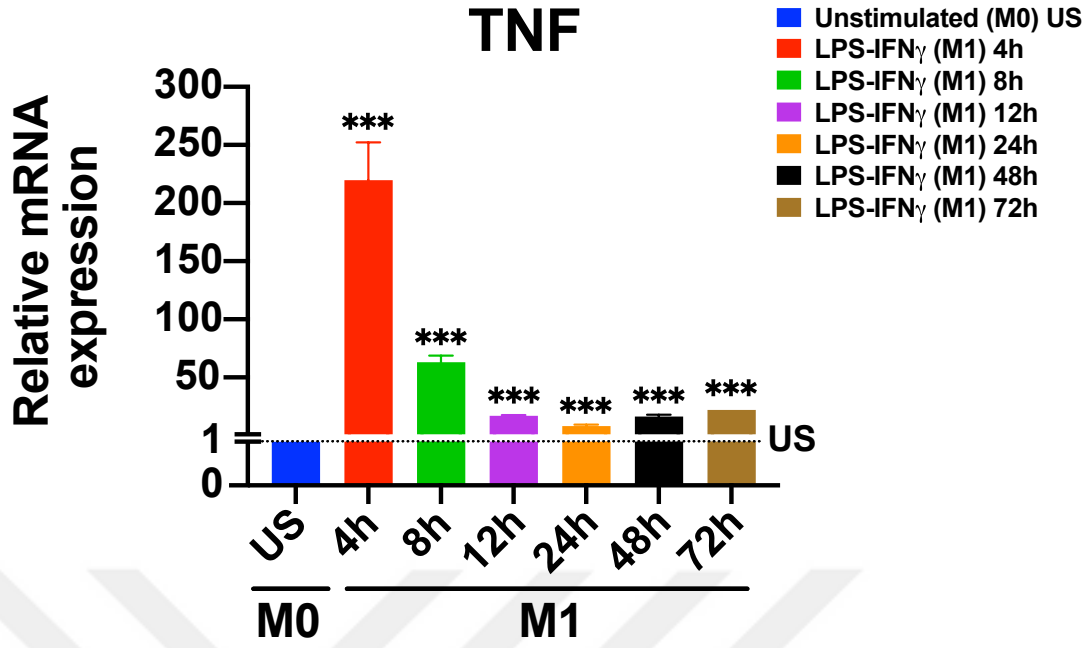
LPS-IFN γ ile M1 fenotipine polarize edilmiş makrofajlar, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla (US) karşılaştırıldı. CXCL9, CXCL10 ve TNF α gen ekspresyonlarındaki en yüksek değişim 4 saatlik uyarımda görüldü, uyarım süresi uzadıkça gen ekspresyonu kademeli olarak düştü (Şekil 13-15). IL-1 β gen ekspresyonu, 4 saatlik uyarımda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ve sonraki uyarım sürelerinde gen ekspresyonu sabit kaldı (Şekil 16). IL-12 gen ekspresyonu, 4 saatlik uyarımdan sonra bazal seviyenin altına düştü, ancak 48 saatten sonra yeniden arttı (Şekil 17). İlginç olarak, uyarım süresi arttıkça IDO1 gen ekspresyon düzeyinde artış görüldü ve en yüksek seviyeye 48-72 saatte ulaştı (Şekil 18). Verilerimiz, mRNA düzeyinde M1 belirteçlerinin eş zamanlı tespiti için optimal uyarım süresinin, 4-8 saat olduğunu göstermektedir.



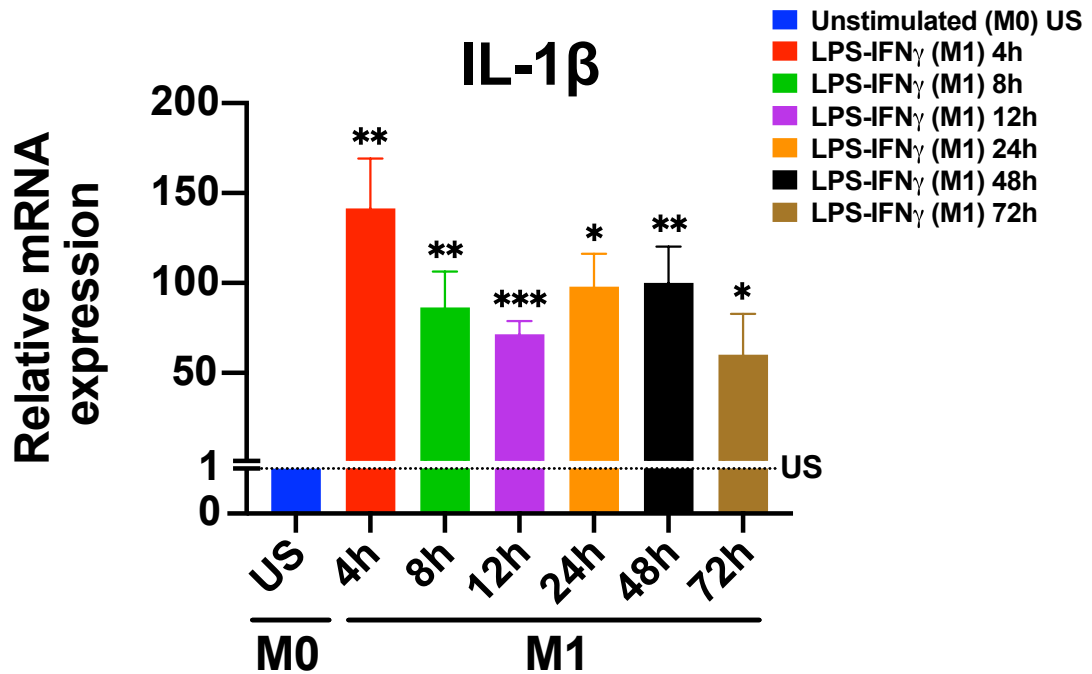
Şekil 13. Uyarım zamanına göre CXCL9 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



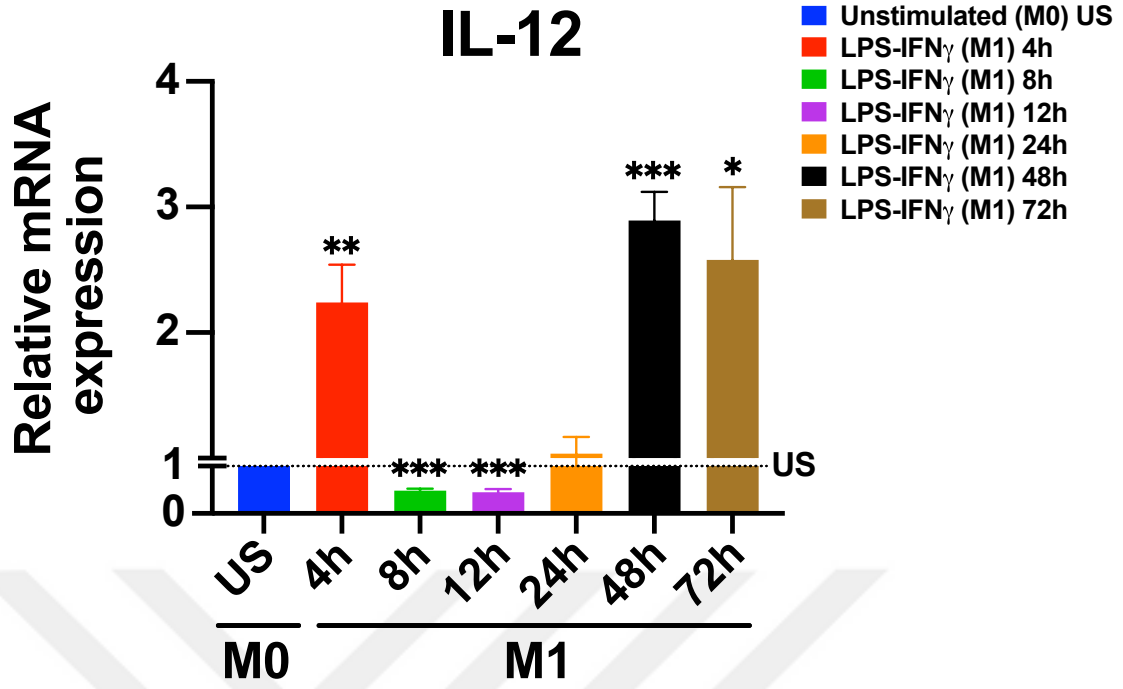
Şekil 14. Uyarım zamanına göre CXCL10 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



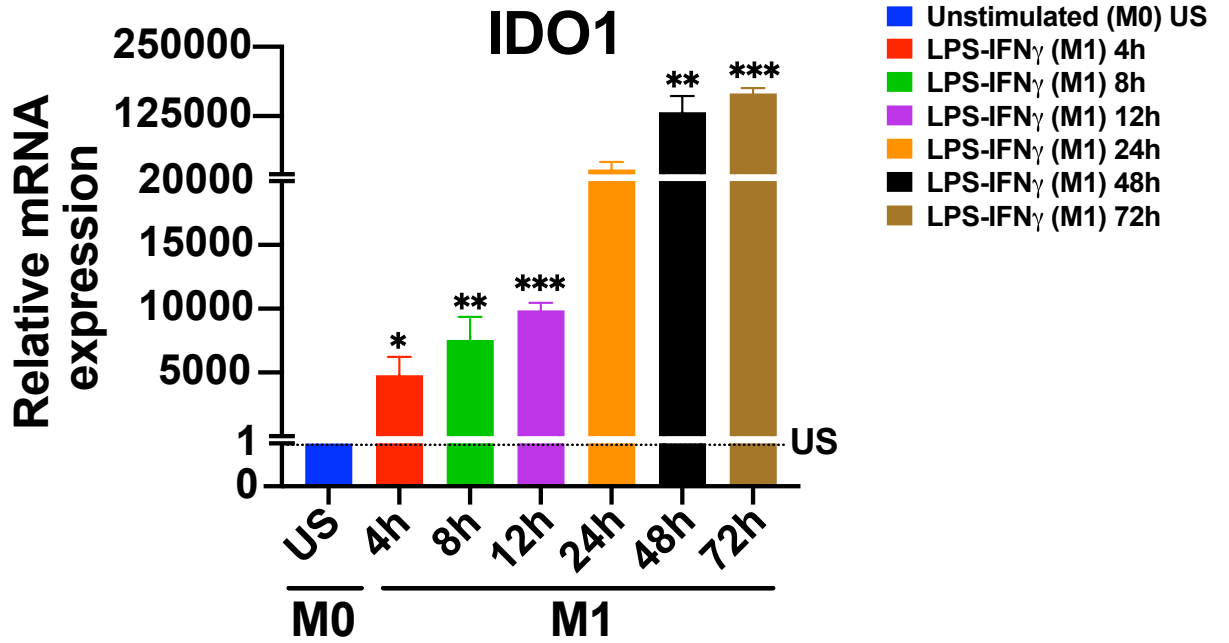
Şekil 15. Uyarım zamanına göre TNF gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



Şekil 16. Uyarım zamanına göre IL-1 β gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



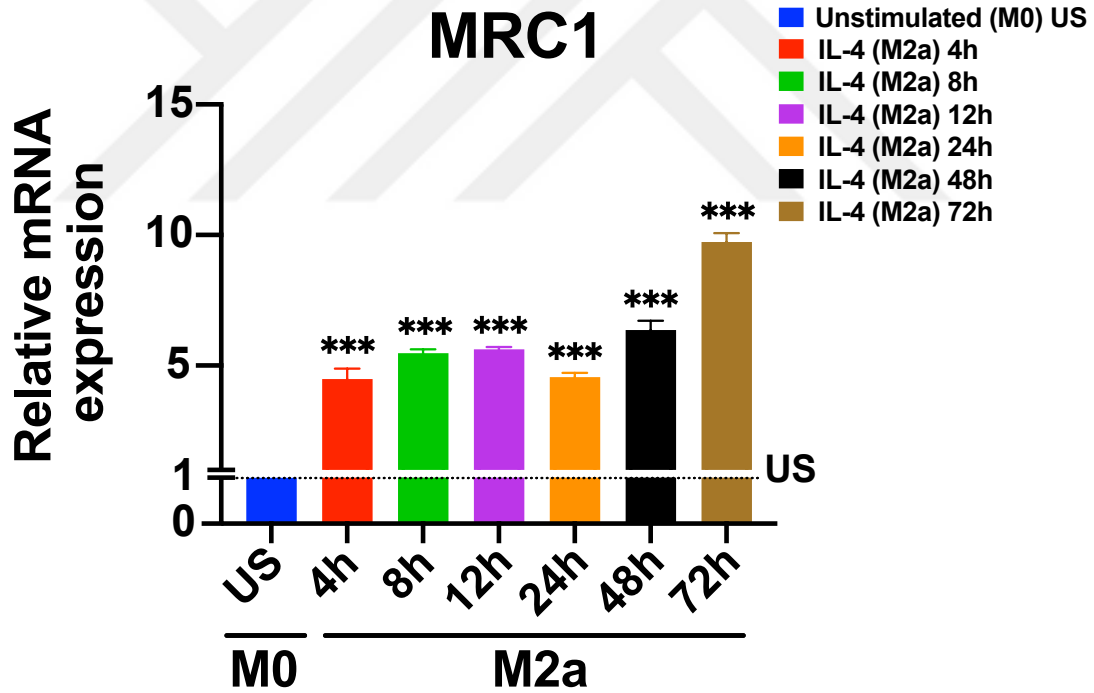
Şekil 17. Uyarım zamanına göre IL-12 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



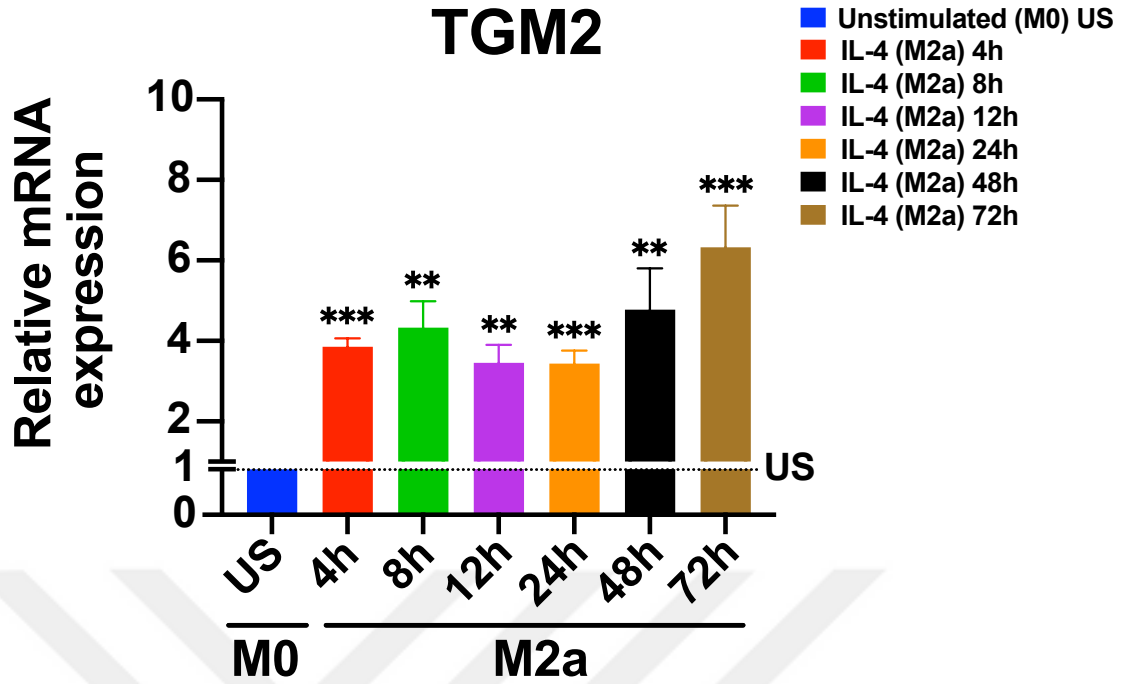
Şekil 18. Uyarım zamanına göre IDO1 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA

4.1.2. M2a Makrofajlarda Uyarım Süresinin, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

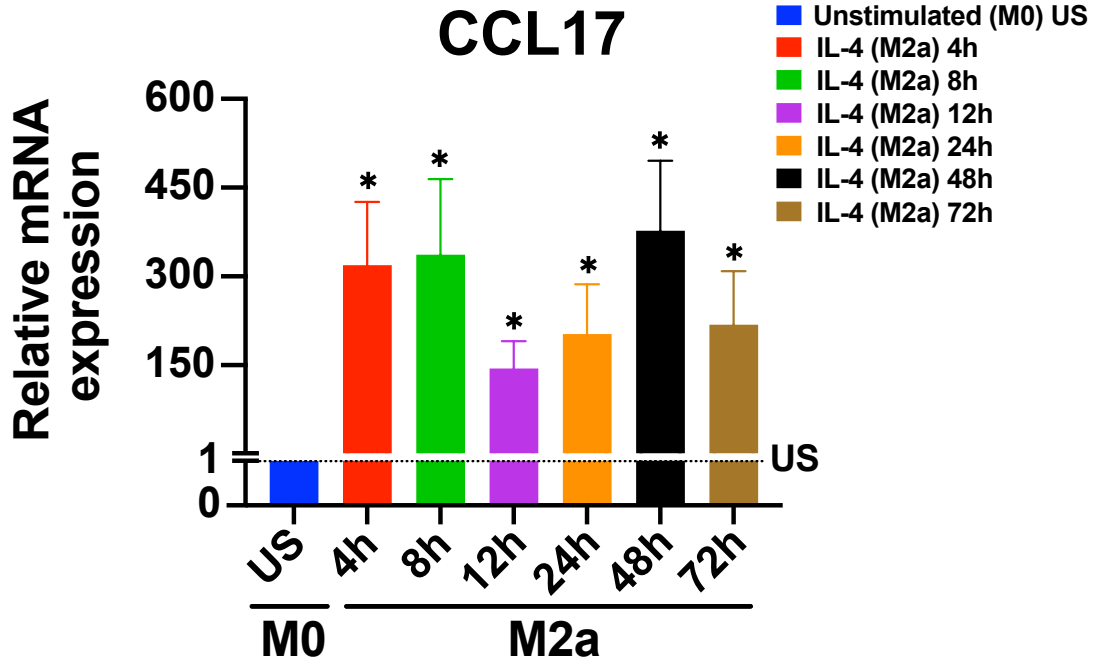
IL4 ile M2a fenotipine polarize edilmiş makrofajlar, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla karşılaştırıldı. MRC1 ve TGM2 gen ekspresyonu 4 saatlik uyarımla arttı ve 48 saatlik uyarıma kadar büyük bir değişim göstermedi, gen ekspresyonlarındaki en büyük artış 72 saatlik uyarımda görüldü (Şekil 19 ve 20). M2a makrofajlarda CCL17 ekspresyonu, kontrol grubuna göre tüm uyarım saatlerinde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 21). CCL22 ekspresyonunun ise 4 saatlik uyarımdan, 48 saatlik uyarıma doğru kademeli bir şekilde arttığı görüldü (Şekil 22). İlginç bir şekilde IL-10 ekspresyonu 4 ile 72 saat arasında kademeli olarak düşmüştür (Şekil 23).



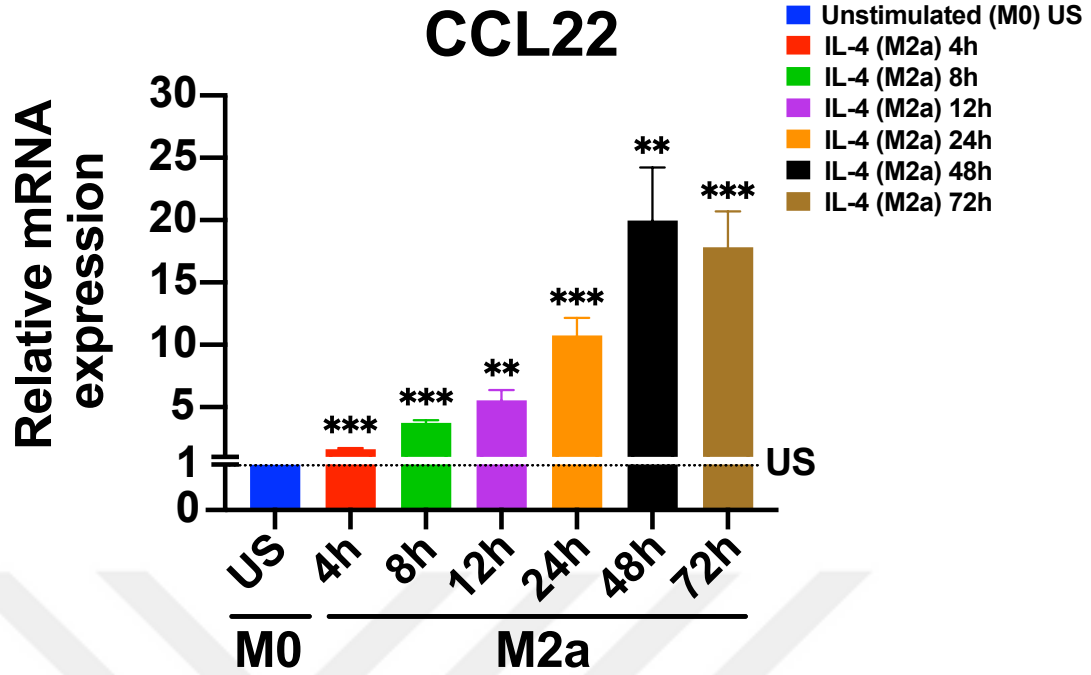
Şekil 19. Uyarım zamanına göre MRC1 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



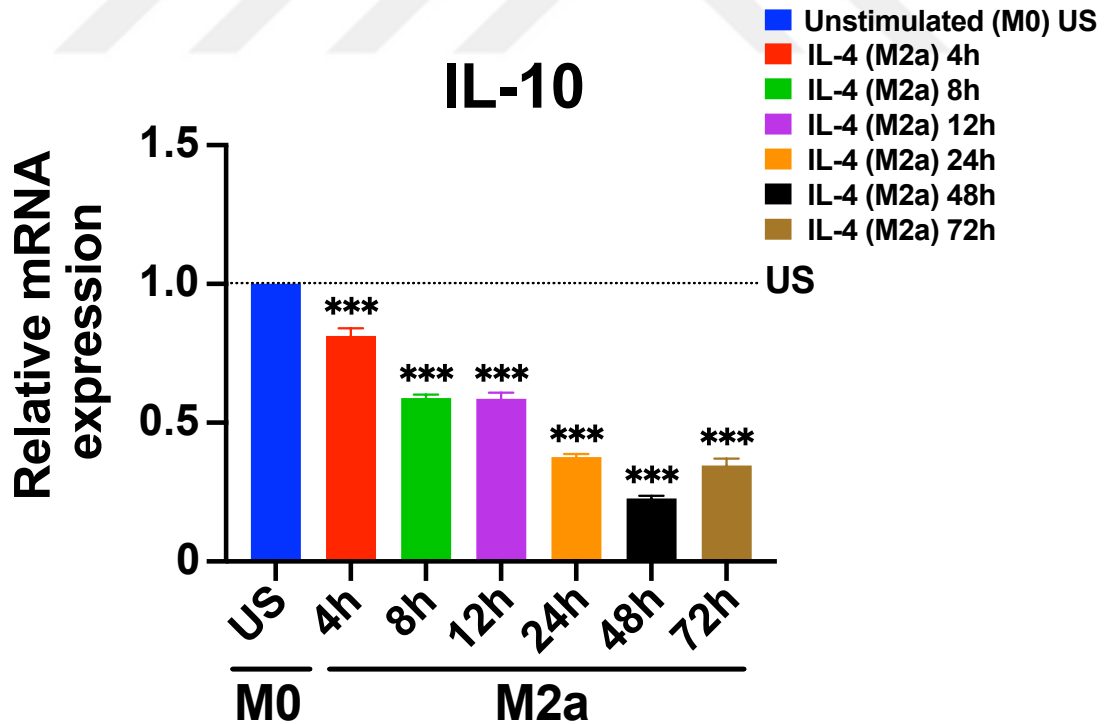
Şekil 20. Uyarım zamanına göre TGM2 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



Şekil 21. Uyarım zamanına göre CCL17 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



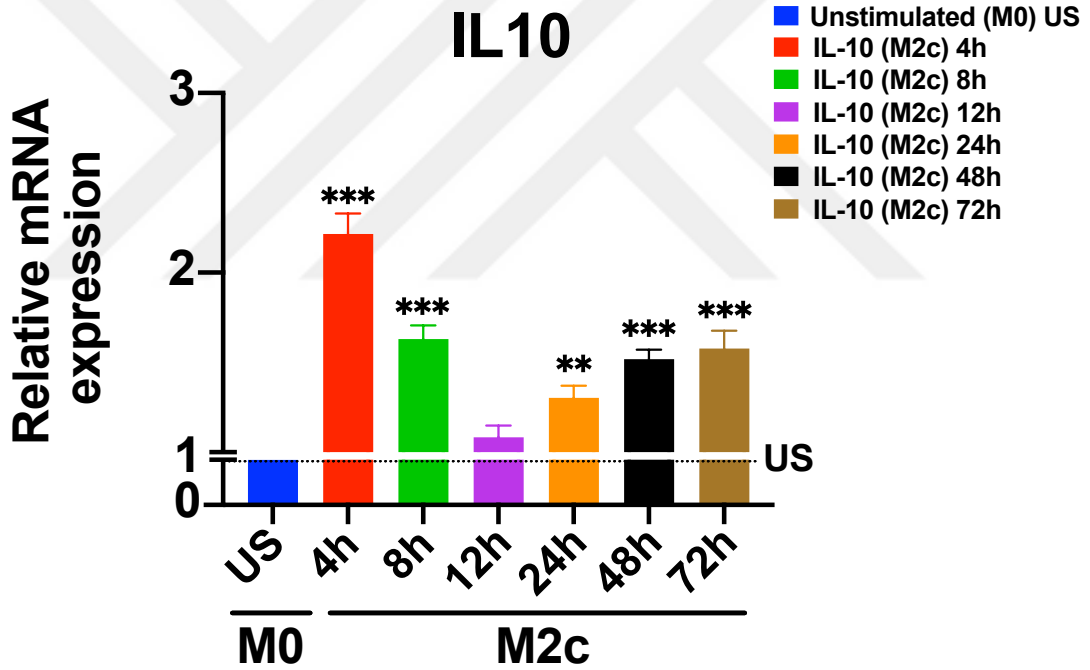
Şekil 22. Uyarım zamanına göre CCL22 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, ANOVA



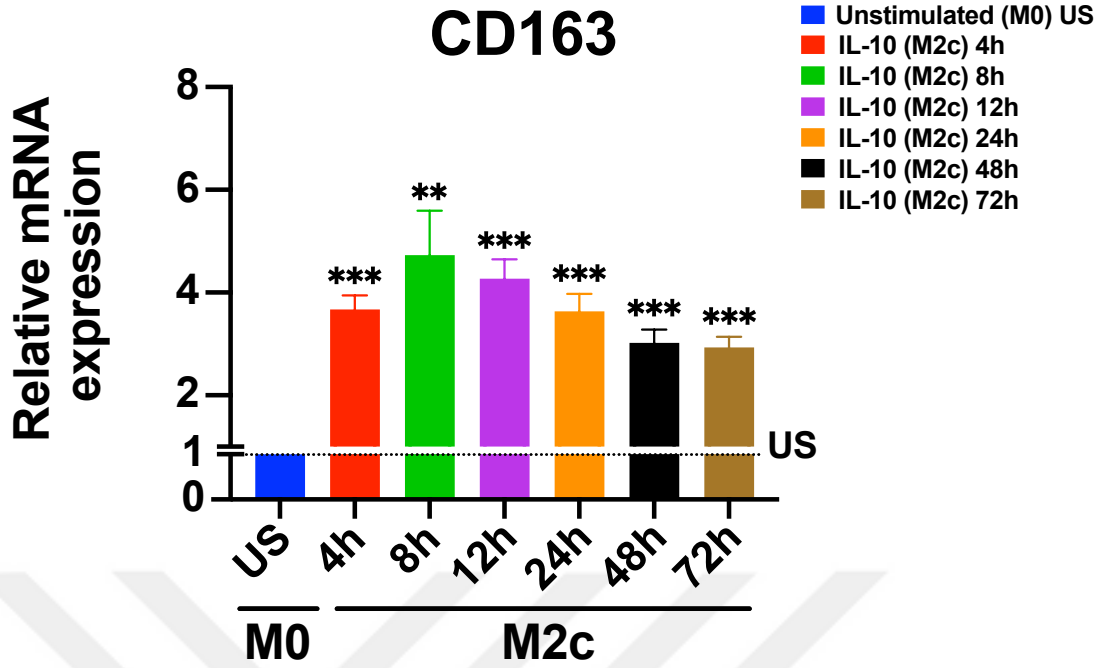
Şekil 23. Uyarım zamanına göre IL-10 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, ANOVA

4.1.3. M2c Makrofajlarda Uyarım Süresinin, Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

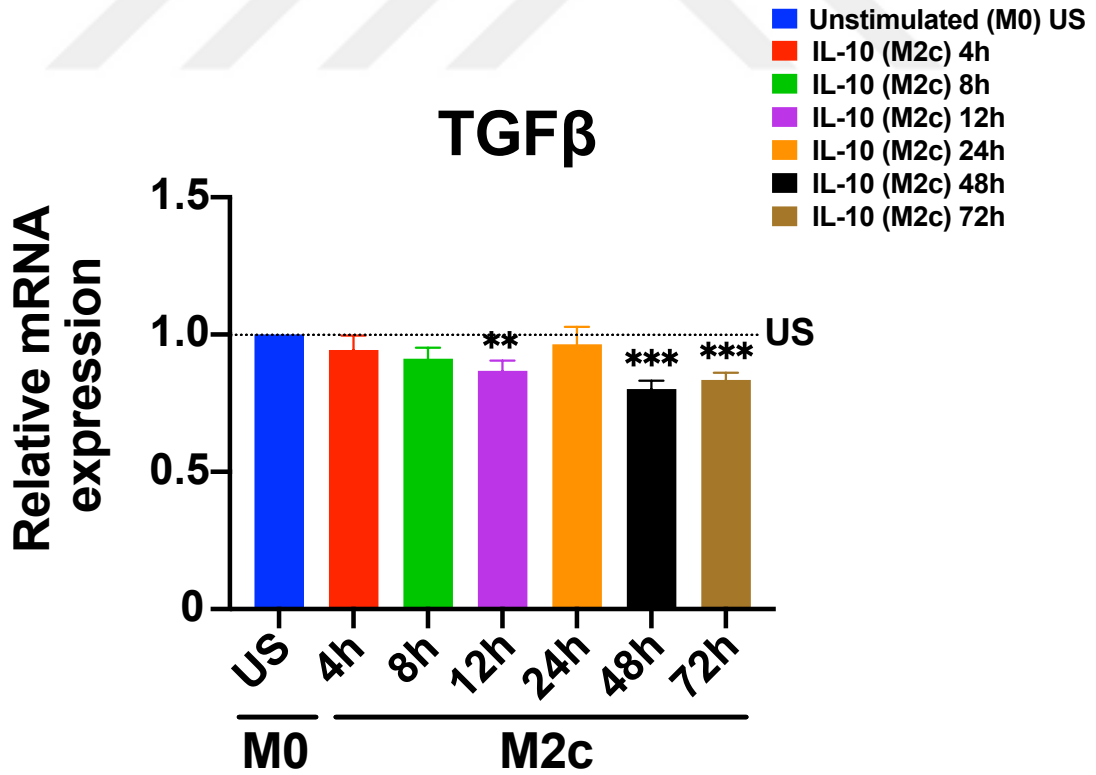
IL10 ile M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla karşılaştırıldı. M2c makrofajlarda, IL-10 gen ekspresyonu en fazla, 4 saatlik uyarımla arttı (Şekil 24). CD163 gen ekspresyonu 4-72 saat arası uyarımla arttı ve tüm saatlerde birbirine yakın ekspresyon düzeyi gözlemlendi (Şekil 25). M2c makrofajlarda, TGF β ekspresyonu, tüm uyarım sürelerinde M0 makrofajlardan düşüktü (Şekil 26).



Şekil 24. Uyarım zamanına göre IL-10 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



Şekil 25. Uyarım zamanına göre IL-10 gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



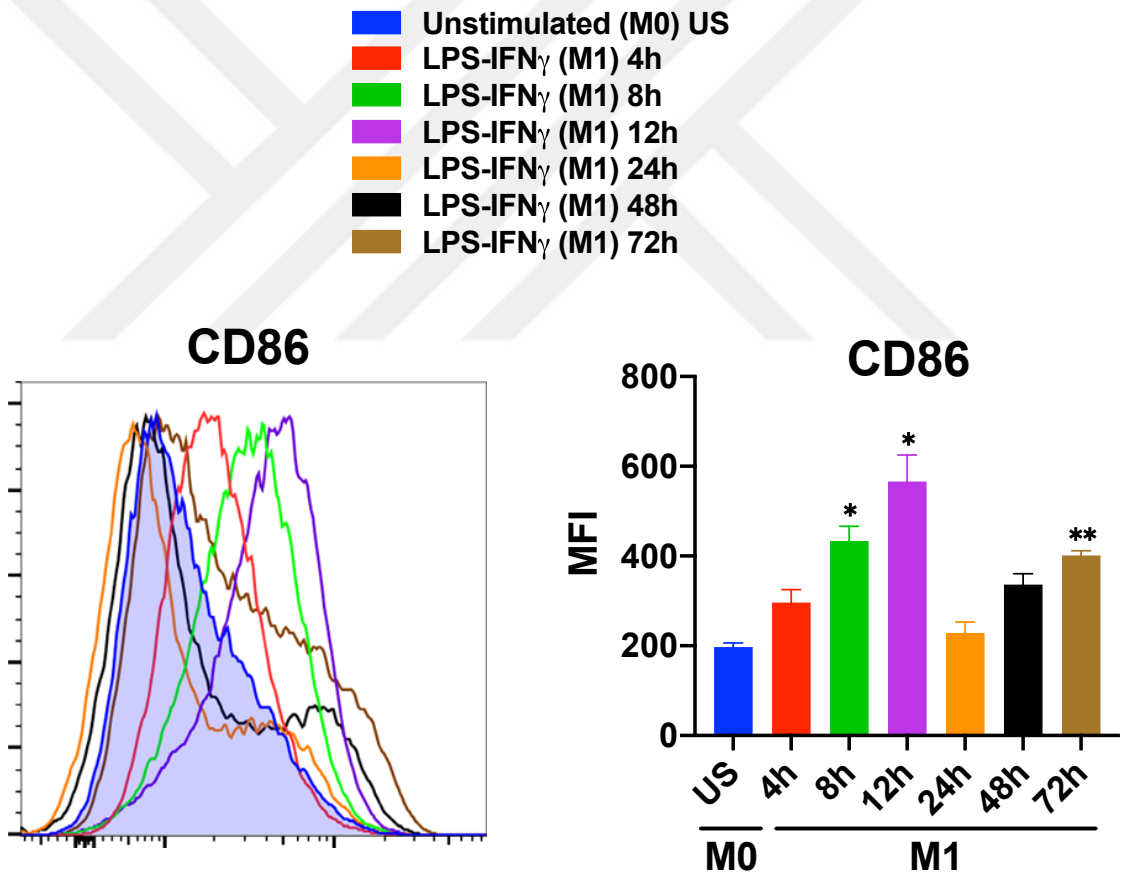
Şekil 26. Uyarım zamanına göre TGF β gen ekspresyonundaki değişim ($2^{-\Delta\Delta CT}$). IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA

Makrofaj polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonu, kullanılan uyarım süresinden büyük ölçüde etkilenmektedir. Ancak literatürde in vitro makrofaj polarizasyonu için, uyarım süresi konusunda fikir birliğine varılamamıştır. Bir belirteç için uygun olmayan, uyarım süresinin kullanımı yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajlarda, makrofaj polarizasyonu için doğru uyarım süresinin kullanılması, deneylerin doğruluğu açısından çok önemlidir. Yapılan deneyler sonucunda uyarım yapılan tüm saat aralıkları değerlendirildiğinde, M1 belirteçlerinin eş zamanlı tespiti için 4-8 saatin, optimum uyarım süresi olduğu belirlenmiştir. M2c belirteçleri için TGF β hariç 4 saatlik uyarım uygun gözükürken, M2c belirteçleri için IL-10 hariç 4-72 saatlik uyarım uygun gözükmemektedir. M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişimi sağlıklı değerlendirebilmemiz için, M1 ve M2 makrofajlarının aynı sürede uyarılmış olması gerekmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında M1 ve M2 polarizasyonu için ortak kullanılacak süre 4 saat olarak belirlendi. Ve bundan sonraki polarizasyon deneylerinde 4 saat olarak kullanıldı. Makrofaj polarizasyonunun kontrolü için M1/M2 belirteçleri, farklı uyarım sürelerinde akış sitometrisi ve ELISA ile de test edildi.

4.2. M1, M2a ve M2c Makrofajlarda Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Yüzey Belirteçlerinin Protein Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimler

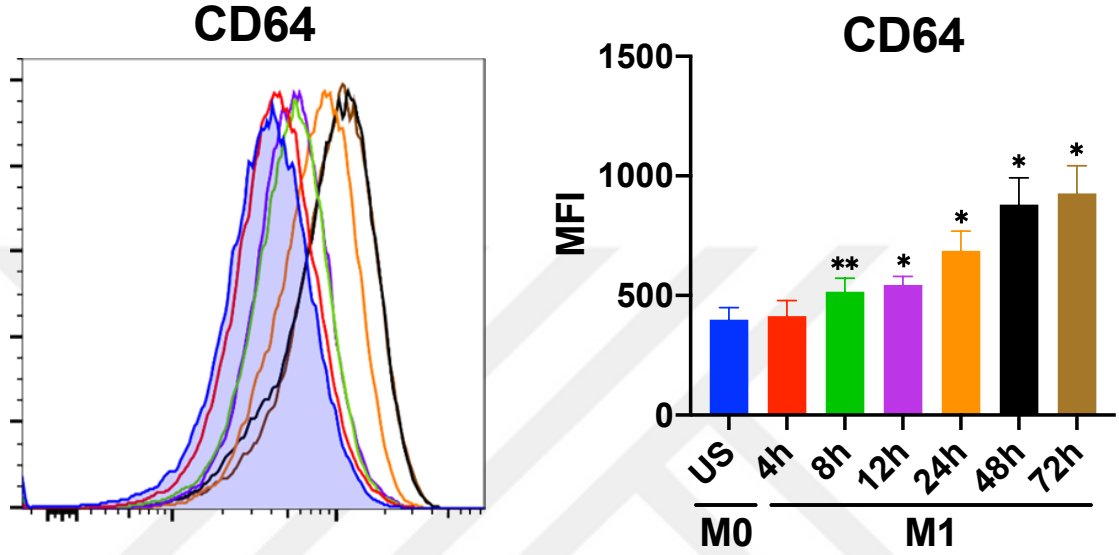
Stimülasyon süresinin yüzey belirteçlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek ve makrofaj polarizasyonunun kontrolü için, monositlerden türetilmiş makrofajlar M1 polarizasyonu için 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN γ ile, M2a polarizasyonu için 20 ng/mL IL-4 ile, M2c polarizasyonu için ise 20 ng/mL IL-10 ile 4-8-12-16-20-24-48 ve 72 saat boyunca uyarıldı. M1 polarizasyon belirteçleri CD86, CD64 ve HLA-DR, M2a polarizasyon belirteçleri CD200R ve CD86 ve M2c polarizasyon belirteci CD163 protein ekspresyonundaki değişim akış sitometrisi yöntemi ile belirlendi. Uyarım yapılan her saat aralığında yüzey belirteçlerinin gen ekspresyonundaki değişim; uyarılmış makrofajların, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla (US: Un Stimulated) karşılaştırılması belirlendi. Sunulan veriler; 3 bağımsız donörün ortalamasıdır.

LPS-IFN γ ile M1 fenotipine polarize edilmiş makrofajlar, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla (US) karşılaştırıldığında CD86 protein ekspresyonu şaşırtıcı bir şekilde 12 ve 72 saat uyarımda artarken 24 saatlik uyarımda azaldı (Şekil 27). CD64 ekspresyonu 8-72 saat arası uyarımla arttı (Şekil 28). HLA-DR ekspresyonu ise sadece 12 saatlik uyarımda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı (Şekil 29). IL4 ile M2a fenotipine polarize edilmiş makrofajlarda ise, CD200R ve CD206 ekspresyonu 8 saatlik uyarımdan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaya başladı ve 48-72 saatlik uyarımlarda en yüksek seviyesine ulaştı (Şekil 30 ve 31). IL-10 ile M2c fenotipine polarize edilmiş makrofajlarda CD163 ekspresyonu 24 saatlik uyarımdan sonra artmakla birlikte, istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (Şekil 32).

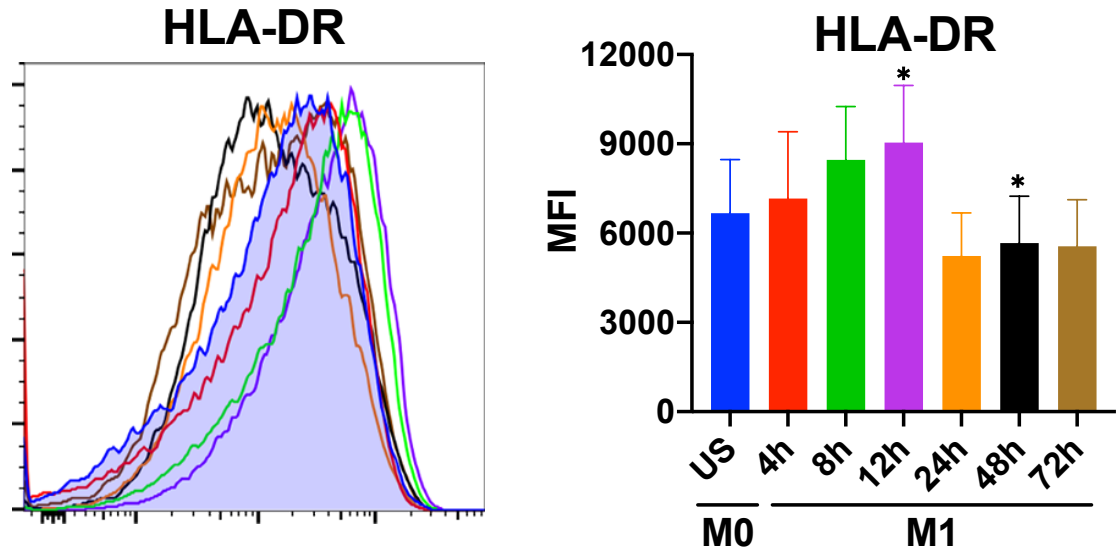


Şekil 27. Zamanla CD86 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA

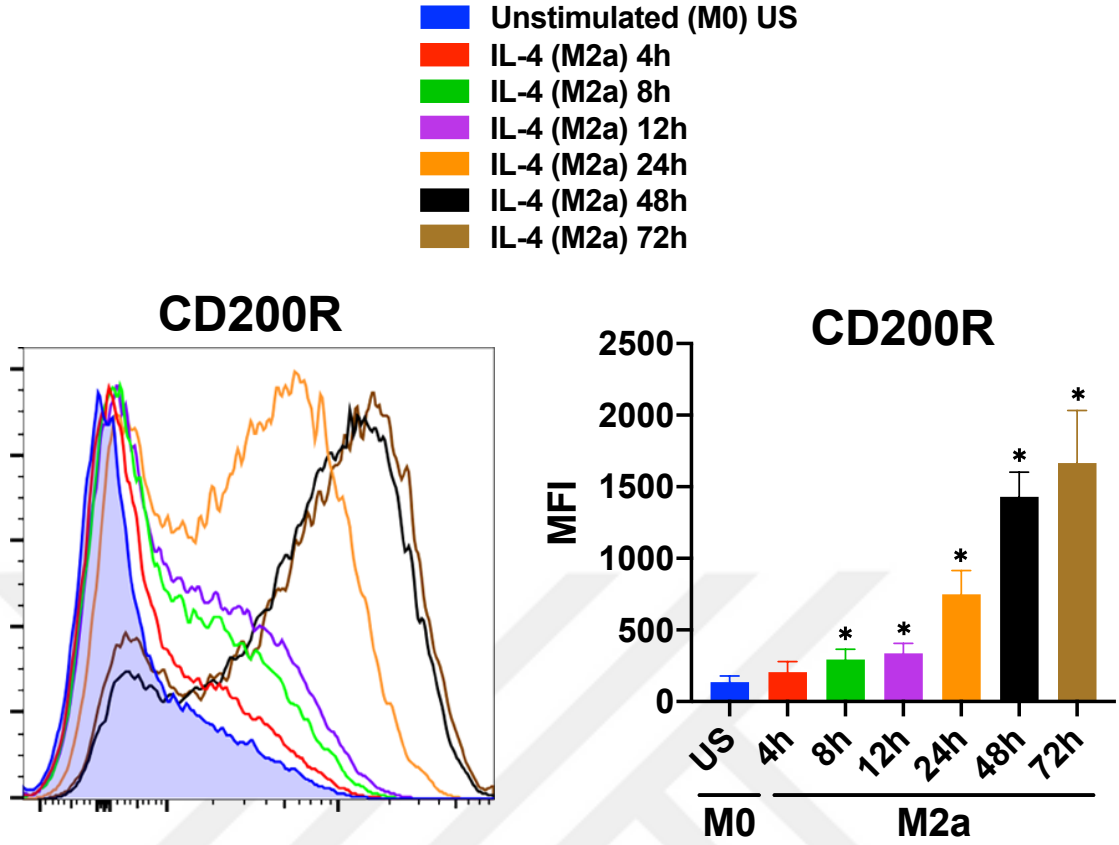
- Unstimulated (M0) US
- LPS-IFN γ (M1) 4h
- LPS-IFN γ (M1) 8h
- LPS-IFN γ (M1) 12h
- LPS-IFN γ (M1) 24h
- LPS-IFN γ (M1) 48h
- LPS-IFN γ (M1) 72h



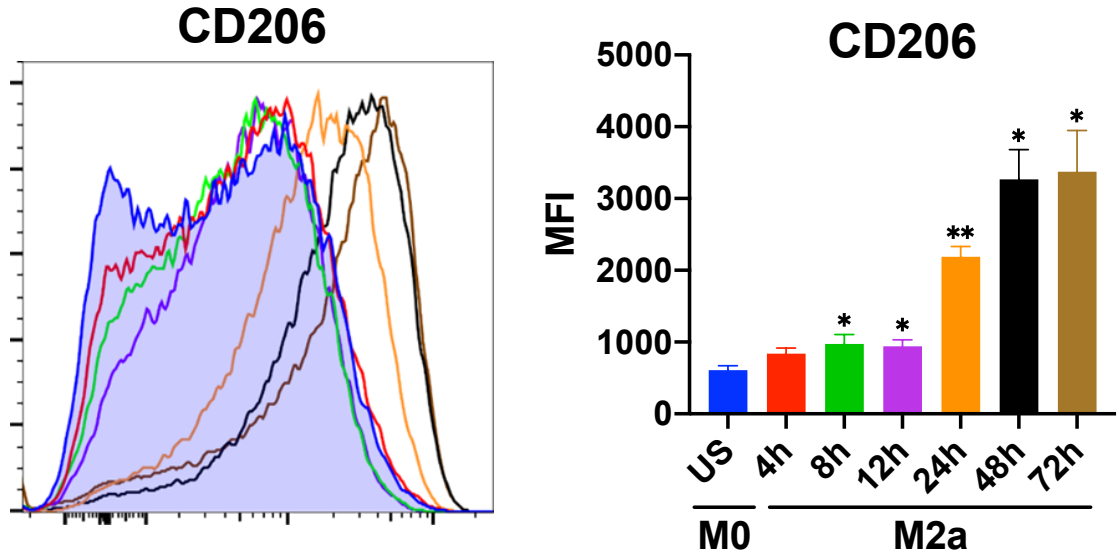
Şekil 28. Zamanla CD64 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



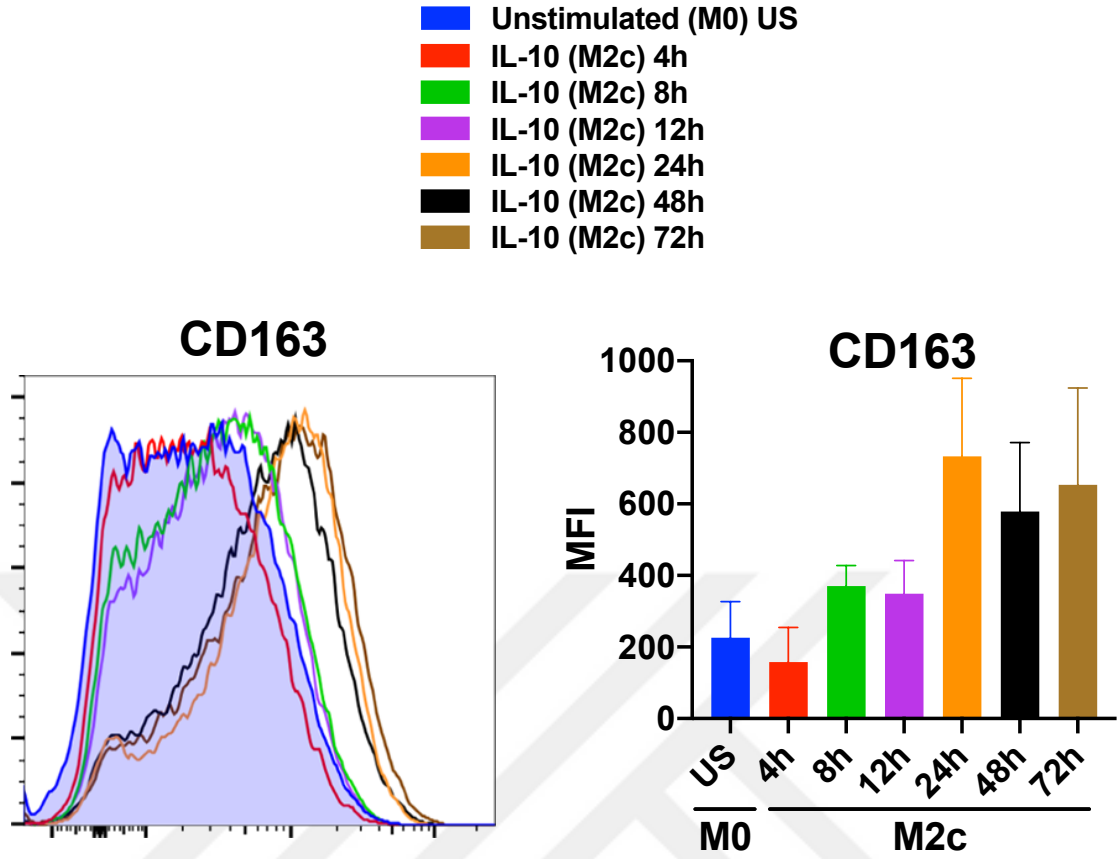
Şekil 29. Zamanla HLA-DR yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



Şekil 30. Zamanla CD200R yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, ANOVA



Şekil 31. Zamanla CD206 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, ANOVA

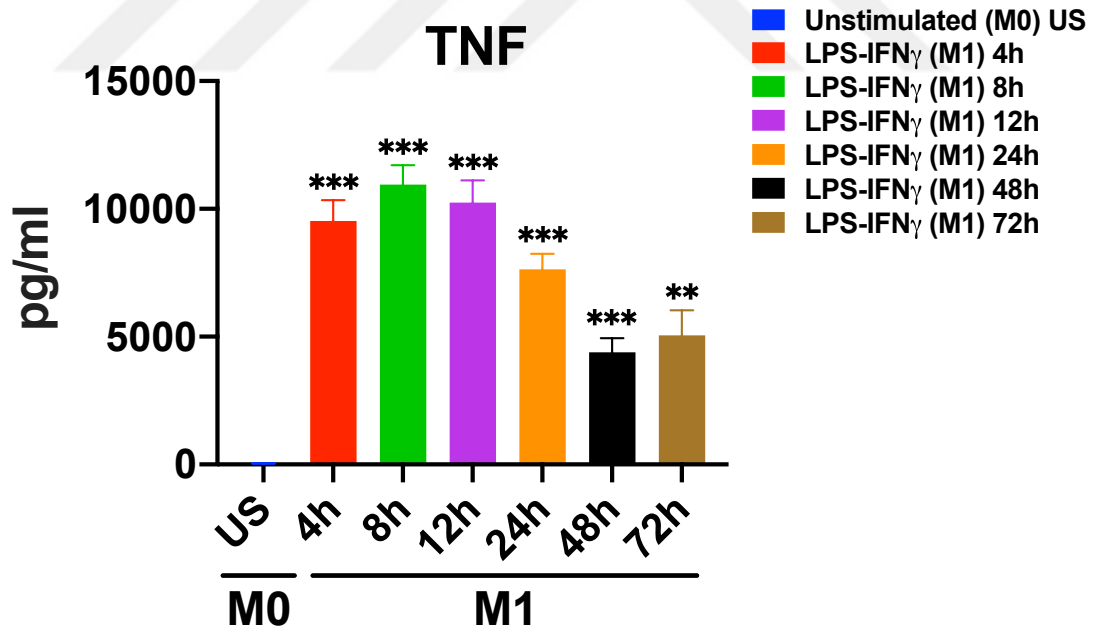


Şekil 32. Zamanla CD163 yüzey belirteci ekspresyonundaki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA

Bu veriler, protein düzeyinde M1 yüzey belirteçleri CD86 ve HLA-DR için 12 saatlik uyarımın en ideal olduğunu, buna karşın M1 belirteci CD64 ve M2 belirteçleri CD200R, CD206 ve CD163 için 24-72 saatlik uyarımın daha uygun olduğunu göstermektedir.

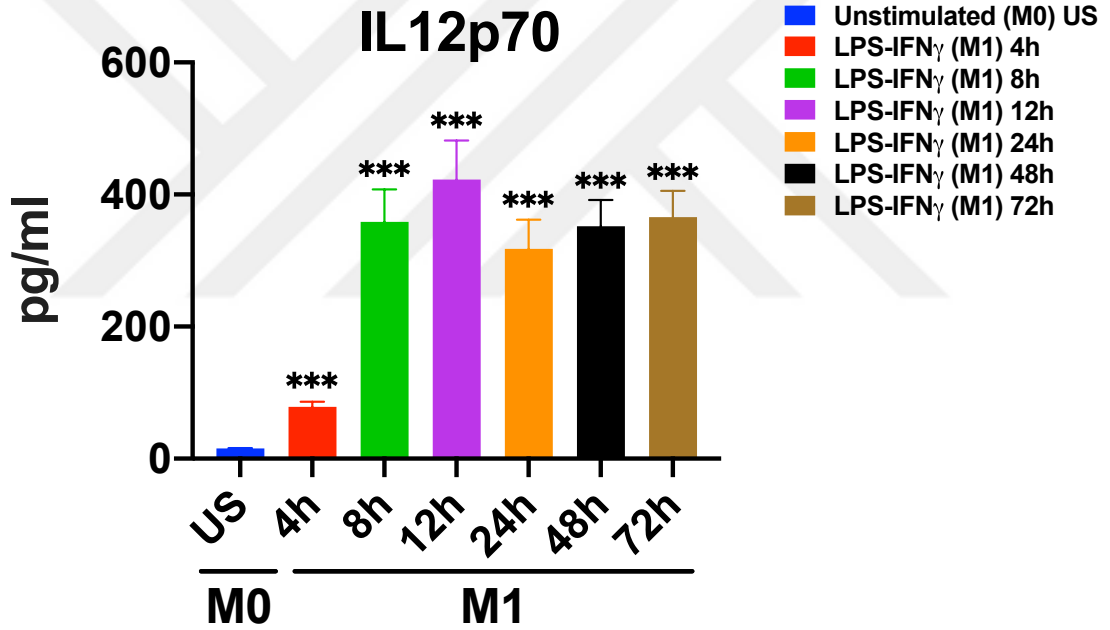
4.3. M1, M2a ve M2c Makrofajlarda Uyarım Süresine Bağlı Olarak, Sitokin Üretim Düzeylerindeki Değişimler

Stimülasyon süresinin makrofajların sitokin üretim düzeyleri üzerindeki etkisini belirlemek ve makrofaj polarizasyonunun kontrolü için, monositlerden türetilmiş makrofajlar M1 polarizasyonu için 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN γ ile, M2a polarizasyonu için 20 ng/mL IL-4 ile, M2c polarizasyonu için ise 20 ng/mL IL-10 ile 4-8-12-16-20-24-48 ve 72 saat boyunca uyarıldı. M1 polarizasyon belirteçleri CD86, CD64 ve HLA-DR, M2a polarizasyon belirteçleri CD200R ve CD86 ve M2c polarizasyon belirteci CD163 protein ekspresyonundaki değişim ELISA yöntemi ile belirlendi. Uyarım yapılan her saat aralığında makrofajların sitokin üretim düzeylerindeki değişim; uyarılmış makrofajların, kontrol grubundaki uyarılmamış M0 makrofajlarla (US: Un Stimulated) karşılaştırılması belirlendi. Sunulan veriler; 3 bağımsız donörün ortalamasıdır.



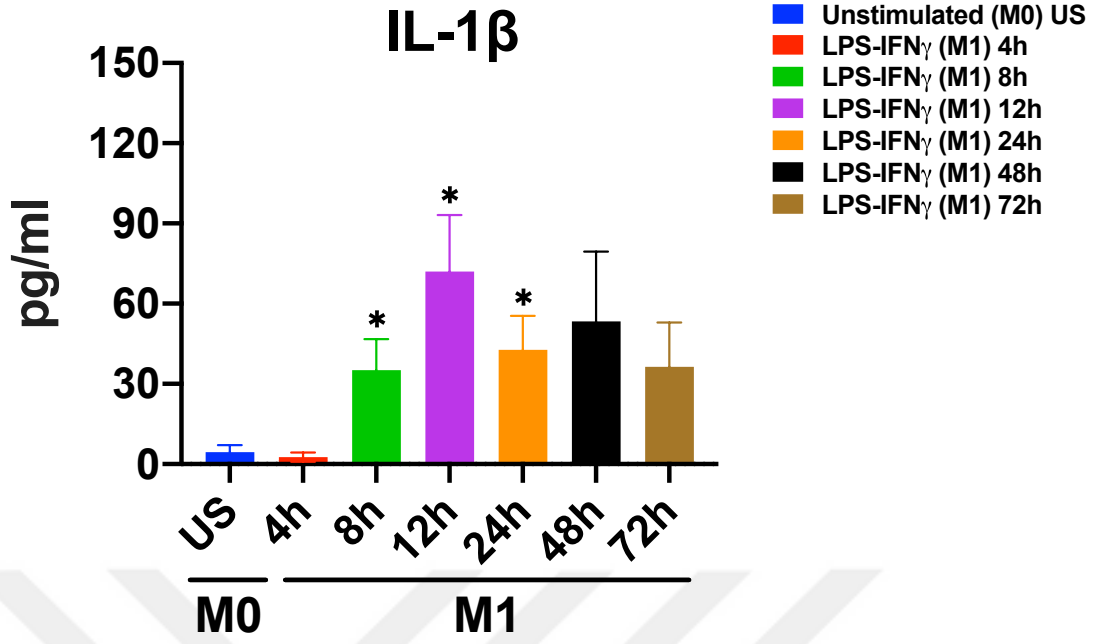
Şekil 33. Zamanla TNF sitokin üretimindeki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA

M1 makrofajlarda TNF üretimi, 4-12 saatlik uyarımda en yüksek seviyede olmakla birlikte, 24-48 saatlik uyarımlarda da mevcuttu (Şekil 33). IL-12 üretimi 4 saatlik uyarımda düşüktü, ancak 8-72 saat arası uyarımda belirgin ve stabildi (Şekil 34). Buna karşılık IL-1 β üretimi 8-24 saat arası uyarımda istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttı (Şekil 35). M2a makrofajlarda IL-10 üretimi 48 ve 72 saatlik uyarımlarda gözlenirken, M2c makrofajlarda TGF β üretimi 72 saatlik uyarımda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Şekil 36-37)



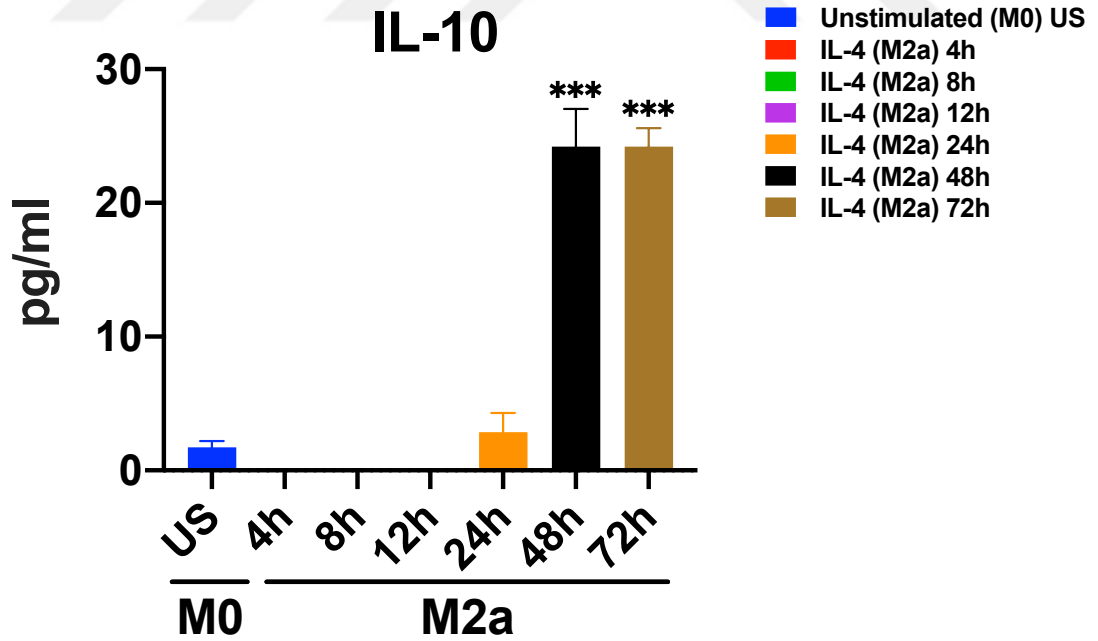
Şekil 34. Zamanla IL12p70 sitokin üretimindeki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama $\pm$ Standart Hata, ANOVA



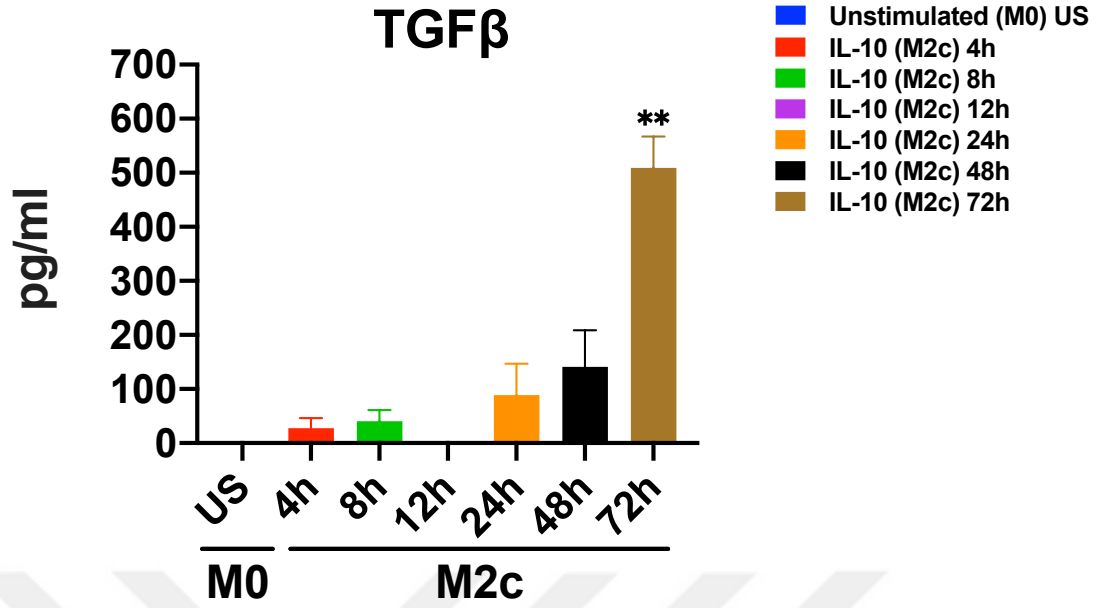
Şekil 35. Zamanla IL1 β sitokin üretimindeki değişim. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Hata, ANOVA



Şekil 36. Zamanla IL-10 sitokin üretimindeki değişim. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Hata, ANOVA



Şekil 37. Zamanla TGFβ sitokin üretimindeki değişim. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar ile kontrol grubundaki uyarılmamış (US) M0 makrofajlar karşılaştırıldı.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, ANOVA

Bu veriler, M1 sitokinleri IL-1β, IL-12p70 ve TNF'nin eşzamanlı tespiti için 8-24 saatlik uyarımın en uygun olduğunu gösterirken, M2 sitokinleri IL10 ve TGFβ'nin tespiti için 72 saatlik uyarımın gerektiğini göstermektedir.

4.4. Makrofajlarda siRNA ile ABCG1 Ekspresyonunun Baskılanması

ABCG1'in insan makrofajlarındaki rolünü tespit etmek amacı ile, ABCG1 ekspresyonu siRNA ile baskılandı. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajlar ve kontrol grubu, polarizasyon faktörleri ile M1 ve M2 fenotipine polarize edildi. Ardından polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonu RT-qPCR ile belirlendi.

4.4.1. siRNA Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan olan Accell siRNA'lar, primer makrofajlar gibi transfeksiyonu zor olan hücrelerde bile, başarılı siRNA transfeksiyonu sağlamaktadır. Accel siRNA, herhangi bir transfeksiyon solüsyonuna ya da viral vektör sistemine ihtiyaç duymaksızın, hücreye direk olarak girebilmektedir. Bu sayede transfeksiyon

solüsyonlarından kaynaklanan toksisite ya da viral vektör sistemlerinden kaynaklanan istenmeyen viral cevaplar elemine edilebilmektedir.

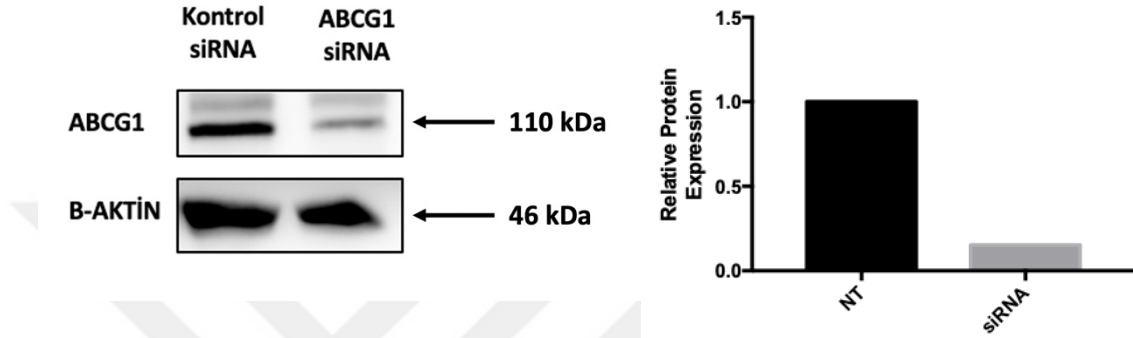
siRNA uygulamalarında üretici firma, kullanılacak hücrelerin %70-80 yoğunluğa ulaşmış olmasını ve kültür ortamında serum kullanılmamasını; kullanılması gerekiyorsa da maksimum %2,5 oranında kullanılmasını önermiştir. Normalde monosit ve makrofajların idamesinde, standart olarak %5 FBS içeren RPMI 1640 kültür ortamı kullanılmıştır. siRNA deneylerinde kullanılacak hücre sayısı ve FBS dozlarının optimizasyonu için, 24 kuyulu plaklara 3×10^5 , 6×10^5 , 9×10^5 ve 12×10^5 makrofaj, %0, %1, %1.5, %2, %2.5 ve %5 FBS içeren kültür ortamı kullanılarak ekildi. Tüm makrofaj grupları 72 saat boyunca gözlemlendi. Farklı dozlardaki FBS serilerinde, hücre canlılığı ve morfolojisi açısından bir fark görülmedi. 24 kuyulu plaklarda 3×10^5 makrofaj yaklaşık %50 yoğunlukta, 6×10^5 makrofaj yaklaşık %90-100 yoğunlukta idi. Bu nedenle üretici firmanın önerisi olan %70-80 yoğunluğu sağlamak için, 5×10^5 makrofaj ile deneylere devam edilmesine karar verildi.

Serum içermeyen kültür ortamına ekilip idame ettirilmiş makrofajlara, FBS'in ekleneceği zamanın belirlenmesi için, makrofajlar 24 kuyulu plaklara, her kuyucukta 5×10^5 makrofaj olacak şekilde, FBS içermeyen kültür ortamında ekildi. Makrofajların ortamı 8., 24. ve 48. saatlerde, %0, %1, %1.5, %2, %2.5 ve %5 FBS içeren kültür ortamları ile değiştirildi. Tüm makrofaj grupları 72 saat boyunca gözlemlendi. Farklı saatlerde ve farklı dozlarda eklenen FBS'in makrofajların canlılığı üzerine bir etkisi olmadığı gözlemlendi.

siRNA deneylerinde, makrofajların siRNA ile muamele edildiği 72 saat içerisinde farklı zaman noktalarında ve farklı konsantrasyonlarda FBS eklenerek, siRNA verimliliği RT-qPCR ile kontrol edildi. siRNA verimliliğinin en yüksek ve tutarlı olduğu koşulun; siRNA muamelesinden 8 saat sonra, ortamın son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde ve 48 saat sonra, ortamın son konsantrasyonu %1 olacak şekilde, FBS eklenen koşul olduğuna karar verildi. siRNA deneylerine bu şekilde devam edildi.

4.4.2. ABCG1 Ekspresyonunun Baskılanmasının Protein Düzeyinde Gösterilmesi

Primer makrofajların ABCG1 ekspresyonu, Accell siRNA kullanılarak baskılandı. ABCG1 siRNA ve kontrol (Non-Target: NT) siRNA protein ekspresyonu arasındaki farklılık, Western Blot yöntemi ile gösterildi (Şekil 38).



Şekil 38. Primer insan makrofajlarında ABCG1 ekspresyonu, ABCG1 siRNA grubunda kontrol siRNA grubuna göre baskılanmıştır.

4.4.3. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda Polarizasyon

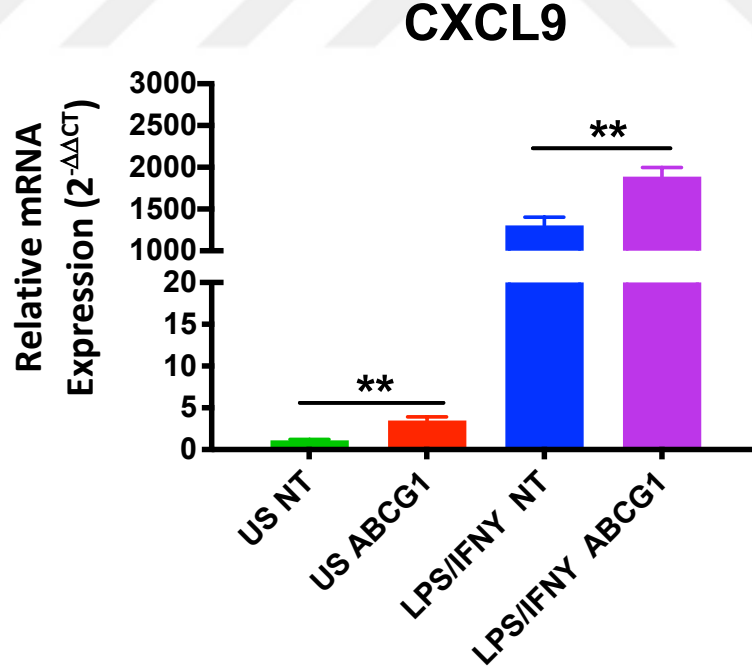
Makrofajlarda ABCG1 ekspresyonunun baskılanmasının makrofaj polarizasyonuna etkilerini incelemek için, öncelikle makrofaj polarizasyonunu sağlayan stimulanların en etkili olduğu uyarım süresinin belirlenmesi gerekiyordu. Önceki basamaklarda farklı uyarım süreleri ve makrofaj polarizasyonu test edildi. Bu deneyler ışığında, gen ekspresyonu düzeyinde polarizasyon belirteçlerinin tespiti için 4 saatlik uyarımın en uygun süre olduğuna karar verildi.

Monositlerden türetilmiş primer insan makrofajları 72 saat süre ile ABCG1 siRNA ve kontrol siRNA (NT; Non Target) ile muamele edildikten sonra, M1 polarizasyonu için 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFN γ ile, M2a polarizasyonu için 20 ng/mL IL4 ile ve M2c polarizasyonu için 20 ng/mL IL10 ile 4 saat boyunca uyarıldı. M1 polarizasyon belirteçleri CXCL9, CXCL10, TNF ve IDO1; M2a polarizasyon belirteçleri MRC1, TGM2, CCL17 ve CCL22; M2c polarizasyon belirteçleri IL10 ve CD163 genlerinin ekspresyonundaki değişim RT-qPCR yöntemi ile belirlendi. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için, referans gen olarak β -Aktin kullanıldı. Polarizasyon belirteçlerin gen ekspresyonundaki değişim; ABCG1 siRNA uygulanmış

makrofajların, kontrol grubundaki NT siRNA uygulanmış ve uyarılmamış makrofajlarla (US NT: Unstimulated, Non-target) karşılaştırılması ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak belirlendi. Deneyler en az üç kez tekrarlandı. Sunulan grafikler temsili bir deneye ait grafiklerdir.

4.4.3.1. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda, M1 Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim

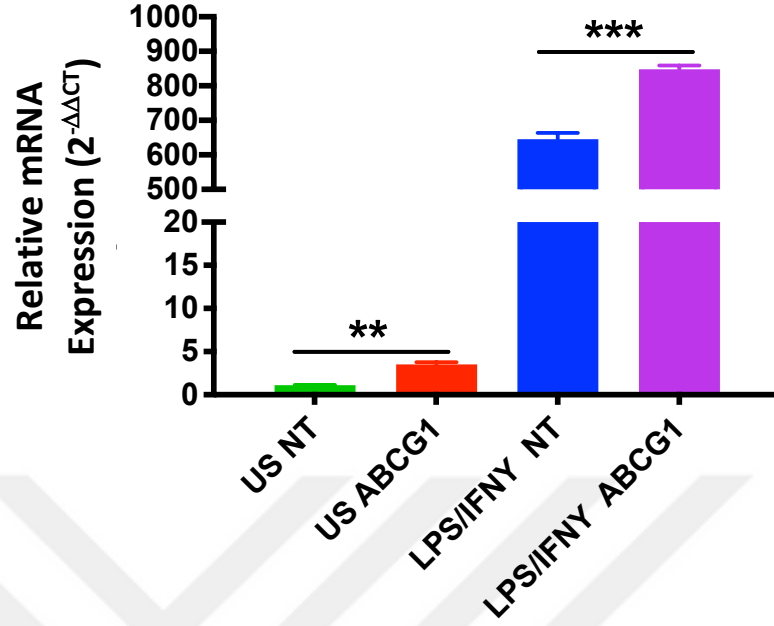
Hem uyarılmamış M0 makrofajlarda, hem de LPS ve IFN γ ile M1 fenotipine polarize olmuş makrofajlarda, ABCG1 ekspresyonu baskılanan makrofajlar, kontrol siRNA grubu (US NT) ile karşılaştırıldığında; M1 belirteçleri CXCL9, CXCL10, TNF α ve IDO1 genlerinin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (Şekil 39-42).



Şekil 39. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CXCL9 gen ekspresyonundaki değişim.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Sapma, Student's t test

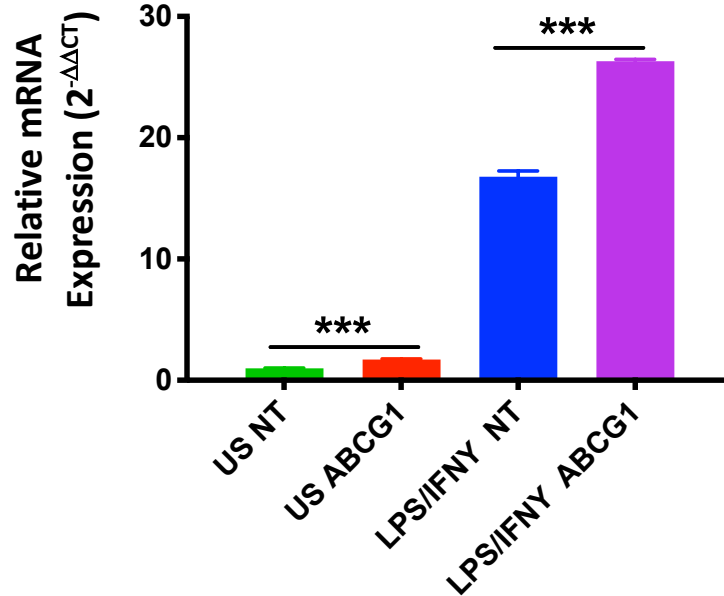
CXCL10



Şekil 40. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CXCL10 gen ekspresyonundaki değişim.

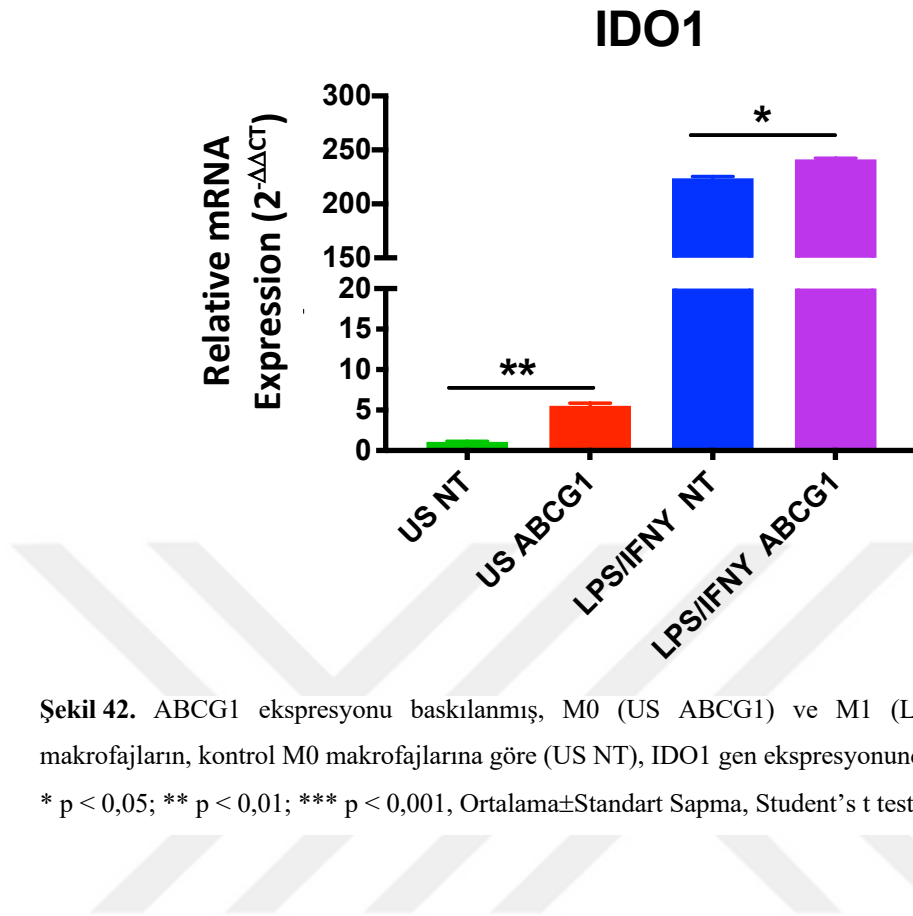
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

TNF



Şekil 41. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), TNF gen ekspresyonundaki değişim.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

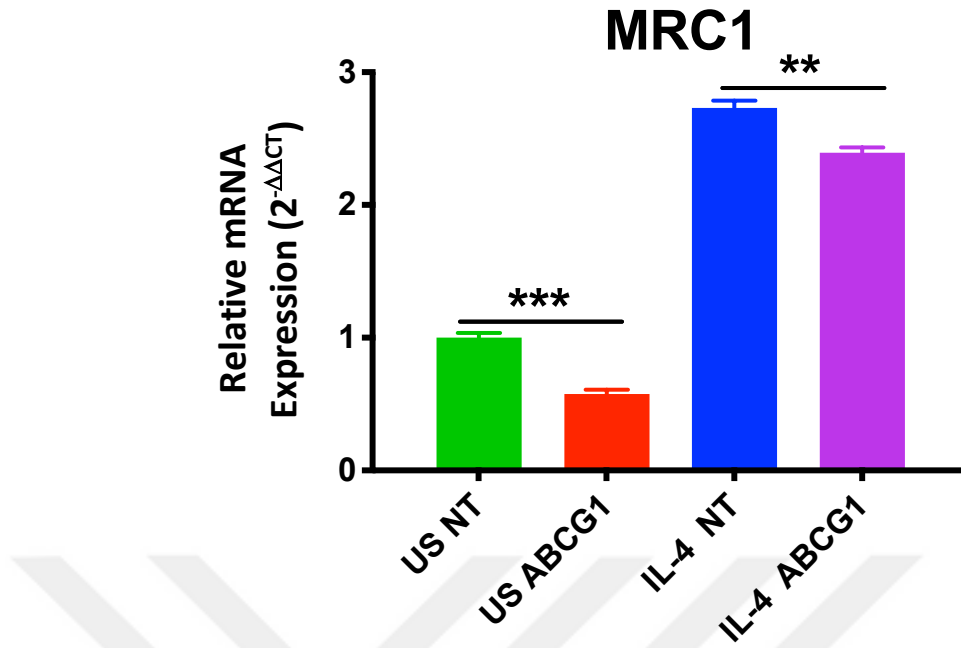


Şekil 42. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M1 (LPS/IFN γ ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), IDO1 gen ekspresyonundaki değişim.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama $\pm$ Standart Sapma, Student's t test

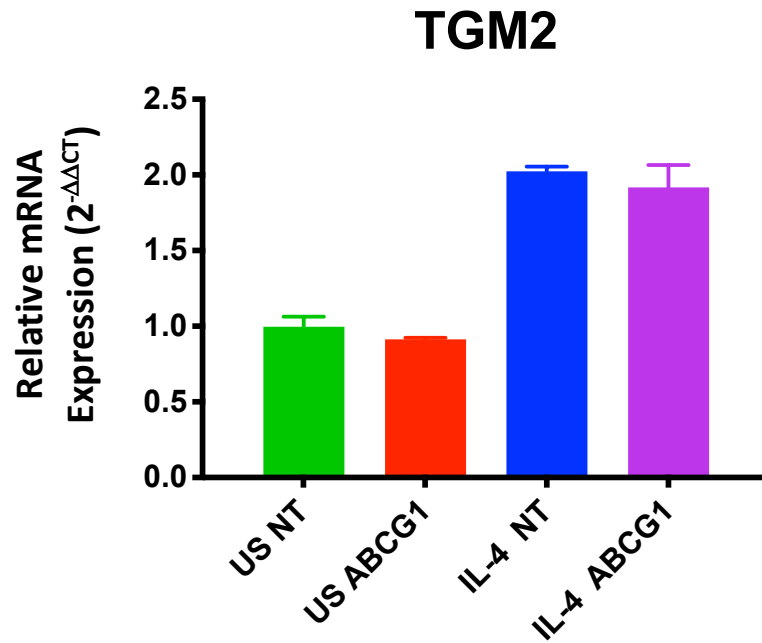
4.4.3.2. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda, M2a Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim

Hem uyarılmamış M0 makrofajlar, hem de IL-4 ile M2a fenotipine polarize olmuş makrofajlar, kontrol siRNA grubu (US NT) ile karşılaştırıldı. ABCG1 ekspresyonu baskılanan stimüle edilmemiş M0 makrofajlarda, M2a belirteçleri MRC1 ve CCL22 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü (Şekil 43 ve 46). IL-4 ile M2a'ya polarize olmuş makrofajlarda ise, ABCG1 baskılanması MRC1 geninin ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya neden oldu (Şekil 43). TGM2 ve CCL17 ekspresyonunda, M0 makrofajlarda, kontrol grubuna göre azalma eğilimi gözlemlendi, ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (Şekil 44 ve 45).



Şekil 43. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), MRC1 gen ekspresyonundaki değişim.

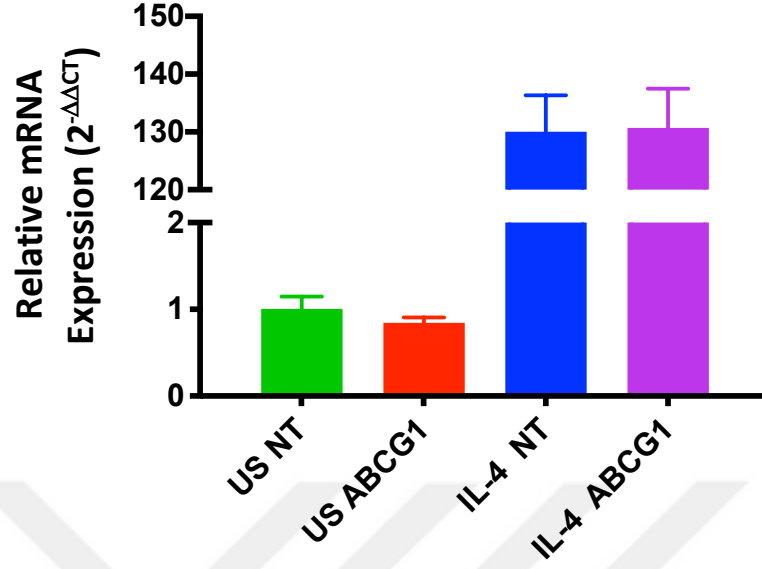
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test



Şekil 44. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), TGM2 gen ekspresyonundaki değişim.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

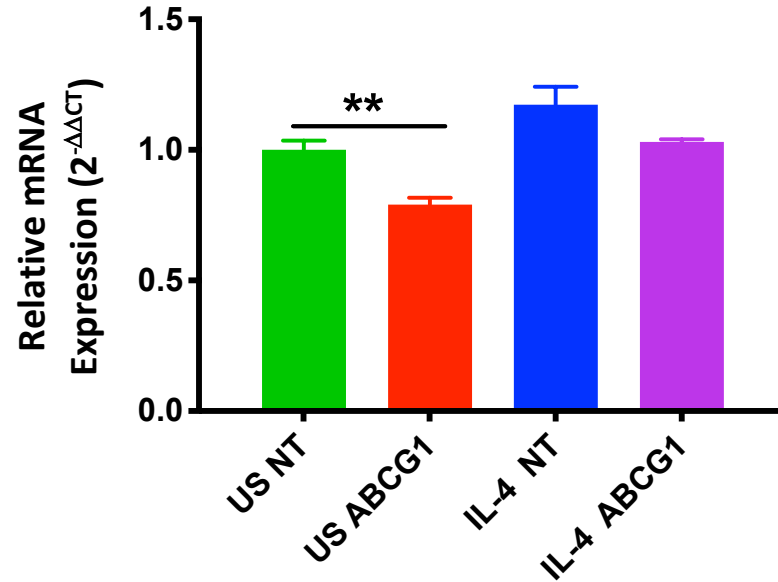
CCL17



Şekil 45. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CCL17 gen ekspresyonundaki değişim.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

CCL22

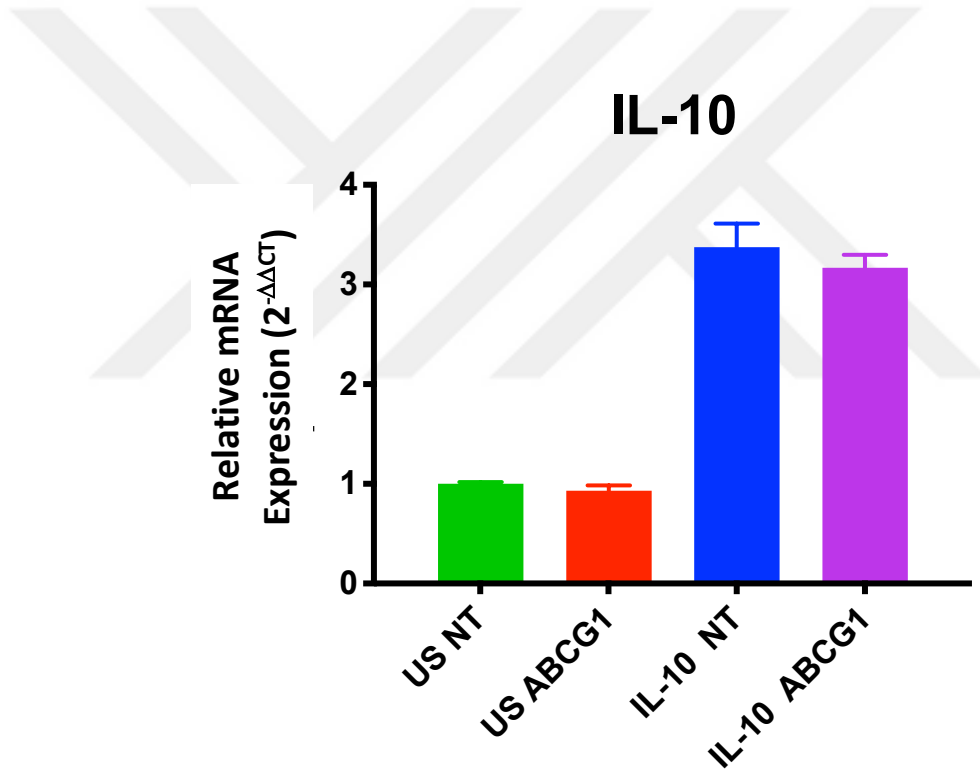


Şekil 46. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2a (IL-4 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CCL22 gen ekspresyonundaki değişim.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

4.4.3.3. ABCG1 Ekspresyonu Baskılanmış Makrofajlarda, M2c Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim

Hem uyarılmamış M0 makrofajlar, hem de IL-10 ile M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlar, kontrol siRNA grubu (US NT) ile karşılaştırıldı. İlginç olarak, ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajlarda IL10 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 47). ABCG1 ekspresyonunun baskılanması, M0 makrofajlarda CD163 ekspresyonunda düşüşe neden olurken, M2c makrofajlarda CD163 ekspresyonunda artışa neden oldu (Şekil 48).

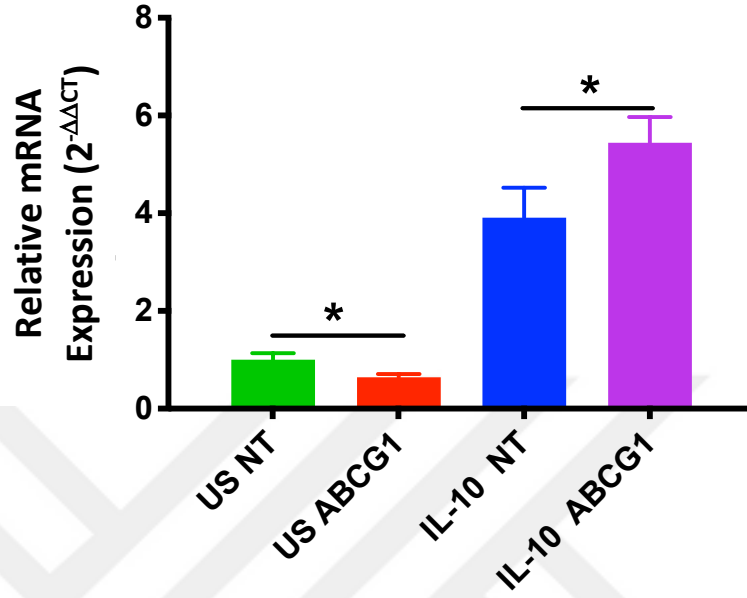


Şekil 47. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2c (IL-10 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), IL-10 gen ekspresyonundaki değişim.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

Bu sonuçlara göre ABCG1 ekspresyonunun baskılanmasının, makrofajlarda M1 yönüne doğru bir eğilim yarattığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak, ABCG1 ekspresyonunun baskılanması, makrofajlarda M2 yönüne doğru eğilimi azaltmaktadır.

CD163



Şekil 48. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, M0 (US ABCG1) ve M2c (IL-10 ABCG1) makrofajların, kontrol M0 makrofajlarına göre (US NT), CD163 gen ekspresyonundaki değişim.

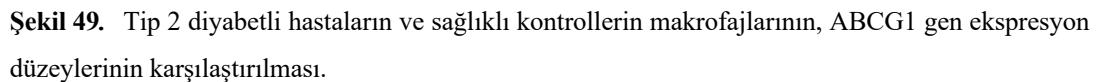
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Sapma, Student's t test

4.5. Tip 2 Diyabetli Hastalarda Makrofaj Polarizasyonu

Projemizde ABCG1 ekspresyonunun düşük olduğu bilinen tip 2 diyabet hastaları, ABCG1 ekspresyonunun global olarak baskılandığı bir model olarak kullanıldı. Diyabet hastalarının ve kontrol grubunun, makrofajlarındaki ABCG1 ekspresyonunun düzeyi; RT-qPCR yöntemi ile, 2^{-ΔCT} metodu kullanılarak belirlendi. Normalizasyon için referans gen olarak β-Aktin kullanıldı. Diyabet hastalarının makrofajlarındaki ABCG1 ekspresyonunun, kontrol grubu makrofajlarından düşük olduğu gösterildi (Şekil 49).

Ardından tip 2 diyabet hastalarında (n=13), ve sağlıklı kontrol grubunda (n=25) makrofaj polarizasyonu çalışıldı. Monositlerden türetilmiş primer makrofajlar, M1 polarizasyonu için 100 ng/mL LPS ve 20 ng/mL IFNγ ile, M2a polarizasyonu için 20

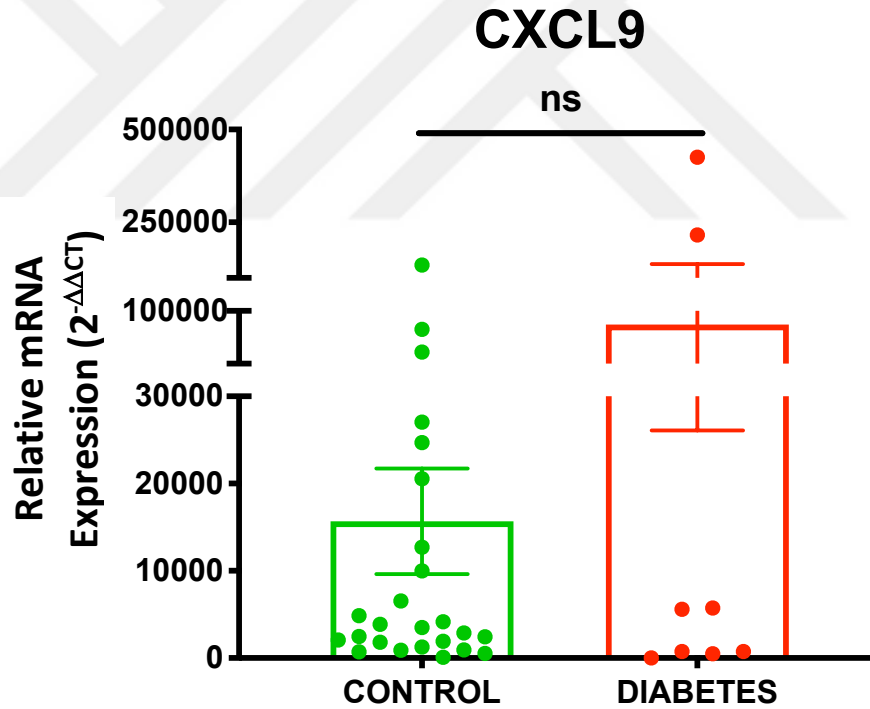
Forest plot for ABCG1. The mean difference is 6×10^{-4} . The confidence interval is represented by a horizontal line. The p-value is indicated by an asterisk (*), signifying $p < 0.05$.



65

4.5.1. Tip 2 Diyabetli Hastaların Makrofajlarında, M1 Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim

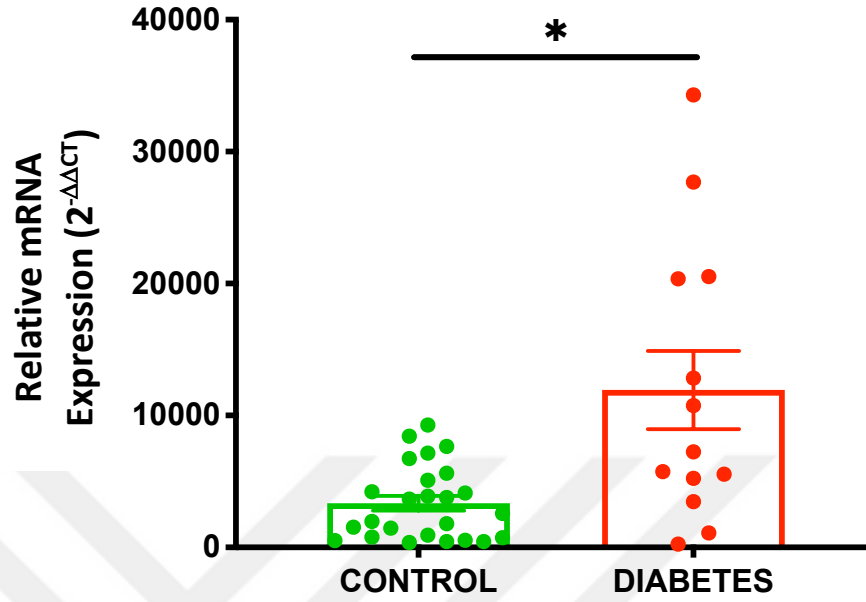
LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarında, M1 polarizasyon belirteçleri CXCL9, CXCL10, TNF ve IDO1 gen ekspresyonlarının kat değişimi karşılaştırıldı. M1 belirteçleri CXCL10 ve IDO1'in gen ekspresyonları, diyabetli hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 51 ve 53) ancak CXCL9 ve TNF ekspresyonları anlamlı bir farklılığa ulaşmadı (Şekil 50 ve 52).



Şekil 50. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CXCL9 gen ekspresyonlarındaki değişimin karşılaştırılması.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Hata, Student's t test

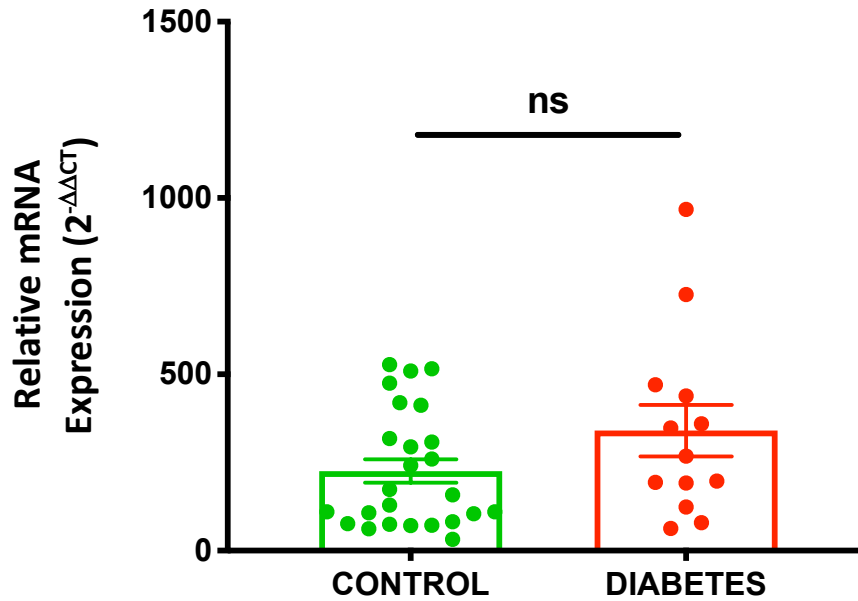
CXCL10



Şekil 51. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CXCL10 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

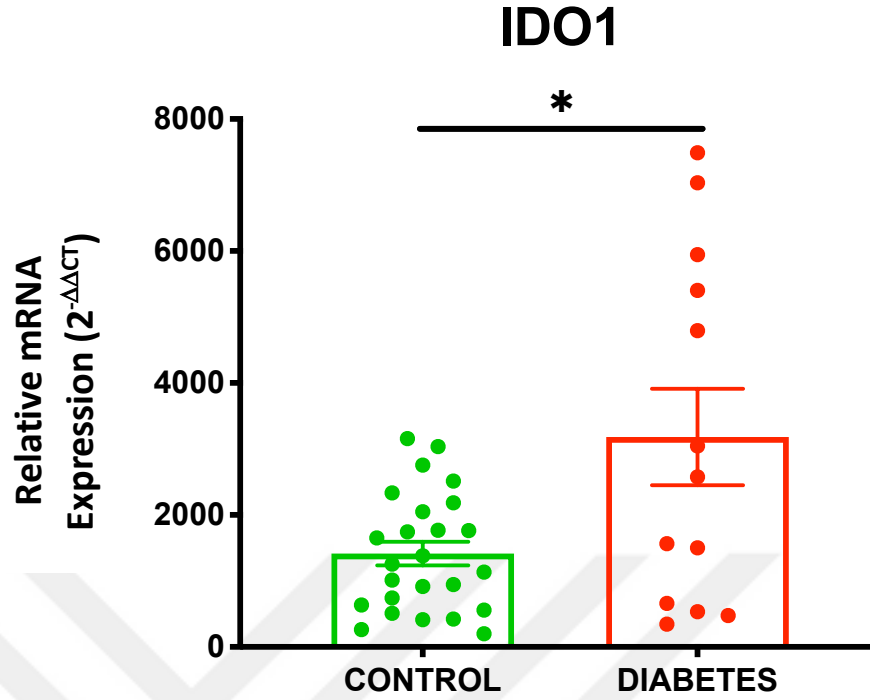
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, Student's t test

TNF



Şekil 52. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, TNF gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama $\pm$ Standart Hata, Student's t test



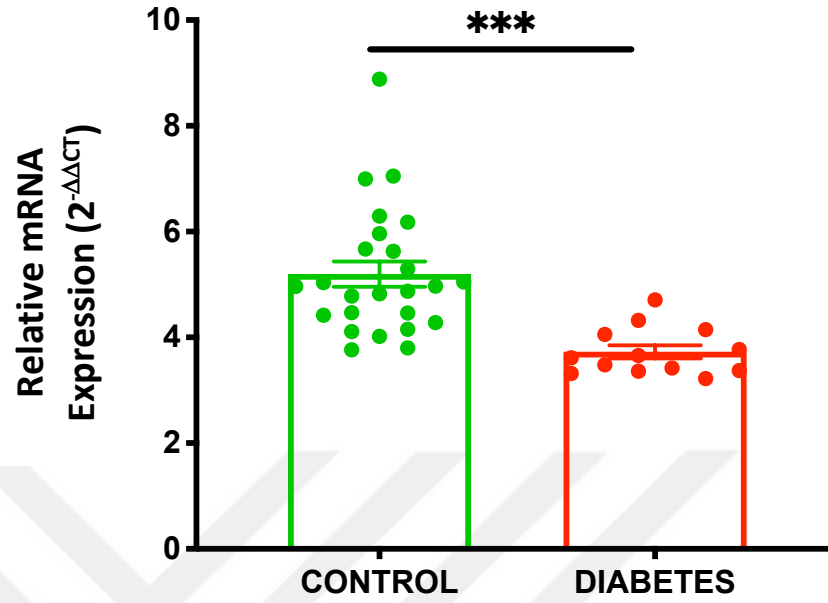
Şekil 53. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, IDO1 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama $\pm$ Standart Hata, Student's t test

4.5.2. Tip 2 Diyabetli Hastaların Makrofajlarında, M2a Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim

IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarında, M2a polarizasyon belirteçleri MRC1, TGM2, CCL17 ve CCL22 gen ekspresyonlarının kat değişimi karşılaştırıldı. M2a belirteçleri MRC1, TGM2, CCL17 ve CCL22'nin gen ekspresyonları diyabetli hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi (Şekil 54-57).

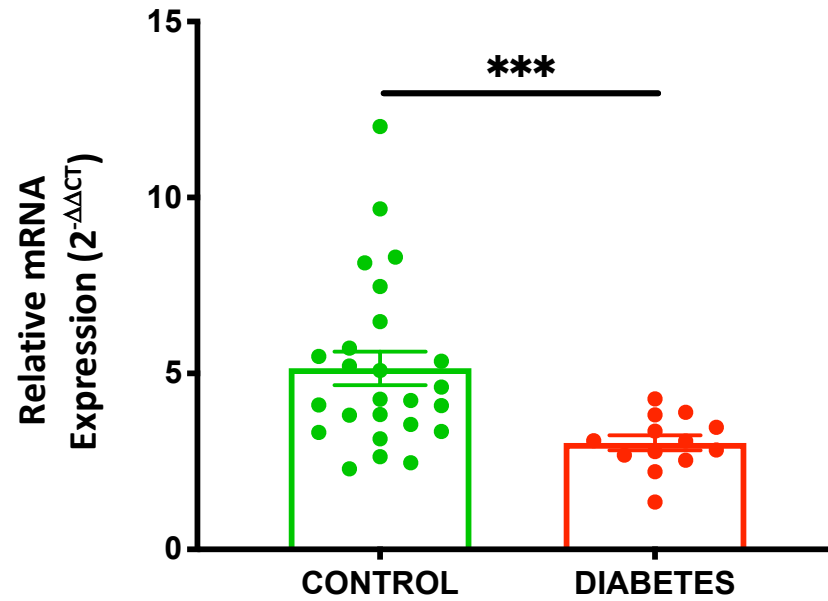
MRC1



Şekil 54. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, MRC1 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

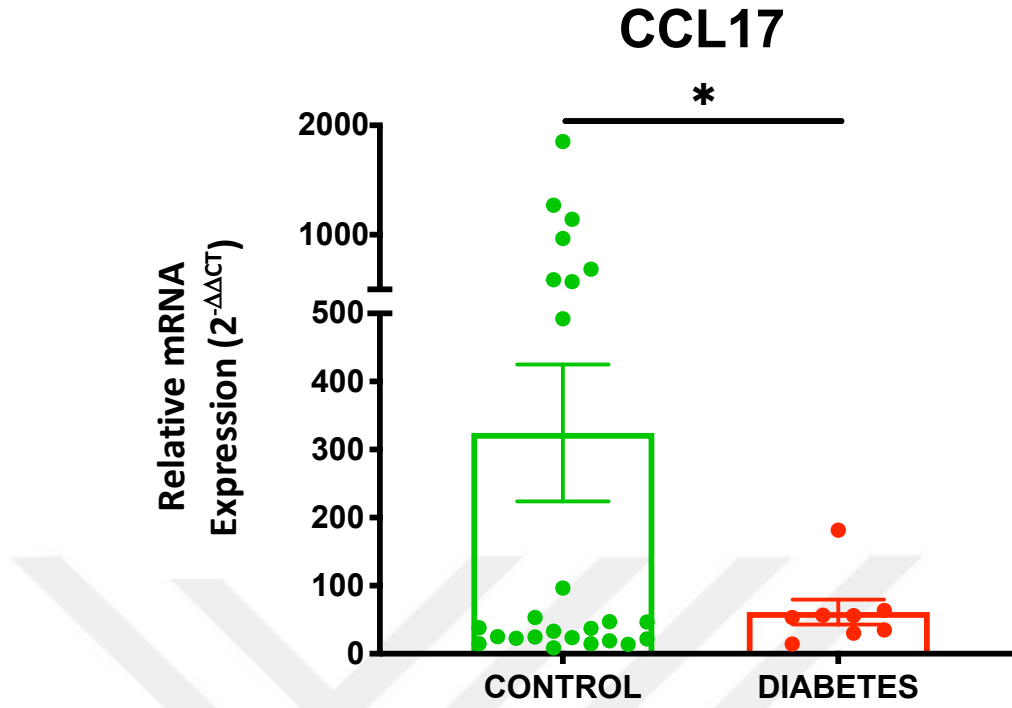
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, Student's t test

TGM2



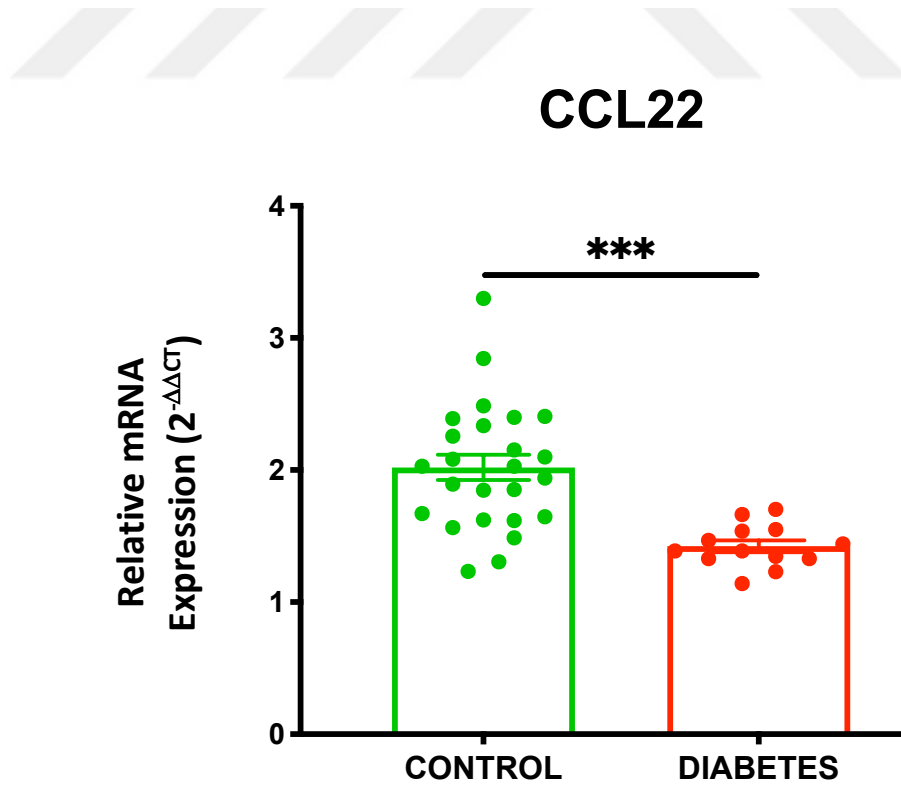
Şekil 55. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, TGM2 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, Student's t test



Şekil 56. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CCL17 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, Student's t test

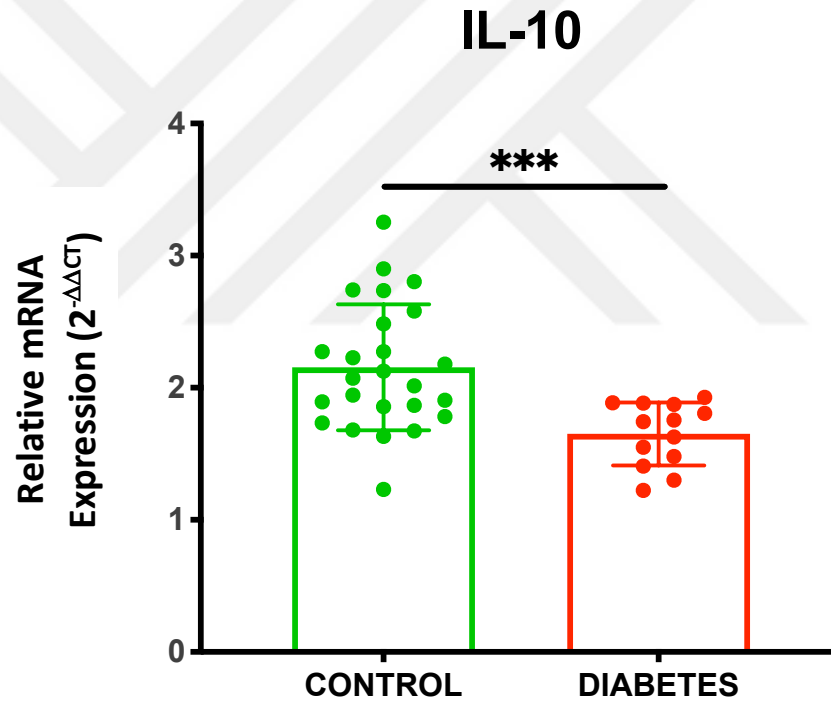


Şekil 57. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CCL22 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, Student's t test

4.5.3. Tip 2 Diyabetli Hastaların Makrofajlarında, M2c Polarizasyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Gen Ekspresyonlarındaki Değişim

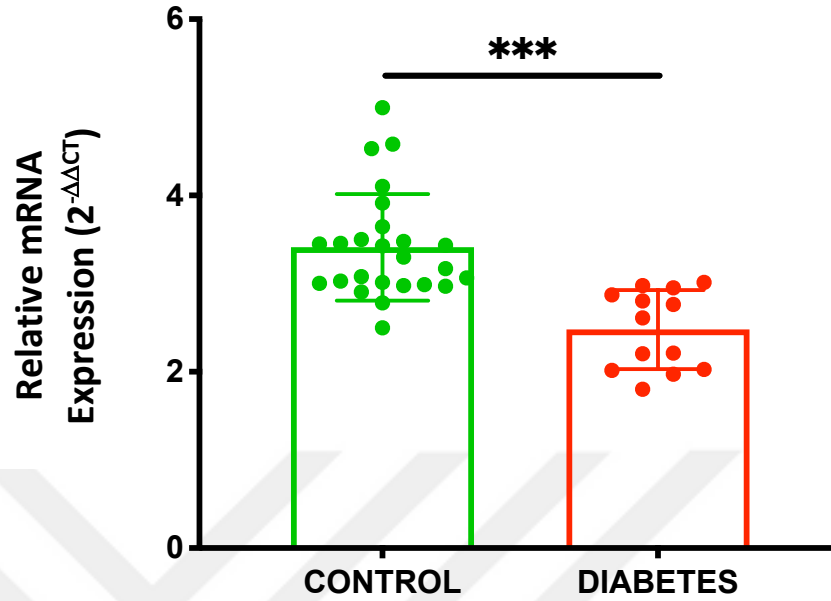
IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarında, M2c polarizasyon belirteçleri IL-10 ve CD163 gen ekspresyonlarının kat değişimi karşılaştırıldı. M2c belirteçleri IL-10 ve CD163'ün gen ekspresyonları diyabetli hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdi (Şekil 58 ve 59).



Şekil 58. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, IL-10 gen ekspresyonlarındaki değişimin karşılaştırılması.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Ortalama±Standart Hata, Student's t test

CD163



Şekil 59. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş tip 2 diyabetli hastaların ve sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, CD163 gen ekspresyonundaki değişimin karşılaştırılması.

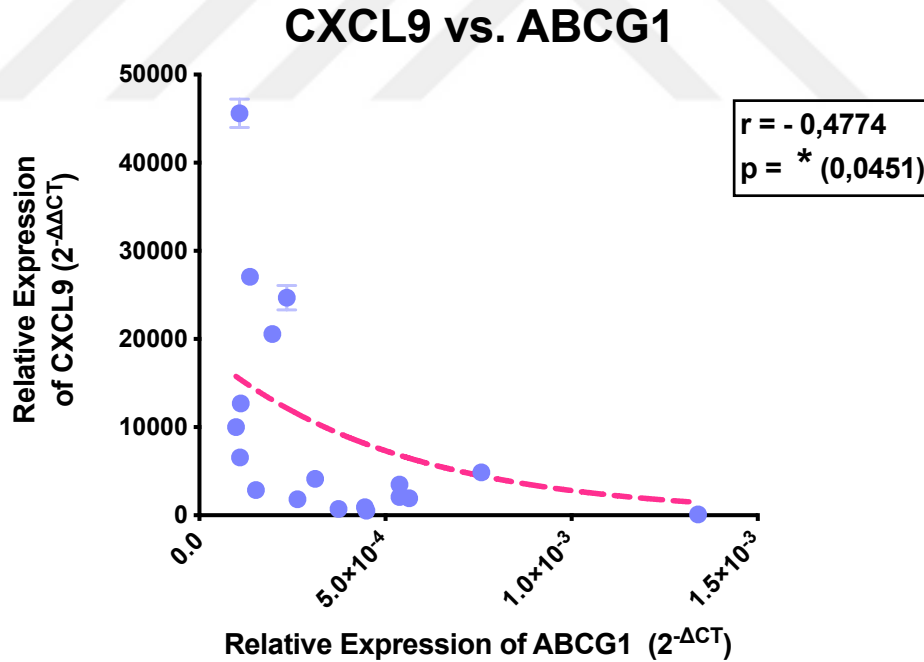
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Ortalama±Standart Hata, Student's t test

4.6. ABCG1 Ekspresyonu ile M1/M2 Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasındaki Korelasyonun Karşılaştırılması

Kontrol grubu ve diyabetli hastaların makrofajlarında, ABCG1 ekspresyonu ile polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonları arasındaki korelasyon araştırıldı. Tip 2 diyabet hastalarında ve kontrol grubunda, ABCG1 ekspresyonunun düzeyi; 2^{-ΔCT} metodu kullanılarak belirlendi. Makrofaj polarizasyonunun ardından tip 2 diyabet hastalarında ve kontrol grubunda, polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonundaki kat değişimi, her bir örnek için polarize olmuş makrofajların, uyarılmamış makrofajlarla (M0) karşılaştırılması ile 2^{-ΔΔCT} metodu kullanılarak belirlendi. Gen ekspresyonları RT-qPCR kullanılarak çalışıldı. Normalizasyon için referans gen olarak β-Aktin kullanıldı. ABCG ekspresyonu ile polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonundaki kat değişimi arasındaki korelasyon, *Pearson Correlation test* kullanılarak analiz edildi.

4.6.1. Kontrol grubunda, ABCG1 Ekspresyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasındaki Korelasyonun Karşılaştırılması

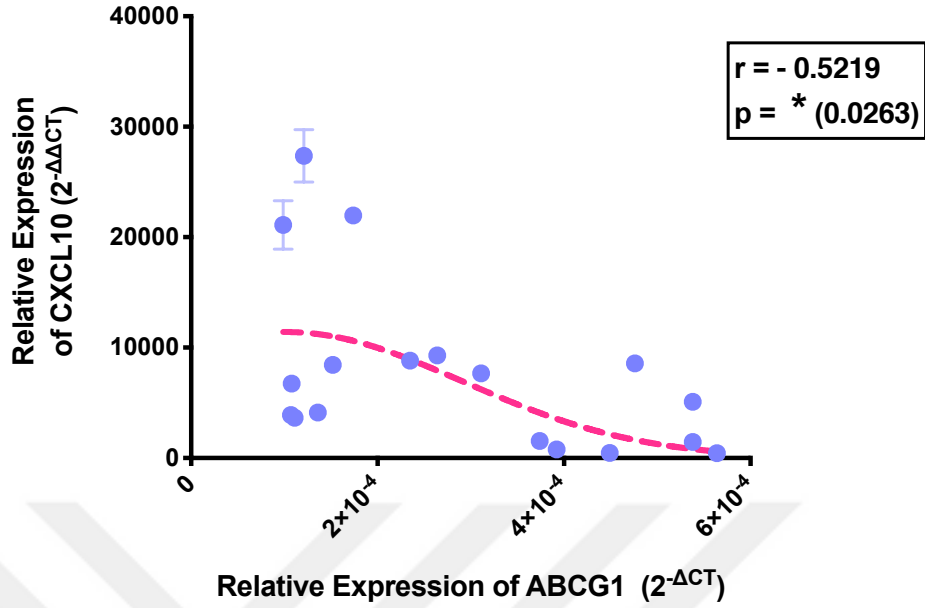
Polarize makrofajlarda ABCG1 ekspresyonu ile M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi. M1 belirteçleri CXCL9, CXCL10, TNF α ve IDO1 ile ABCG1 ekspresyonu arasında negatif korelasyon bulundu (Şekil 60-63). ABCG1 ekspresyonu arttıkça, M1 polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonları azalmaktadır. M2a polarizasyon belirteçleri TGM2 ve TGM2 ile ABCG1 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulundu (Şekil 64-65). M1 belirteçlerindeki durumun aksine, ABCG1 ekspresyonu arttıkça, M2a polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonları artmaktadır. Ancak M2a polarizasyon belirteci CCL22, ABCG1 ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdi (Şekil 67). M2c polarizasyon belirteçleri IL10 ve CD163 ekspresyonları da, M1 belirteçlerine benzer şekilde, ABCG1 ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdi (Şekil 68-69).



Şekil 60. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL9 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

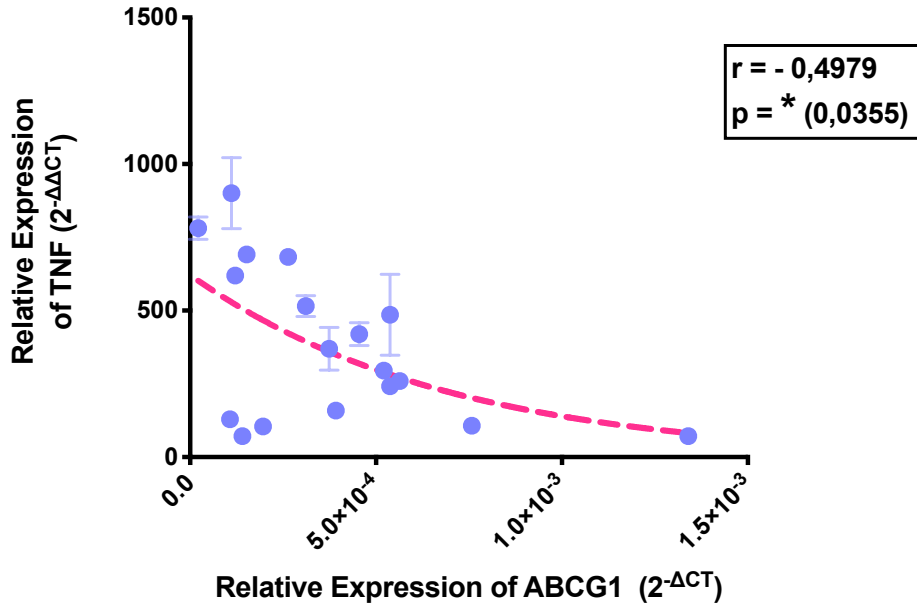
CXCL10 vs. ABCG1



Şekil 61. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

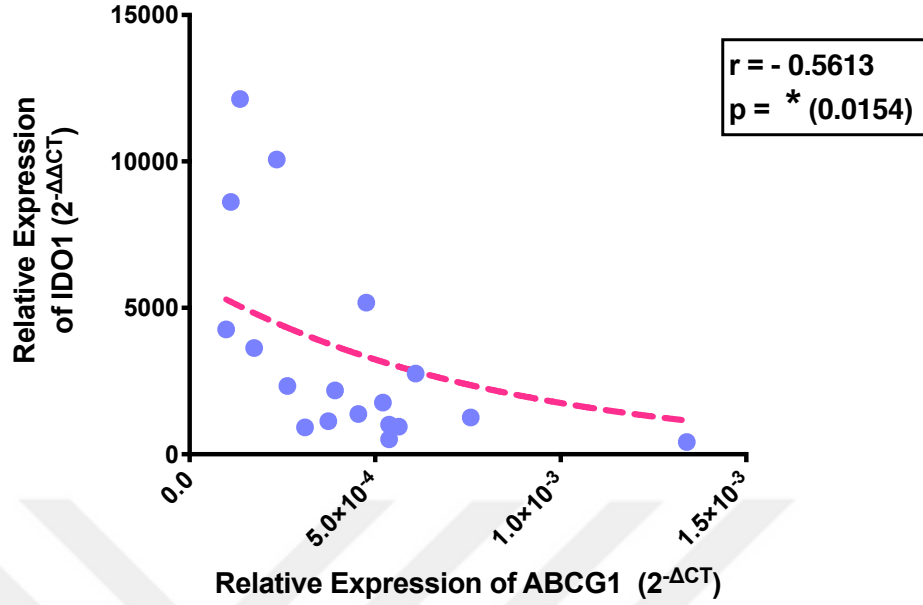
TNF vs. ABCG1



Şekil 62. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TNF ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

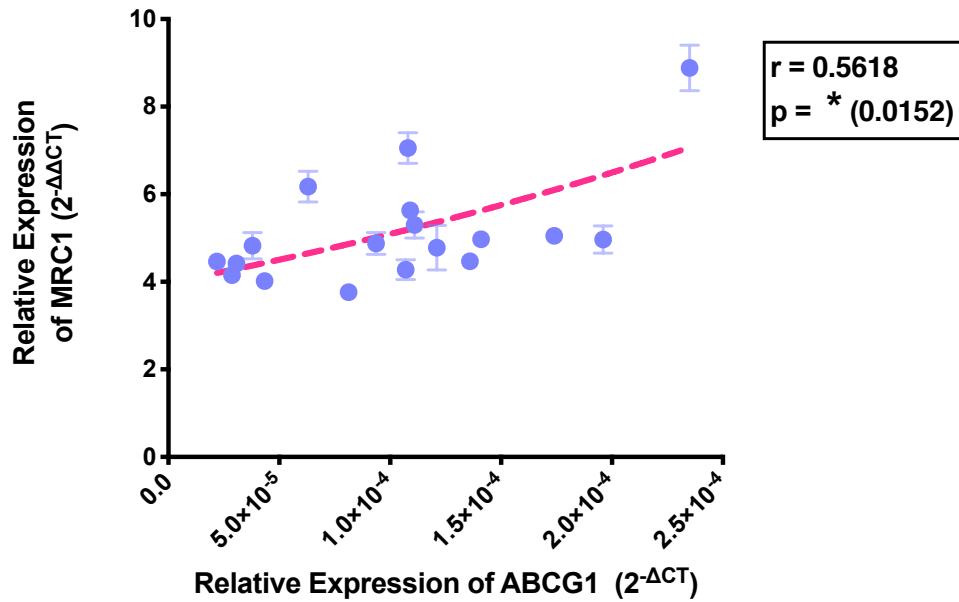
IDO1 vs. ABCG1



Şekil 63. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IDO1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

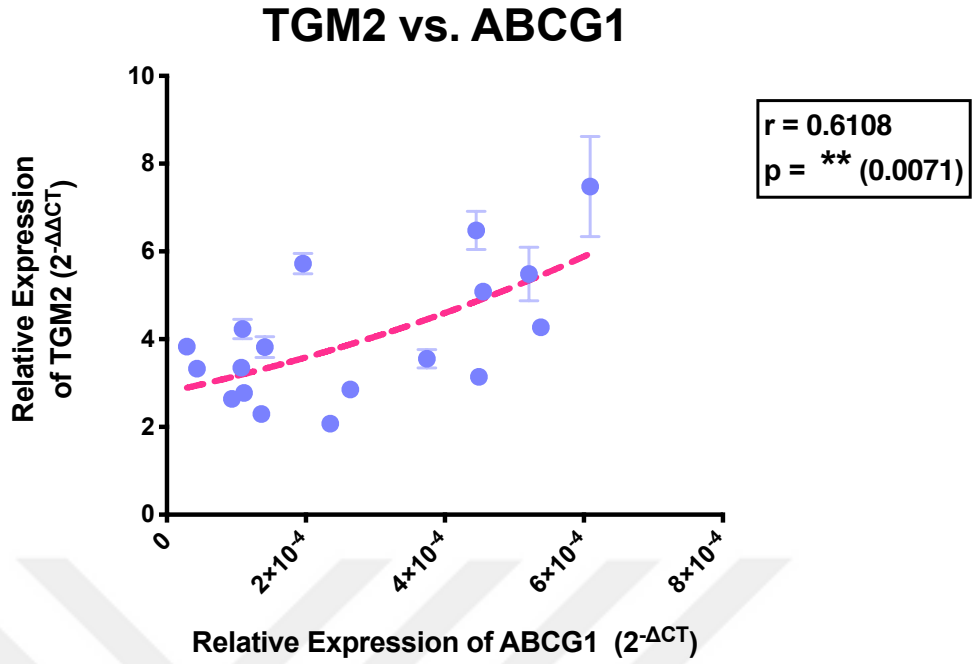
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

MRC1 vs. ABCG1



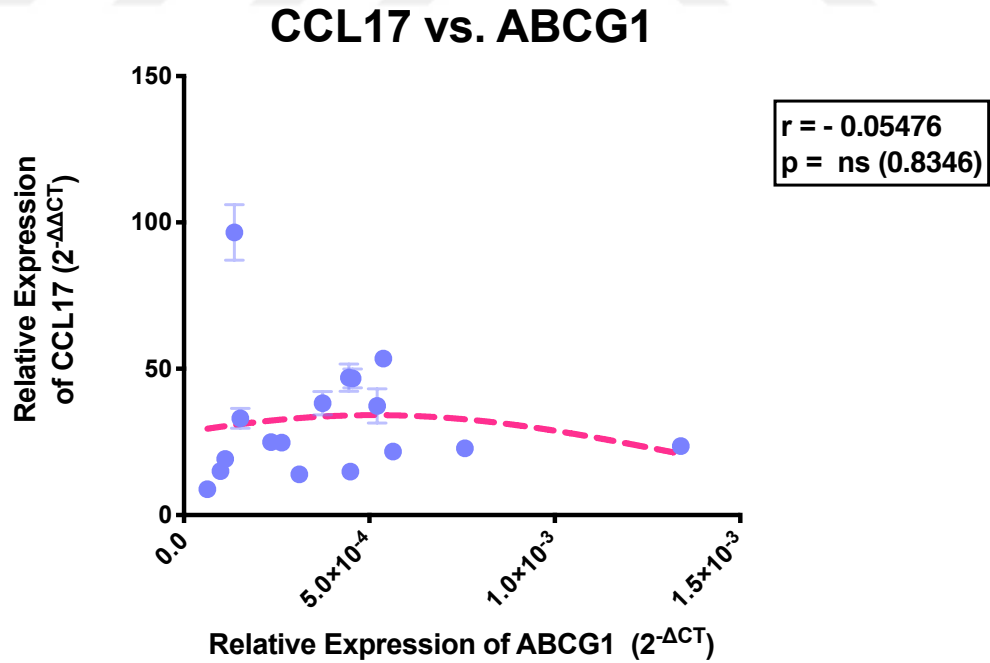
Şekil 64. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile MRC1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



Şekil 65. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TGM2 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

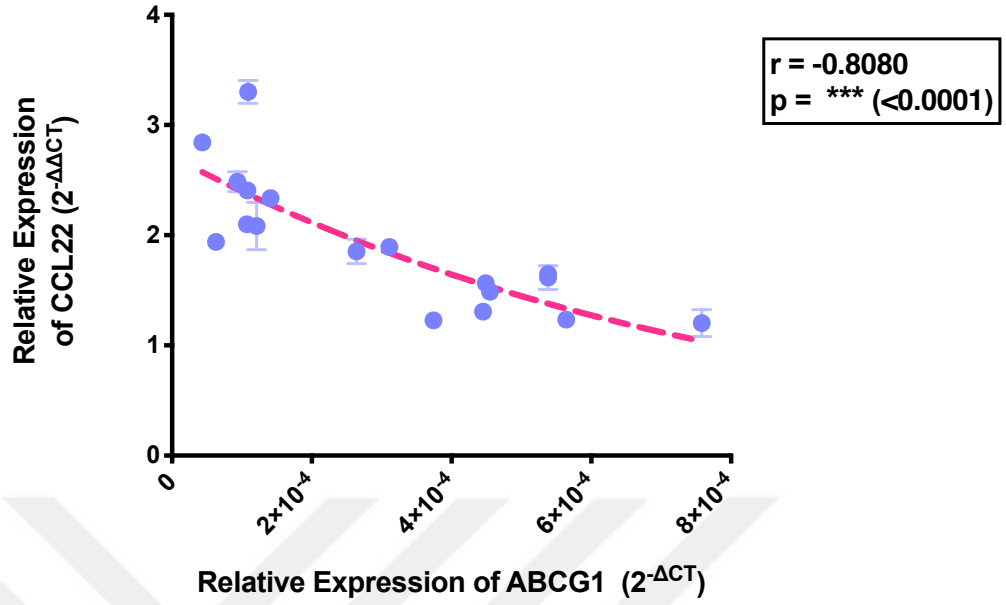
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



Şekil 66. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL17 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

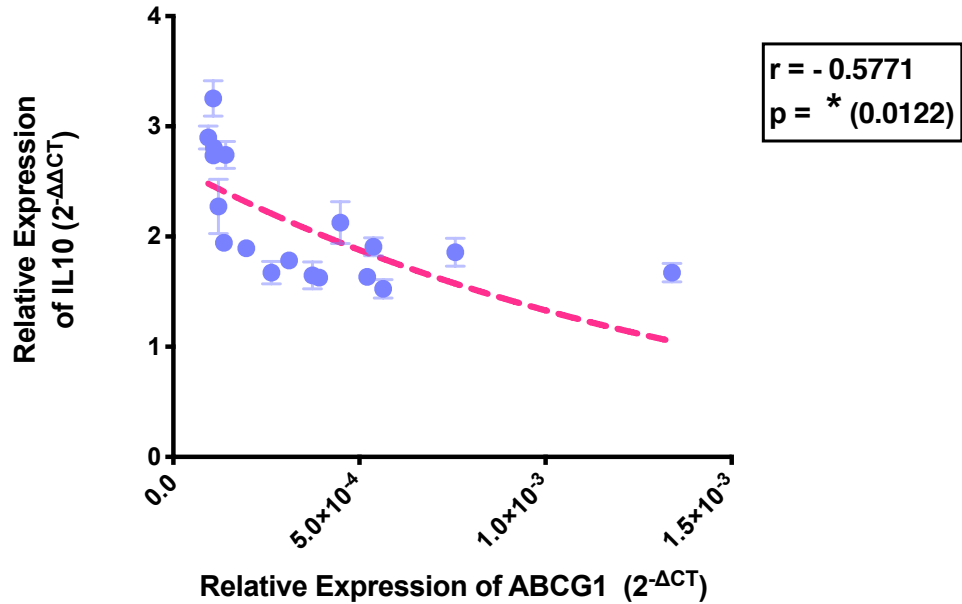
CCL22 vs. ABCG1



Şekil 67. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL22 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

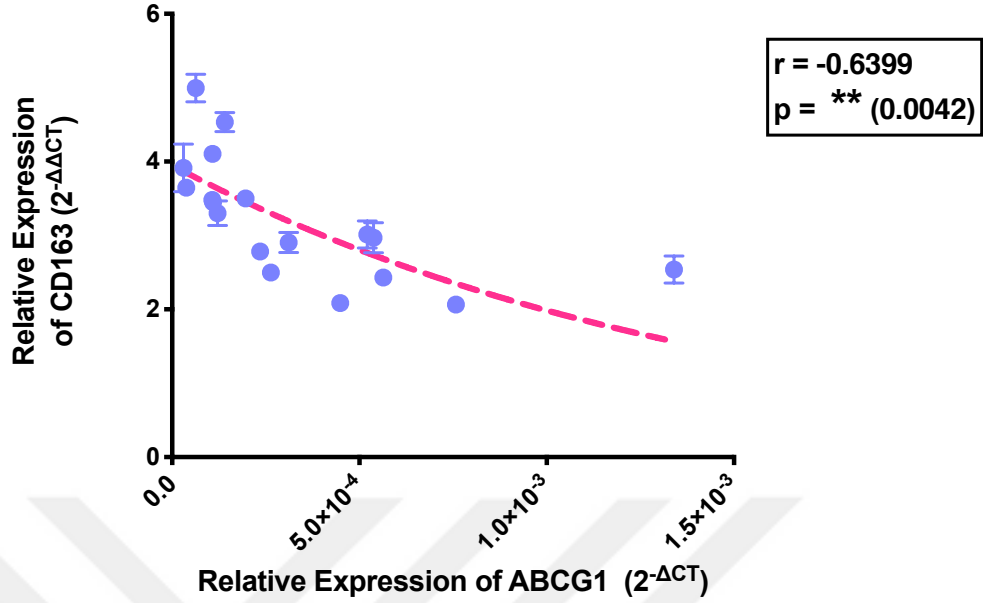
IL10 vs. ABCG1



Şekil 68. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IL10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

CD163 vs. ABCG1



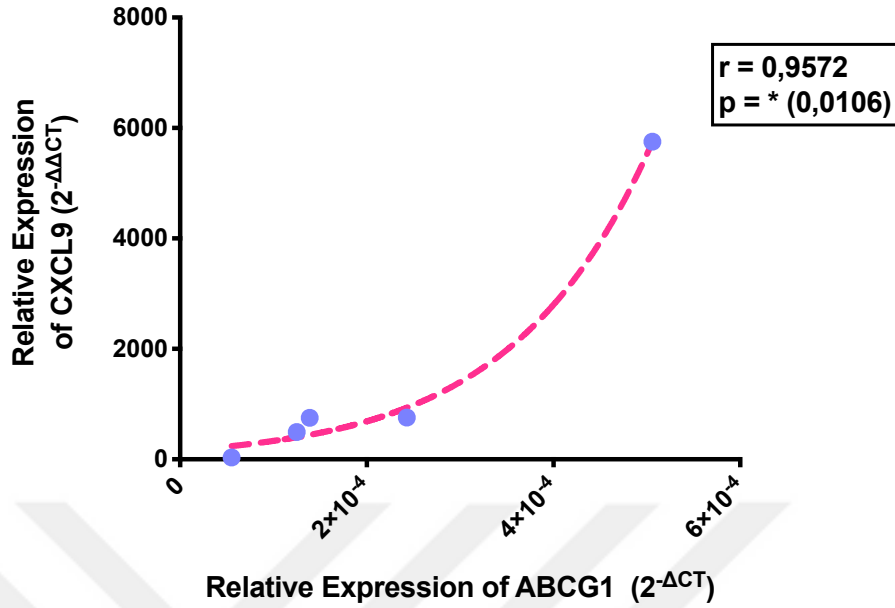
Şekil 69. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş sağlıklı kontrollerin makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CD163 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

4.6.2. Diyabet grubunda, ABCG1 Ekspresyonu ile Polarizasyon Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasındaki Korelasyonun Karşılaştırılması

Polarize makrofajlarda ABCG1 ekspresyonu ile M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelendi. M1 belirteci IDO1 ile ABCG1 ekspresyonu arasında negatif korelasyon bulundu (Şekil 73). ABCG1 ekspresyonu arttıkça, M1 polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonları azalmaktadır. Aksine CXCL9 ile ABCG1 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulundu (Şekil 70). M2a polarizasyon belirteçleri MRC1 ve TGM2 ile ABCG1 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulundu (Şekil 74-75). M1 belirteçlerindeki durumun aksine, ABCG1 ekspresyonu arttıkça, M2a polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonları artmaktadır. Ancak M2a polarizasyon belirteci CCL22, ABCG1 ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdi (Şekil 77). M2c polarizasyon belirteci CD163 ekspresyonu ile ABCG1 ekspresyonu, negatif korelasyon gösterdi (Şekil 79).

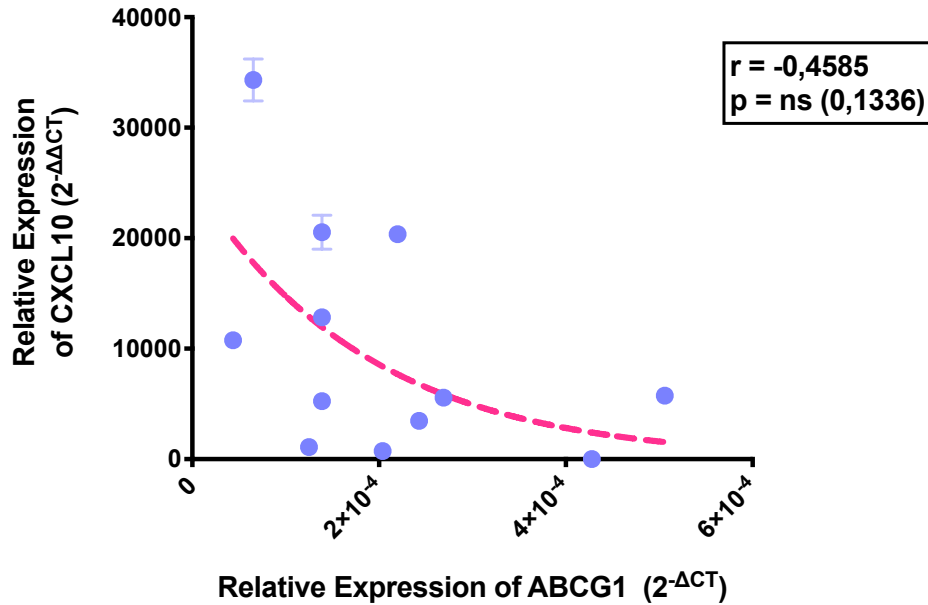
CXCL9 vs. ABCG1



Şekil 70. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL9 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

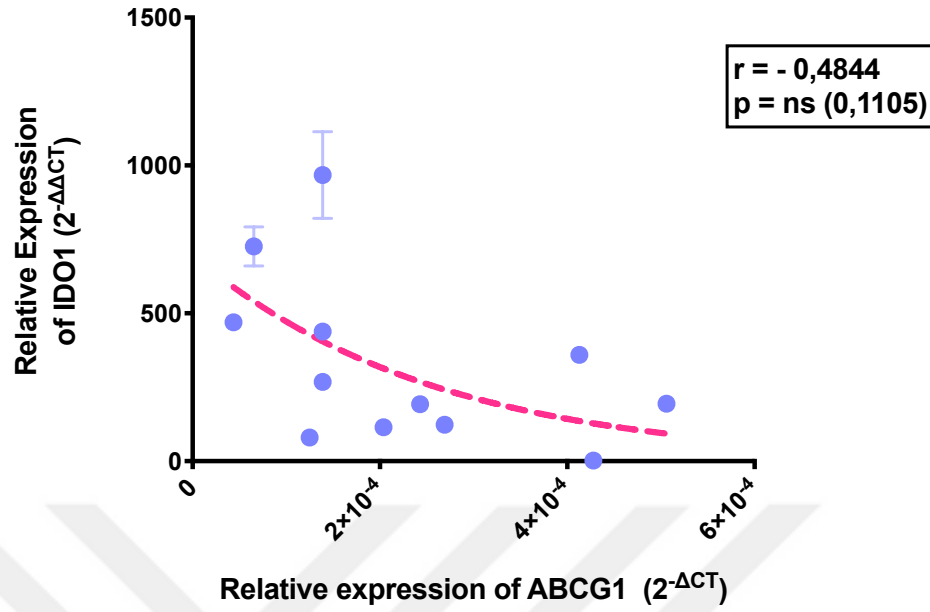
CXCL10 vs. ABCG1



Şekil 71. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CXCL10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

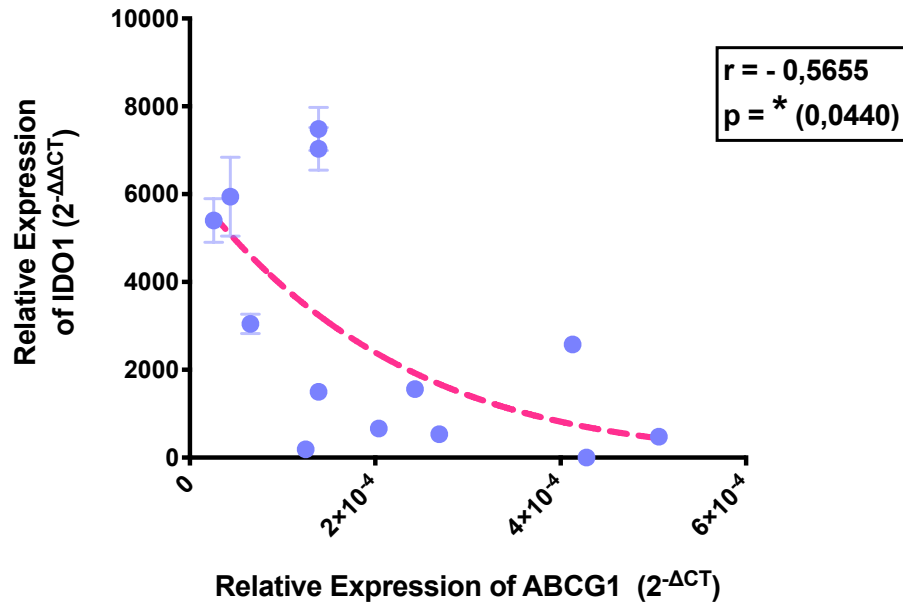
TNF vs. ABCG1



Şekil 72. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TNF ekspresyonu arasındaki korelasyon.

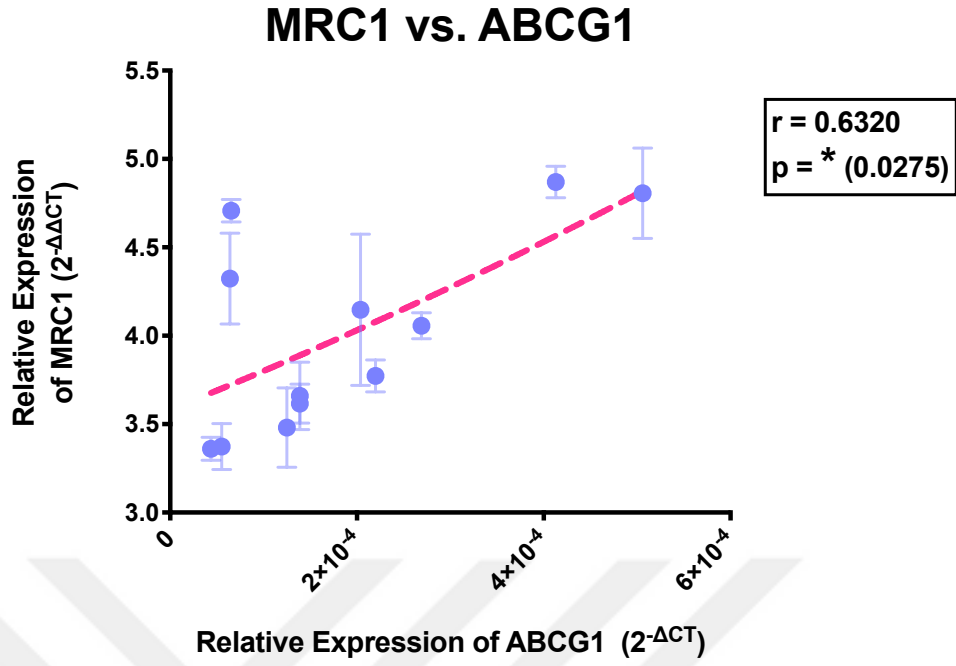
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

IDO1 vs. ABCG1



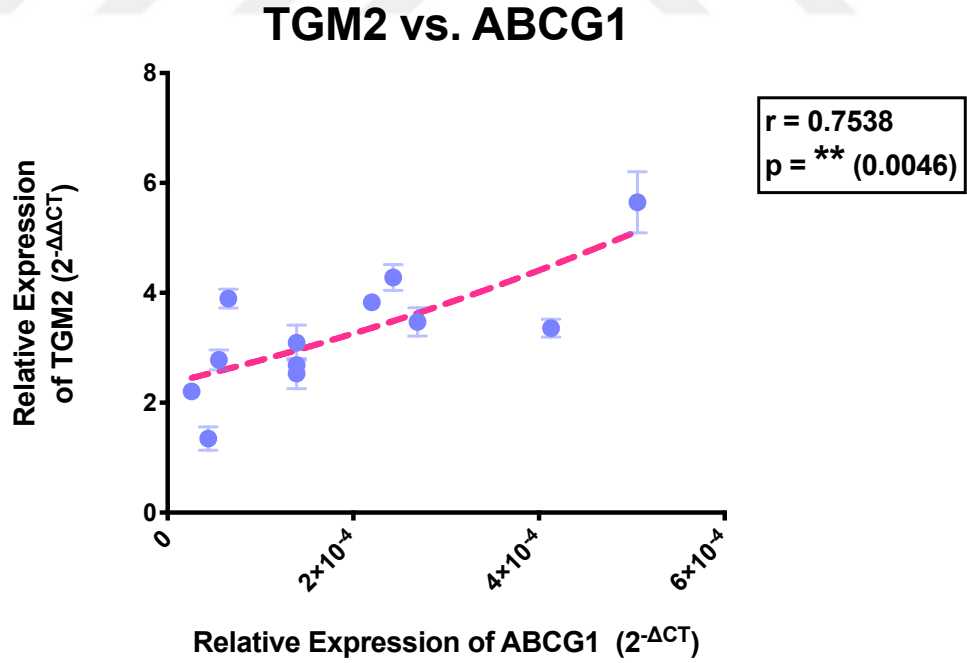
Şekil 73. LPS-IFN γ ile uyarılarak M1 fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IDO1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



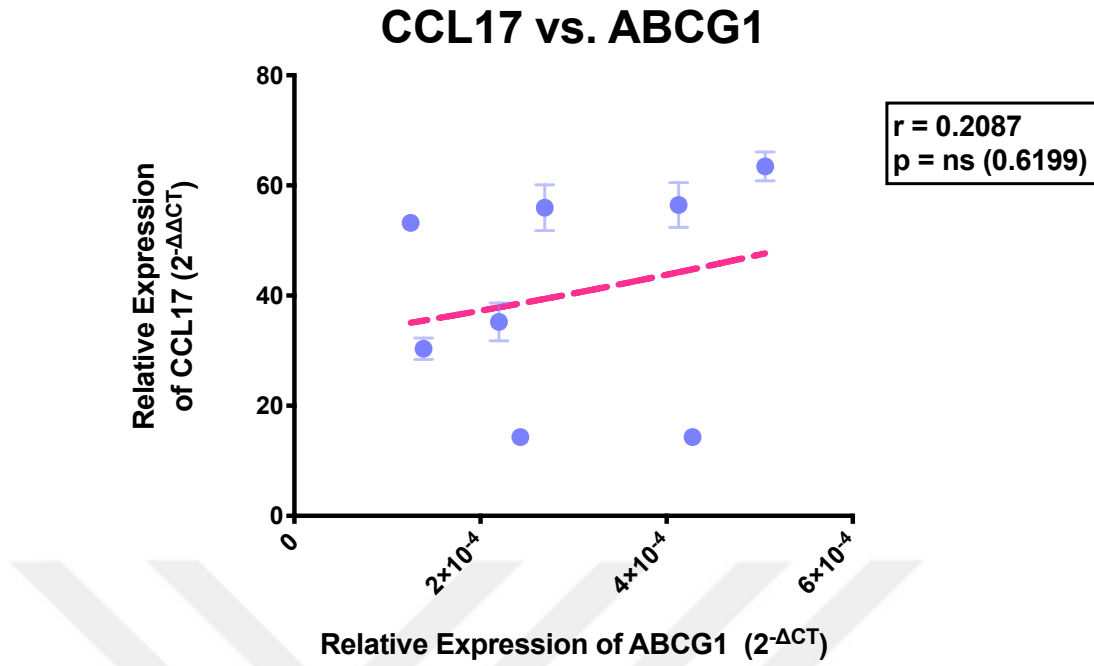
Şekil 74. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile MRC1 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



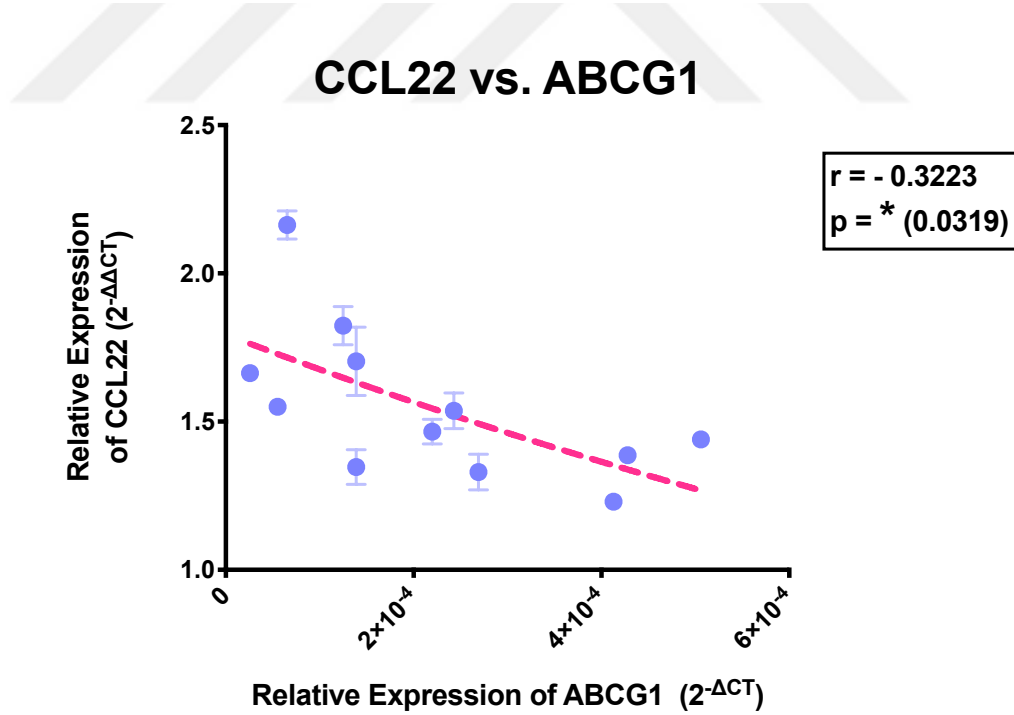
Şekil 75. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile TGM2 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



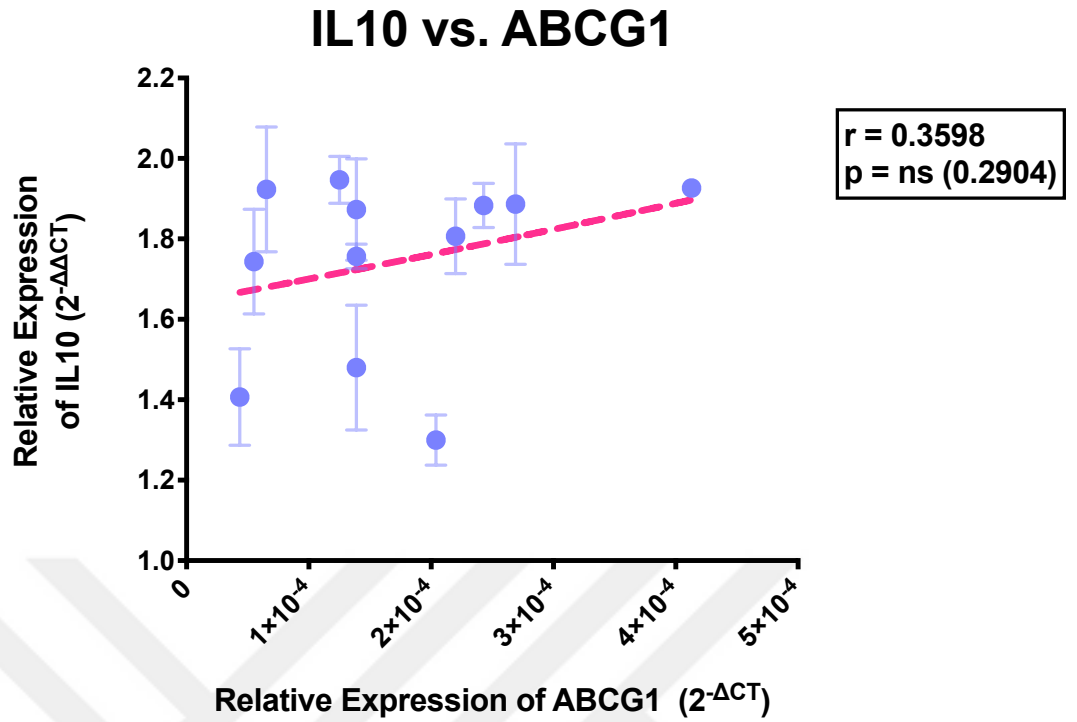
Şekil 76. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL17 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



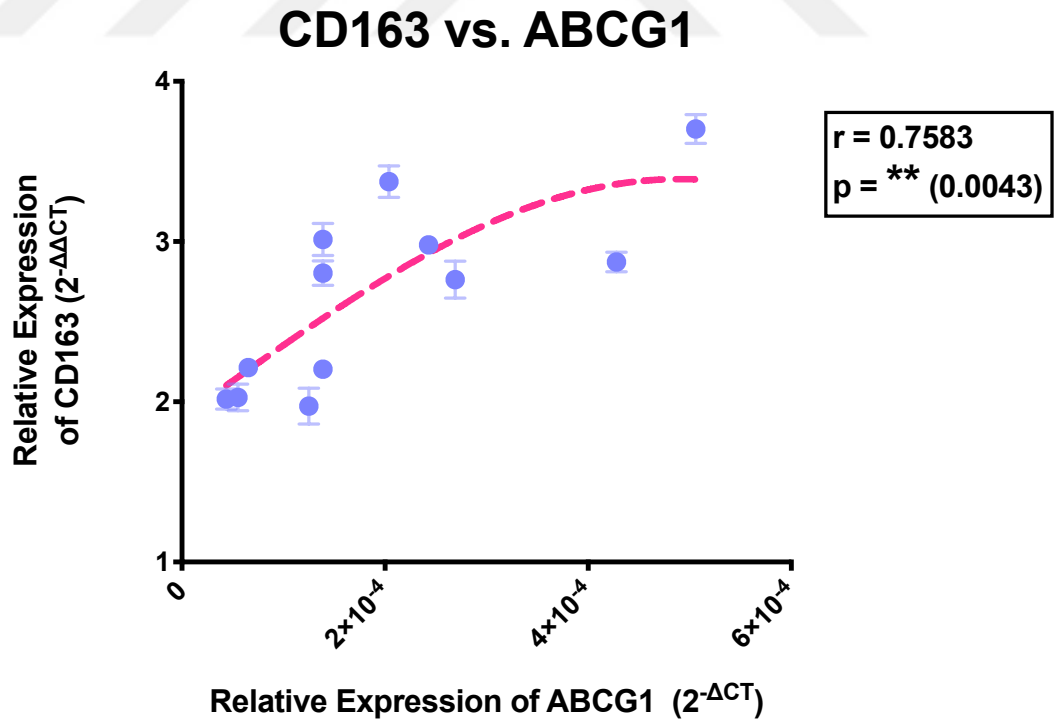
Şekil 77. IL-4 ile uyarılarak M2a fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CCL22 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



Şekil 78. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile IL-10 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test



Şekil 79. IL-10 ile uyarılarak M2c fenotipine polarize edilmiş diyabet hastalarının makrofajlarının, ABCG1 ekspresyonu ile CD163 ekspresyonu arasındaki korelasyon.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, Pearson Correlation test

5. TARTIŞMA

İmmün sistemde ve vücudun normal homeostazında çok önemli görevleri olan makrofajlar, özelleşmiş fagositik hücrelerdir. Yerleşik bulundukları dokuda, aldıkları görevlere özgün fonksiyon ve morfolojik özellikler kazanabilirler. Bunun yanında çevreden aldıkları sinyallere cevap olarak farklı aktivasyon durumlarına polarize olurlar (1–3,25,28). Klasik olarak aktive edilmiş M1 fenotipindeki makrofajlar anti-tümör ve anti mikrobiyal aktiviteler gösteren, inflamatuvar hücrelerdir. M2 fenotipindeki makrofajlar ise yara iyileşmesi ve doku yeniden şekillenmesinde görev alan anti-inflamatuvar hücrelerdir (32). Makrofaj polarizasyonu vücudun sağlıklı işleyişinde çeşitli süreçlerde rol almaktadır, ancak makrofaj polarizasyonunun dengesinin bozulması çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (4,46,47). Makrofaj polarizasyonunun yönlendirilebilmesi gelecekte birçok hastalığın tedavisinde rol oynayabilecek bir yaklaşım olacaktır.

Makrofaj polarizasyonunu in vivo'da tetikleyen çevresel uyaranlar, in vitro'da çeşitli stimülanlar kullanılarak taklit edilebilir. Makrofaj polarizasyonunun in vitro modellenmesi, makrofaj biyolojisini anlamamıza, dahası makrofaj polarizasyonunun çeşitli hastalıklarda hedef olarak geliştirilmesine çok büyük katkı sağlayabilir. Ancak makrofaj polarizasyonu için kullanılan stimülanların uygulama süresi, M1/M2 polarizasyonunu analiz etmek için kullandığımız polarizasyon belirteçlerinin ekspresyon düzeyini dramatik bir biçimde etkilemektedir. Ne yazık ki literatürde, stimülanların optimum uyarım süresi konusunda fikir birliğine varılamamıştır. Bu durumun iki büyük dezavantajı vardır; birincisi yetersiz uyarım süresi yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır, ikincisi ise literatürde kullanılan bu kadar farklı uyarım süresi çalışmaların karşılaştırılabilirliğini zorlaştırmaktadır (86).

Bu sorunun aşılması, tez çalışmamızın doğruluğu ve tekrarlanabilirliği açısından çok önemliydi. Bu amaçla makrofaj polarizasyonunda kullanılan stimülanların en etkin olduğu sürenin belirlenmesi ve makrofaj polarizasyonunun doğrulanması için, 6 ayrı uyarım süresinde polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarını inceledik. Makrofajlar LPS-IFN γ ile M1 fenotipine polarize edildiğinde, M1 polarizasyon belirteçleri CXCL9, CXCL10 ve TNF gen ekspresyonları, 4 saatlik uyarımda dramatik bir artış gösterdi ve ilerleyen uyarım sürelerinde gen ekspresyonları kademeli olarak

düştü. Bu genlerdeki düşüş trendinin aksine IDO1 gen ekspresyonu, 4 saatlik uyarımda da yüksek olmakla birlikte, ilerleyen uyarım sürelerinde kademeli olarak artan bir trend izledi. IDO1 inflamasyondan sonra indüklenen düzenleyici bir enzim olduğundan (87), gen ekspresyonundaki artışın sitokin ve kemokinlere göre daha geç uyarım saatlerinde olması beklenen bir durumdur. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 4-8 saatlik LPS-IFN γ stimülasyonu, mRNA düzeyinde M1 belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişiklikleri gözlemlemek için en uygun uyarım süresi gibi görünmektedir. Martinez ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen transkriptom dizileme çalışmasında; CXCL9, CXCL10 ve IDO1 belirteçlerinin ekspresyonunda, 16 saatlik stimülasyonda dahi anlamlı bir artış gözlenmiştir (88). IL-4 ile M2a fenotipine polarize edilmiş makrofajlarda, CCL17 ekspresyonu tüm uyarım sürelerinde yüksekken, CCL22 ekspresyonu 4 saatlik uyarımdan 48 saatlik uyarıma doğru artmaktadır. MRC1 ve TGM2 ekspresyonu ise 4-48 saat arasında benzer ekspresyon artışları gösterirken, 72 saatlik uyarımda pik yapmıştır. Bu verilere göre, 4-72 saat aralığındaki IL-4 uyarımı, mRNA düzeyinde M2a belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri gözlemlemek için ideal uyarım süresidir. Tüm bu sonuçlar ışığında, M1 ve M2 makrofaj polarizasyonunu aynı anda belirlemek için kullanılacak optimum uyarım süresini 4 saat olarak belirledik. Projenin devamındaki siRNA çalışmalarında da uyarım süresini, bu sonuçlara dayanarak 4 saat olarak kullandık.

Makrofaj polarizasyonu için kullanılan uyarım süresinin, makrofajların yüzey belirteçlerinin ekspresyonuna ve sitokin üretim düzeylerine etkisini belirlemenin yanı sıra makrofaj polarizasyonunun da doğrulanması için, polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonlarını akış sitometrisi ve ELISA ile de belirledik. Yüzey belirteçleri CD64, CD86, ve HLA-DR akış sitometrisinde en sık kullanılan M1 polarizasyon belirteçleridir. (38). M1 makrofajlarda CD86 ve HLA-DR ekspresyonu, Iqbal ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde (89), 12 saatlik LPS-IFN γ uyarımında anlamlı bir artış sergilerken, ardından 24-72 saatlik uyarımlarda düştü. Makrofajların LPS ile uyarılması, CD86'nın aşırı ekspresyonunu önlemek için CD86'yı otokrin bir şekilde inhibe eden IL-10 üretimine yol açar (90). Bu nedenle, CD86 ve HLA-DR ekspresyonlarında 12 saatten sonra gözlenen azalma, bu reseptörlerin IL-10 tarafından aşağı regüle edilmesi sebebiyle olabilir (90-92). Sonuçlarımıza göre M1

makrofajlarda, CD86 ve HLA-DR ekspresyonlarının en bilgi verici olduğu uyarım süresi 12 saatti, ilerleyen uyarım sürelerinde ekspresyonları düştü. CD86 ve HLA-DR'nin aksine CD64 ekspresyonu, 8 saatlik uyarımdan 72 saatlik uyarıma doğru bir artış trendi izledi. Zaten CD64, ayırım gücü en yüksek M1 yüzey belirteci olarak tanımlanmaktadır (93) ve M1 makrofajlarda CD64 ekspresyonunun, geniş bir uyarım süresi yelpazesinde her zaman yüksek olduğu rapor edilmiştir (33,93,94). IL-4 ile M2a fenotipine polarize olan makrofajlarda CD200R ve CD206 ekspresyonu, uyarım süresi ilerledikçe kademeli olarak arttı, 48 ve 72 saatlik uyarımlarda maksimum seviyeye ulaştı. IL-10 ile M2c fenotipine polarize olmuş makrofajlarda CD163 gen ekspresyonu 4 saatlik uyarım ve sonrasında arttı, beklendiği gibi CD163 yüzey belirtecinin ekspresyonu ise önceki çalışmalarla uyumlu olarak (89,93,94), 24-72 saatlik uyarımlarda arttı. Uyarım süresinin M1 makrofajların sitokin üretim düzeyleri üzerine etkisini incelediğimizde, geniş bir uyarım süresi aralığında IL-1 β , IL12p70 ve TNF üretimini görmekle birlikte, 8-12 saatlik uyarımın optimum süre olduğu kanısındayız. M2a makrofajlarda IL10 üretimi, 48-72 saatlik uyarımda; M2c makrofajlarda TGF β üretimi ise 72 saatlik uyarımda en belirgin düzeye ulaşmıştır.

ABC taşıyıcılar, ATP hidrolizinden elde ettikleri enerjiyi substratlarını taşımak için kullanırlar (51). ABCG1, ABC taşıyıcılar ailesinin, ABCG taşıyıcılar alt ailesine mensup bir yarı taşıyıcıdır. Homodimer ya da heterodimer oluşturarak fonksiyonel hale gelir (12,48). ABCG1 ters kolesterol transportu yolu ile hücreden aldığı kolesterolü HDL parçacıklarına aktaran bir kolesterol taşıyıcısıdır (7,8). Yapılan çalışmalar ABCG1'in kolesterol taşımının ötesinde, makrofajların immün cevabını yönlendirmede ve tümör bağışıklığında da rol oynadığını göstermiştir. (13–16).

ABCG1^{-/-} fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, western diyet ile beslenen farelerde, tümörle ilişkili makrofajların fenotipinin tümörü destekleyen M2'den tümörle savaşan M1 fenotipine dönüştüğü ve bu sayede subkutan MB49 mesane kanserinin gelişmesinin baskılandığı tespit edilmiştir. Yapılan ileri çalışmalar ABCG1^{-/-} makrofajların M1 fenotipine intrinsik bir eğilim sergilediği ve M1 fenotipindeki bu hücrelerin tümör hücrelerini öldürebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma bir kolesterol taşıyıcı molekül olan ABCG1'in makrofaj polarizasyonunu yönlendirebildiğini ve tümör bağışıklığında bir aracı molekül olarak rol aldığını göstermektedir (16). Fareler üzerinde yapılmış olan bu heyecan verici çalışmanın

sonuçları, kayda değer bir biçimde önemlidir ve ABCG1'in kanser tedavisinde, bir hedef molekül adayı olabileceğini önermektedir. Ancak ABCG1'in insan makrofaj polarizasyonunu da benzer şekilde etkileyip etkilemediği net değildir.

Tez projemizin amacı; ABCG1 eksikliğinin, insan makrofajlarının polarizasyonundaki rolünü belirlemektir. Projemizde; insanlarda ABCG1 ekspresyonundaki düşüşün, farelerdeki benzer şekilde, makrofajlarda M1 polarizasyonuna doğru bir eğilime neden olup olmadığını test ettik. Bu amaçla primer insan monositlerinden türetilmiş makrofajların ABCG1 ekspresyonunu siRNA ile susturduk. ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajları, polarizasyon faktörleri ile uyatarak M1 ve M2 fenotiplerine polarize ettik. Ardından M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonunu RT-qPCR ile analiz ettik. Sonuçlarımıza göre ABCG1 ekspresyonu siRNA ile baskılanmış makrofajlarda, LPS-IFN γ ile uyarma sonrası M1 polarizasyon belirteçleri CXCL9, CXCL10, TNF α ve IDO1 ekspresyonlarında artış gözlenirken; IL-4 ile uyarma sonrası M2a polarizasyon belirteçleri MRC1 ve CCL22 ekspresyonlarında azalma gözlemlendi. Bu sonuçlar; ABCG1 ekspresyonundaki baskılanmanın, insan makrofajlarında M1 polarizasyonuna doğru bir eğilime neden olduğunu göstermektedir. M1 fenotipine yönelmiş makrofajlar, inflamatuvar karakterdedir; anti-tümör ve anti-mikrobiyal özellikler sergilerler. Sonuçlarımız, Sağ ve ark.'nın farelerde ABCG1^{-/-} makrofajların, M1 fenotipine doğru intrinsik olarak yöneldiğini ve mesane kanseri tümör hücrelerini direk olarak öldürebildiğini gösterdikleri çalışmayı destekler niteliktedir (16).

Baldan ve ark. ABCG1^{-/-} farelerin makrofajlarında, inflamatuvar sitokin ekspresyonunun arttığını rapor etmiştir (13). Wojcik ve ark. da benzer şekilde, ABCG1 ekspresyonunun baskılanmasının makrofajlarda aşırı inflamatuvar bir fenotipe neden olduğunu bildirmiştir (15). ABCG1 ekspresyonu silinmiş makrofajlardaki artan sitokin üretimi, farelerde pulmoner lipidoz ve akciğer iltihabı ile sonuçlanmaktadır (13,15,95). Tian ve ark. ise insanda ABCG1 ekspresyonunun, akciğer kanserinde arttığını rapor etmiştir. Ayrıca ABCG1'in; proliferasyon, apoptoz ve kök hücre ile ilgili belirteçleri düzenlediğini bildirmiştir. Bu çalışmada ABCG1'in, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisi için terapötik bir hedef olabileceği öngörülmüştür (96). ABCG1 ekspresyonundaki dengesizlik; ateroskleroz, Alzheimer, obezite ve tip 2 diyabet gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (67,97–99). Görüldüğü gibi

ABCG1, kanserden metabolik hastalıklara kadar, geniş bir yelpazede birçok hastalığın patogenezi ile bağlantılıdır. Bu bağlantı aynı zamanda, ABCG1 ekspresyonunun kontrolünün, bu hastalıkların tedavisi için yeni bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

Mauldin ve ark. Tip 2 diyabet hastalarının makrofajlarında, ABCG1 ekspresyonunun azaldığını rapor etmiştir (17). Tip 2 diyabet hastalarında ABCG1 ekspresyonunun doğal olarak az olması, onları ABCG1 ekspresyonunun makrofajlarda susturulduğu insan modeli olarak ele almamıza imkân sağlamıştır. Bir önceki bölümde makrofajların ABCG1 ekspresyonunu siRNA ile baskılayarak, ABCG1 eksikliğin makrofaj polarizasyonu üzerine etkilerini araştırmıştık. Bu bölümde ise tip 2 diyabet hastaları ve kontrol grubundan elde edilen monositlerden türetilmiş makrofajlar polarize edildi ve M1/M2 polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonları karşılaştırıldı. Ardından tip 2 diyabetli hastalar ve sağlıklı kontrollerde, ABCG1 ekspresyonu ile polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonu arasındaki korelasyonun araştırıldı. Diyabetli hastalarda, M1 belirteçleri CXCL10 ve IDO1 ekspresyonları anlamlı artış gösterirken; CXCL9 ve TNF ekspresyonları artış eğilimi gösterdi. M1 belirteçlerinin aksine M2 belirteçleri MRC1, TGM2, CCL17 ve CCL22 ekspresyonları diyabetli hastalarda düştü. Korelasyon çalışmalarında da hem sağlıklı kontrollerde hem de diyabet hastalarında, ABCG1 ekspresyonu ile M1 polarizasyon belirteçleri arasında negatif korelasyon bulunurken, M2a polarizasyon belirteçlerinin büyük bölümü ile pozitif korelasyon bulunmuştur. Sonuçlarımız diyabetli hastalarda makrofajların, siRNA ile ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajlara benzer şekilde, M1 fenotipine doğru bir eğilim sergilediğini göstermektedir. Diyabetik fare modellerinde de makrofajlarda ABCG1 ekspresyonunun düştüğü bildirilmiştir. Diyabetik makrofajlarda, ABCG1 ekspresyonunun azalmasının, kısmen ortamdaki yüksek glikoz varlığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (83,84). Tip 2 diyabet hastalarından elde edilen monositlerde de ABCG1 ekspresyonunun düşük olduğunu bildirilmiştir (85). ABCG1 ekspresyonundaki azalmanın, HDL'ye kolesterol akışının azalmasına ve makrofajlarda hücre içinde kolesterol birikiminin artmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Makrofajlarda kolesterol birikimi, makrofaj köpük hücre oluşumunu tetiklemekte ve damar duvarlarında aterosklerotik plak gelişimine neden olmaktadır (17,83,85). Tip 2 diyabet hastalarında makrofajların ABCG1

ekspresyonunun arttırılmasına yönelik tedaviler, diyabet hastalarında gelişen ateroskleroz ya da damar tıkanıklığı komplikasyonlarının giderilmesine katkıda bulunabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda, ABCG1 ekspresyonu baskılanmış, primer insan makrofajlarının, M1 polarizasyonuna doğru bir eğilim sergilediğini gösterdik. M1 makrofajlar, inflamatuvar karakterleri nedeni ile anti-mikrobiyal ve anti-tümöral özelliktedir. Önceki çalışmalarda farelerde ABCG1 ekspresyonu baskılanmış makrofajların, M1 fenotipine doğru intrinsik bir eğilim gösterdiği ve tümör hücrelerini öldürebildiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamız insanlarda da, ABCG1 ekspresyonunun baskılanmasının makrofajlara inflamatuvar karakter kazandırdığını göstermiştir. Ayrıca, çalışmamız insan makrofajlarında ABCG1 ifadesi ile M1 belirteçleri arasında negatif bir korelasyon, M2 belirteçleri ile pozitif bir korelasyon olduğunu göstererek ABCG1'in insan makrofaj polarizasyonundaki rolünü ortaya koymuştur. Primer insan makrofajlarının polarizasyonunun yönlendirilmesi için, ABCG1 bir hedef molekül olarak kullanılabilir; bu yolla kanser başta olmak üzere, düzensiz makrofaj polarizasyonundan etkilenen birçok hastalık için yeni tedavi seçenekleri geliştirilebilir.

Makrofaj polarizasyonu in-vivoda çeşitli stimülanlar kullanılarak taklit edilebilmektedir. Bu sayede makrofaj polarizasyonunu çeşitli hastalık modelleri üzerinde laboratuvarında çalışmak mümkün olmaktadır. Ancak M1 ve M2 polarizasyonu için kullanılan stimülanların uyarım süresi konusunda literatürde bir fikir birliği yoktur. Bu durum çalışmalarda yanlış negatif sonuçların alınmasına ve çalışmaların birbiri ile karşılaştırılmasında güçlükler neden olmaktadır. Biz M1 ve M2 stimülanları, monositlerden türetilmiş primer insan makrofajlarına 4, 8, 12, 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulayarak, M1 ve M2 belirteçlerinin ekspresyonlarını inceledik. 4 saatlik uyarım süresinin gen ekspresyonu düzeyinde, M1 ve M2 belirteçlerinin aynı anda çalışabilmesi için optimum ortak süre olduğu sonucuna vardık. Sonuçlarımız, bu alanda çalışan araştırmacılar için bir rehber olarak kullanılabilecek niteliktedir.

Tip 2 diyabet hastalarının makrofajlarında ABCG1 ekspresyonunun düşük olması, onları, doğal olarak ABCG1 ekspresyonu baskılanmış modeller olarak kullanmamıza olanak tanıdı. Tip 2 diyabet hastalarının monositlerinden türetilen makrofajlar da, M1 fenotipine doğru bir eğilim sergilemektedir. Tip 2 diyabet

hastalarında, ateroskleroz ve damar hastalıkları riskinin artması, makrofajlarında azalmış ABCG1 ekspresyonuna bağlı kolesterol birikimi ve köpük hücre oluşumundan kaynaklanmaktadır. Bu noktada makrofajlarda ABCG1 ekspresyonunun yönlendirilmesi, tip 2 diyabet hastalığının çeşitli komplikasyonlarının önlenmesi için önemli bir tedavi seçeneği olabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):509–13.
2. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958–69.
3. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013;229(2):176–85.
4. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation.* American Society for Clinical Investigation. 2012;122(3):787–95.
5. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166–73.
6. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
7. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9774–9.
8. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan Angel, Tarr P ve ark. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1(2):121–31.
9. Sturek JM, Castle JD, Trace AP, Page LC, Castle AM, Evans-Molina C ve ark. An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic β cells. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2575–89.
10. Tarling EJ, Edwards PA. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(49):19719–24.
11. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):125–38.
12. Tarr PT, Tarling EJ, Bojanic DD, Edwards PA, Baldán A. Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2009;1791(7):584–93.
13. Baldán Á, Gomes A V., Ping P, Edwards PA. Loss of ABCG1 Results in Chronic Pulmonary Inflammation. *J Immunol.* 2008;180(5):3560–8.
14. Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, Ranalletta M, Lamkanfi M, Han S ve ark. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: Free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2008;118(18):1837–47.
15. Wojcik AJ, Skafien MD, Srinivasan S, Hedrick CC. A critical role for ABCG1 in macrophage inflammation and lung homeostasis. *J Immunol.* 2008;180(6):4273–82.
16. Sag D, Cekic C, Wu R, Linden J, Hedrick CC. The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity. *Nat Commun.* 2015;6:6354.

17. Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, Srinivasan S, Skafien MD, Ayers CR ve ark. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2008;117(21):2785–92.
18. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. Nature Publishing Group; 2013;496:445–55.
19. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DMW. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;61:3–11.
20. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1478–83.
21. Yamasaki K, Van Eeden SF. Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):582.
22. Yu M, Zhou H, Zhao J, Xiao N, Roychowdhury S, Schmitt D ve ark. MyD88-dependent interplay between myeloid and endothelial cells in the initiation and progression of obesity-associated inflammatory diseases. *J Exp Med*. 2014;211(5):1003.
23. Zhao YY, Zou W, Du J, Zhao YY. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. *J Cell Physiol*. 2018;233(10):6425–39.
24. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):281–6.
25. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. 2011;11(11):750–61.
26. Qian C, Yun Z, Yao Y, Cao M, Liu Q, Hu S ve ark. Heterogeneous macrophages: Supersensors of exogenous inducing factors. *Scand J Immunol*. 2019;90(1):e12768.
27. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11(10):889–96.
28. Akira S, Misawa T, Satoh T, Saitoh T. Macrophages control innate inflammation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2013;15:10–8.
29. Navegantes KC, Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. *J Transl Med*. 2017;15(1):1–21.
30. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG ve ark. Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2008;18(5):349–55.
31. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(6):1801.
32. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008;13(4):453–61.

33. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W ve ark. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. PLoS One. 2012;7(9):e45466.
34. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*. Frontiers; 2014;5:614.
35. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol*. 2006;177:7303–11.
36. Wilson HM. SOCS proteins in macrophage polarization and function. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2014;5:357.
37. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3:23–35.
38. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*. 2002;23(11):549–55.
39. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004;25(12):677–86.
40. Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, Rong XL, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019;106(2):345–58
41. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing macrophages in vitro. In: *Methods in Molecular Biology*. 2018;1784:119–26.
42. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F ve ark. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(9):6425–40.
43. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* . 2015;2015: 816460.
44. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2011;89(4):557–63.
45. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593–604.
46. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. 2005;23(4):344–46.
47. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: Weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol*. 2014;5:470.
48. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*. 2001;42(7):1007–17.
49. Higgins CF. ABC Transporters: From microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*. 1992;8:67–113.

50. Domenichini A, Adamska A, Falasca M. ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2019;1863(1):52–60.
51. Moody JE, Millen L, Binns D. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* . 2002;277(24):21111–4.
52. Martin LJ, Lau E, Singh H, Vergnes L, Tarling EJ, Mehrabian M ve ark. ABCC6 localizes to the mitochondria-associated membrane. *Circ Res* . 2012;111(5):516–20.
53. Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M ve ark. Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. *J Biol Chem* . 2001;276(29):27584–90.
54. Graf GA, Li W-P, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC ve ark. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 2002;110(5):659–69.
55. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett*. 2006;580(4):1023–35.
56. Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: Perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(6):682–99.
57. Kusuvara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch*. 2007;453(5):735–44.
58. Savary S, Denizot F, Luciani M-F, Mattei M-G, Chimini G. Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila* white gene. *Mamm Genome*. 1996;7(9):673–6.
59. Chen H, Rossier C, Lalioti MD, Lynn A, Chakravarti A, Perrin G ve ark. Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila* white gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am J Hum Genet*. 1996;59(1):66–75.
60. Croop JM, Tiller GE, Fletcher JA, Lux ML, Raab E, Goldenson D ve ark. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene*. 1997;185(1):77–85.
61. Lorkowski S, Kratz M, Wenner C, Schmidt R, Weitkamp B, Fobker M ve ark. Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter Gene ABCG1 (ABC8) in Tangier Disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(4):821–30.
62. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N ve ark. Characterization of the Human ABCG1 Gene: Liver X Receptor Activates An Internal Promoter That Produces A Novel Transcript Encoding An Alternative Form of the Protein. *J Biol Chem* . 2001;276(42):39438–47.
63. Nakamura K, Kennedy MA, Baldán Á, Bojanic DD, Lyons K, Edwards PA ve ark. Expression and Regulation of Multiple Murine ATP-binding Cassette Transporter G1 mRNAs/Isoforms That Stimulate Cellular Cholesterol Efflux to High Density Lipoprotein. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45980–9.

64. Hsieh V, Kim MJ, Gelissen IC, Brown AJ, Sandoval C, Hallab JC ve ark. Cellular cholesterol regulates ubiquitination and degradation of the cholesterol export proteins ABCA1 and ABCG1. *J Biol Chem* . 2014;289(11):7524–36.
65. Gelissen IC, Cartland S, Brown AJ, Sandoval C, Kim M, Dinnes DL ve ark. Expression and stability of two isoforms of ABCG1 in human vascular cells. *Atherosclerosis*. 2010;208(1):75–82.
66. Baldán Á, Tarr P, Lee R, Edwards PA. ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(3):227–32.
67. Hardy LM, Frisdal E, Le Goff W. Critical role of the human ATP-binding cassette G1 transporter in cardiometabolic diseases. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1892.
68. Cserepes J, Szentpétery Z, Seres L, Özvegy-Laczka C, Langmann T, Schmitz G, ve ark. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: Indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):860–7.
69. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-Induced Redistribution of ABCG1 to Plasma Membrane in Macrophages Enhances Cholesterol Mass Efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1310-6.
70. Xie Q, Engel T, Schnoor M, Niehaus J, Hofnagel O, Buers I ve ark. Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(11):e143-4
71. Wang F, Li G, Gu HM, Zhang DW. Characterization of the role of a highly conserved sequence in ATP binding cassette transporter G (ABCG) family in ABCG1 Stability, oligomerization, and trafficking. *Biochemistry*. 2013;52(52):9497–509.
72. Kobayashi A, Takanezawa Y, Hirata T, Shimizu Y, Misasa K, Kioka N ve ark. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res*. 2006;47(8):1791–802.
73. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(3):534–40.
74. Engel T, Kannenberg F, Fobker M, Nofer JR, Bode G, Lueken A, et al. Expression of ATP binding cassette-transporter ABCG1 prevents cell death by transporting cytotoxic 7beta-hydroxycholesterol. *FEBS Lett* . 2007;581(8):1673–80.
75. Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, Wang N, Mzhavia N, Langlois R ve ark. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3701–13.
76. Olivier M, Bott R, Frisdal E, Nowicki M, Plengpanich W, Desmarchelier C ve ark. ABCG1 is involved in vitamin e efflux. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(12):1741–51.
77. Klucken J, Büchler C, Orsó E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G ve ark. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):817–22.

78. Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JMA, Bronson A, Mangelsdorf DJ, Edwards PA. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem.* 2000;275(19):14700–7.
79. Out R, Jessup W, Le Goff W, Hoekstra M, Gelissen IC, Zhao Y ve ark. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ Res.* 2008;102(1):113–20.
80. Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, Li R ve ark. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3900–8.
81. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki I V., Billheimer JT, Rothblat GH ve ark. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest .* 2007;117(8):2216–24.
82. Van Eck M, Bos IST, Kaminski WE, Orsó E, Rothe G, Twisk J ve ark. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 2002;99(9):6298–303.
83. Mauldin JP, Srinivasan S, Mulya A, Gebre A, Parks JS, Daugherty A, et al. Reduction in ABCG1 in type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J Biol Chem.* 2006;281(30):21216–24.
84. Daffu G, Shen X, Senatus L, Thiagarajan D, Abedini A, Hurtado Del Pozo C, et al. RAGE Suppresses ABCG1-Mediated Macrophage Cholesterol Efflux in Diabetes. *Diabetes.* 2015;64(12):4046–60.
85. Zhou H, Tan KCB, Shiu SWM, Wong Y. Determinants of leukocyte adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 gene expression in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2008;57(8):1135–40.
86. Purcu DU, Korkmaz A, Gunalp S, Helvacı DG, Erdal Y, Dogan Y ve ark. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLoS One.* 2022;17(3): e0265196.
87. Kim S, Miller BJ, Stefanek ME, Miller AH. Inflammation-induced activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway: Relevance to cancer-related fatigue. *Cancer.* 2015;121(13):2129–36.
88. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303–11.
89. Iqbal S, Kumar A. Characterization of In vitro Generated Human Polarized Macrophages. *J Clin Cell Immunol.* 2015;06(06):380.
90. De Vries JE. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med.* 1995;27(5):537–41.
91. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 1998;160(7):3188-93.

92. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* . 1991;174(5):1209–20.
93. Vogel DYS, Glim JE, Stavenhagen AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*. 2014;219(9):695–703.
94. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, Reedquist KA, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods*. 2012;375(1–2):196–206.
95. Baldán Á, Tarr P, Vales CS, Frank J, Shimotake TK, Hawgood S, et al. Deletion of the Transmembrane Transporter ABCG1 Results in Progressive Pulmonary Lipidosis. *J Biol Chem*. 2006;281(39):29401–10.
96. Tian C, Huang D, Yu Y, Zhang J, Fang Q, Xie C. ABCG1 as a potential oncogene in lung cancer. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):3189–94.
97. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR. ATP-Binding Cassette Transporters, Atherosclerosis, and Inflammation. *Circ Res*. 2014;114(1):157–70.
98. Tansley GH, Burgess BL, Bryan MT, Su Y, Hirsch-Reinshagen V, Pearce J, et al. The cholesterol transporter ABCG1 modulates the subcellular distribution and proteolytic processing of β -amyloid precursor protein. *J Lipid Res*. 2007;48(5):1022–34.
99. Marchi C, Adorni MP, Caffarra P, Ronda N, Spallazzi M, Barocco F et al. ABCA1- and ABCG1-mediated cholesterol efflux capacity of cerebrospinal fluid is impaired in Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 2019;60(8):1449–56.

8. EKLER

EK 1 ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2532-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Kolesterol Taşıyıcı ABCG1'in Fare ve İnsan Tümör ile İlişkili Makrofajlarındaki Rolü"
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Yard.Doç.Dr.Duygu SAG
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	Araştırmacı Dilekçesi	20.07.2016	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/20-24	Tarih:21.07.2016
	Yard.Doç.Dr.Duygu SAĞ'ın sorumlusu olduğu "Kolesterol Taşıyıcı ABCG1'in Fare ve İnsan Tümör ile İlişkili Makrofajlarındaki Rolü" isimli klinik araştırma 10.03.2016 tarihinde onay almış olup insan ile ilgili bölümünün "Kolesterol Taşıyıcı ABCG1'in İnsan Makrofajlarındaki Rolü" ismi ile Duygu Ünüvar Purcu'nun doktora tezi olması uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevine ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÖTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr.Duygu SAĞ

Araştırmaya ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ACIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3510-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Makrofajlarındaki ATP - Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı G1'in İmmünoterapide Hedef Molekül Adayı Olarak Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Duygu SAĞ İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	Araştırmacı dilekçesi	15.01.2019		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/02-39	Tarih:30.01.2019
	Doç.Dr.Duygu SAĞ'ın sorumlusu olduğu "İnsan Makrofajlarındaki ATP - Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı G1'in İmmünoterapide Hedef Molekül Adayı Olarak Araştırılması" isimli klinik araştırma 07.09.2017 tarihinde 2017/21-37 karar no ile onay almış olup, projenin bir bölümünün "Kolesterol Taşıyıcı ABCG1'in İnsan Makrofajlarındaki Rolü" ismi ile Duygu Ünüvar Purcu'nun doktora tezi olması ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
---------------	--

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Can SEVİNÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Nil Hocaoglu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

EK 2 ARBİS ÖZGEÇMİŞ

DUYGU ÜNÜVAR PURCU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi
Telefon
E-posta
İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

29 Ağustos 2014 - Şu Anda (7 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.85 / 4.0

15 Eylül 2008 - 08 Ekim 2014 (6 yıl 1 ay)
Doktora, Doktora, MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOLOJİ (DR)

14 Şubat 2002 - 21 Mart 2005 (3 yıl 2 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, GENEL BİYOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: 3276
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 86.92 / 100.0

05 Eylül 1996 - 07 Temmuz 2000 (3 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR.
Diploma Numarası: 87
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 67.44 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Mikrobiyoloji -- İmmünoloji

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Kanser
Moleküler Biyolojisi

Anahtar Kelimeler

Tümör İmmünolojisi
Kanser Moleküler Biyolojisi
Kantitatif PZR
İmmün Aktivasyon
Moleküler İmmünoloji
Akım Sitometrisi

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

D. ÜNÜVAR PURCU, Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers, PLOS ONE, 2022, 1932-6203, 17, 3, e0265196.

D. ÜNÜVAR PURCU, C. I. B. U. A. D. P. D. K. S. Y. O. KOÇDOR P & C. I. B. U. A. D. P. D. K. S. Y. O. KOÇDOR P, Quantifying the expression of VEGF using qRT-PCR, evaluation of MVD and their correlation with clinicopathological factors in laryngeal squamous cell carcinoma, Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg., 2011, 1300-7475, 21, 3, 137-144.

D. U. PURCU, D. U. PURCU, B. KARACA, B. KARACA, M. KAPKAC, M. KAPKAC, N. OZDEMİR, N. OZDEMİR, S. UZUNOGLU, S. UZUNOGLU, R. USLU & R. USLU, High-Resolution Melting Analysis for Screening of Turkish Germline Mutations in BRCA1 and BRCA2, UHOD-ULUSLARARASI HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ DERGİSİ, 2010, 1306-133X, 20, 4, 235-240.

S. B. KARACA, S. B. KARACA, U. MUSLU, U. MUSLU, B. ÇAKAR, B. ÇAKAR, A. KİSİM, A. KİSİM, H. ATMACA, H. ATMACA, D. U. PURCU, D. U. PURCU, S. UZUNOGLU, S. UZUNOGLU, R. USLU & R. USLU, Synergistic cytotoxic/apoptotic effects of AT-101, a phytochemical with BIB-mimetic property, in combination with paclitaxel in human breast cancer cells, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2010, 0732-183X, 28, 15.

H. ATMACA, H. ATMACA, G. GORUMLU, G. GORUMLU, B. KARACA, B. KARACA, M. DEĞİRMENCİ, M. DEĞİRMENCİ, D. TUNALI, D. TUNALI, Y. CİRAK, Y. CİRAK, D. U. PURCU, D. U. PURCU, S. UZUNOGLU, S. UZUNOGLU, B. KARABULUT, B. KARABULUT, U. A. SANLI, U. A. SANLI, R. USLU & R. USLU, Combined gossypol and zoledronic acid treatment results in synergistic induction of cell death and regulates angiogenic molecules in ovarian cancer cells, EUROPEAN CYTOKINE NETWORK, 2009, 1148-5493, 20, 3, 121-130.

D. UNUVAR, D. UNUVAR, B. A. İSİR, B. A. İSİR, G. CANKUS, G. CANKUS, S. PEHLİVAN & S. PEHLİVAN, Y CHROMOSOMAL STR LOCUS DYS385 IN AZOOSPERMIC AND FERTILE MEN FROM THE AEGEAN REGION OF TURKEY: IS THERE ANY FORENSIC RELEVANCE?, BALKAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, 2008, 1311-0160, 11, 2, 39-44.

P KARA, P KARA, D OZKAN, D OZKAN, A ERDEM, A ERDEM, K KERMAN, K KERMAN, S PEHLİVAN, S PEHLİVAN, F OZKINAY, F OZKINAY, D UNUVAR, D UNUVAR, G İTİRLİ, G İTİRLİ, M OZSOZ & M OZSOZ, Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, CLINICA CHIMICA ACTA, 2003, 0009-8981, 336, 1-2, 57-64.

Bildiriler

A. KORKMAZ, D. ÜNÜVAR PURCU & D. SAĞ WINGENDER, ABCG1 modulates Macrophage Polarization in Type 2 Diabetes, Poster Sunumu, 6th European Congress of Immunology, 01 Eylül 2021, 04 Eylül 2021, 0014-2980, 51, S1, 149 - null.

D. ÜNÜVAR PURCU, S. GÜNALP, A. KORKMAZ, D. G. HELVACI, Y. ERDAL & D. SAĞ WINGENDER, The effect of time course on the expression of human macrophage polarization markers., Poster Sunumu, 6th European Congress of Immunology, 01 Eylül 2021, 04 Eylül 2021, 0014-2980, 51, S1, 152 - null.

D. ÜNÜVAR PURCU, S. GÜNALP, A. KORKMAZ, D. G. HELVACI, Y. ERDAL, R. ÖZBİLGİÇ, A. SUNER KARAKÜLAH & D. SAĞ WINGENDER, Makrofaj polarizasyonunda, uyarım süresinin polarizasyon belirteçlerinin ekspresyonu üzerine etkisi, Poster Sunumu, XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi , 20 Kasım 2020, 22 Kasım 2020, 30 - null.

S. GÜNALP, D. G. HELVACI, D. ÜNÜVAR PURCU, A. KORKMAZ, R. ÖZBİLGİÇ, G. KARAKÜLAH & D. SAĞ WINGENDER, TRAIL: İnsan makrofaj polarizasyonunda yeni bir modülatör, Sözlü Sunum, XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi , 20 Kasım 2020, 22 Kasım 2020, 2 - null.

A. KORKMAZ, D. ÜNÜVAR PURCU, S. GÜNALP, R. ÖZBİLGİÇ, D. G. HELVACI & D. SAĞ WINGENDER, Tip 2 diyabet hastalarında ABCG1-aracılı makrofaj polarizasyonunun araştırılması, Poster Sunumu, XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi , 20 Kasım 2020, 22 Kasım 2020, 21 - 22.

D. SAĞ WINGENDER, D. ÜNÜVAR PURCU & M. ALTUNAY, The cholesterol transporter ABCG1 modulates macrophage polarization in human monocyte-derived macrophages, Özet Bildiri, The Journal of Immunology, 01 Mayıs 2019, 01 Mayıs 2019, 202, Issue 1 Supplement, 187.22..

D. ÜNÜVAR PURCU, S. GÜNALP, A. KORKMAZ, M. ALTUNAY & D. SAĞ WINGENDER, ABCG1 modulates macrophage polarization in human monocyte-derived macrophages., Poster Sunumu, International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress IV (MIMIC IV), 27 Nisan 2019, 29 Nisan 2019.

M. ALTUNAY, S. GÜNALP, D. ÜNÜVAR PURCU & D. SAĞ WINGENDER, Molecular mechanism for M1 bias of ABCG1-deficient macrophages., Sözlü Sunum, International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress IV (MIMIC IV), 27 Nisan 2019, 29 Nisan 2019.

D. ÜNÜVAR PURCU, S. GÜNALP, M. ALTUNAY, G. E. BAŞLAR & D. SAĞ WINGENDER, ABCG1 modulates macrophage polarization in human monocyte-derived macrophages, Poster Sunumu, 5th European Congress of Immunology, 02 Eylül 2018, 05 Eylül 2018, 222 - null.

M. ALTUNAY, S. GÜNALP, D. ÜNÜVAR PURCU, R. ÖZBİLGİÇ, Z. Ö. AYYILDIZ, F. Z. HAPİL, Z. TAVŞAN, G. WINGENDER & D. SAĞ WINGENDER, Molecular mechanism for M1 bias of ABCG1-deficient macrophages, Poster Sunumu, 5th European Congress of Immunology,, 02 Eylül 2018, 05 Eylül 2018, 219 - null.

B. KARACA, D. ÜNÜVAR PURCU, M. KAPKAÇ, N. ÖZDEMİR, G. GÖRÜMLÜ, H. ATMACA İLHAN, S. UZUNOĞLU, B. KARABULUT, U. ŞANLI & R. USLU, Comparison of Human Breast Cancer and Estrogen Receptor Signaling mRNA Expression Profiles of Normal and Pathologic Tissue Samples from Turkish Breast Cancer Patients, Poster Sunumu, Joint 4th EORTC Pathobiology Group Annual Metin & 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress, 21 Mayıs 2009, 24 Mayıs 2009, 46 - null.

B. KARACA, H. ATMACA İLHAN, A. G. ENİSELER, D. ÜNÜVAR PURCU, A. KISIM, B. KARABULUT, S. UZUNOĞLU & R. USLU, Synergistic effect of gossypol, a cotton-plantseed, with conventional chemotherapeutics in MCF7 cells, Poster Sunumu, Third International Congress of Molecular Medicine, 05 Mayıs 2009, 08 Mayıs 2009, 61, 336.

D. ÜNÜVAR PURCU & S. PEHLİVAN, İnsan Y Kromozomunda Yer Alan DYS385 Polimorfizmlerinin Azospermik ve Fertil Erkeklerde Araştırılması, Sözlü Sunum, I.

Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, 16 Nisan 2005, 19 Nisan 2005.

P. KARA, D. ÖZKAN, A. ERDEM, K. KERMAN, S. PEHLİVAN, F. ÖZKINAY, D. ÜNÜVAR
PURCU, G. ITIRLI, H. KARADENİZ & M. ÖZSÖZ, İndikatörsüz elektrokimyasal
genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini, Sözlü
Sunum, III. Bilimsel Araştırma Forumu, 10 Mart 2003, 14 Mart 2003.

P. KARA, D. ÖZKAN, A. ERDEM, K. KERMAN, S. PEHLİVAN, F. ÖZKINAY, D. ÜNÜVAR
PURCU, G. ITIRLI, H. KARADENİZ & M. ÖZSÖZ, İndikatörsüz elektrokimyasal
genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini, Sözlü
Sunum, Proje Sergisi 02- Ege Üniversitesi Bilim?Teknoloji Uygulama ve Araştırma
Merkezi(EBİLTEM), 04 Kasım 2002, 15 Kasım 2002.