

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR RESEPTÖR-1 ‘İN
SRC-HOMOLOJİ-3 BAĞLANMA BÖLGESİNİN SİNYAL
İLETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Fatma Ece ÇOPUROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR RESEPTÖR-1 ‘İN
SRC-HOMOLOJİ-3 BAĞLANMA BÖLGESİNİN SİNYAL
İLETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Fatma Ece ÇOPUROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Şükran Burçak YOLDAŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TYL-2018-3105 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

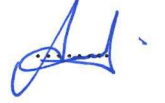
Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28/01/2019

İmza

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Şükran Burçak YOLDAŞ
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof.Dr.Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Dr.Öğr.Üyesi Gökhan GÖRGİŞEN
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi



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

Prof.Dr.Narin DERİN

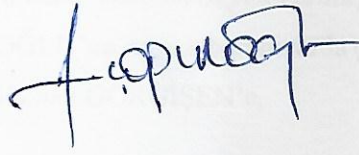
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

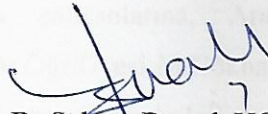
Fatma Ece ÇOPUROĞLU

İmza



Doç.Dr.Şükran Burçak YOLDAŞ

İmza



TEŞEKKÜR

Yola başladığımdan itibaren beni bilgiyle donatan, doğru yolu ve cevapları bulmamda ışık tutan kişilere teşekkürlerimi borç bilirim.

Öncelikle bana bir şans verip kendi grubunda çalışmama müsaade gösteren, sahip olduklarını ihtiyacı olan herkesle paylaşan ve bana iş ahlakını öğreten, sadece bilgisini değil, hayata olan duruşunu da örnek aldığım bilim insanı Prof.Dr.Osman Nidai ÖZEŞ'e,

Yüksek lisans ve tez eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen ve beni öğrencisi olarak kabul eden, akademik desteğinin yanı sıra disiplini ve azmiyle bana güçlü bir kadın olmayı gösteren Doç.Dr.Şükran Burçak YOLDAŞ'a,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri olan başta anabilim dalı başkanımız Prof.Dr.İbrahim KESER olmak üzere beni ailelerine kabul eden hocalarıma,

Tez sınavım için jüri üyeleğini kabul eden en büyük karmaşıklığı en basit haliyle öğreten Prof.Dr.Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na, aynı laboratuvarında çalışma fırsatı bulduğum fakat geç kaldığım Dr.Öğr.Üyesi Gökhan GÖRGİŞEN'e,

Kendimi bildim bileli yanımda olan ve eksilmeyen dost Nisanur Şükran HAPİL'e, öğrendiği tüm tekniği, bilgiyi paylaşan ve bilim insanı olabilmem için çaba harcayan zekasıyla parıldayan Dr.Fatma Zehra HAPİL'e, ismi gibi ufuk açan sohbetlerimiz için Dr.Ufuk MERT'e, Araş.Gör.Gökçe ERDOĞAN'a, anne sıcaklığında Betül BAYSAL'a, Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanlarına, Araş.Gör.Münevver KARAMAN'a, Araş.Gör.Ceren HANGÜL'e, Dr.Öğr.Üyesi M.Gökhan ERTOSUN'a, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğrencilerine, Farmakoloji asistanlarına, Ankara ve Antalya'daki dostlarıma, her anımda yanımda olan Cenk Buğra SOYDEMİR'e,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü akademik ve idari personeline,

Kelimelerle anlatamayacağım destekleriyle, sonsuz sevgileriyle her türlü nazımı çekip dünya görüşümü ve ahlakımı kazanmamı sağlayan her şeyden öte canım ailem; babam Mehmet Ulvi , annem Emine ve Ali Emre ÇOPUROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α), pleiotropik bir sitokin olup, biyolojik işlevini TNFR1 ve TNFR2 ile bağlanarak gösterir. TNFR1 içerdiği “ölüm bölgesi” aracılığıyla kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptozisi indüklerken, TAK1 aktivasyonu ile IKK α/β , MKK3/6, MKK4/7 gibi enzimleri aktive eder. IKK α/β aktivasyonu NF- κ B indüksiyonu sağlarken, MKK3/6 ve MKK4/7 aktivasyonları sırasıyla p38 ve JNK kinazlarının aktivasyonlarını sağlar. TNFR1 sinyal yolağının aktivasyonu büyük oranda bilinmesine rağmen ERK1/2 ve AKT aktivasyonlarının nasıl sağlandığı bilinmemektedir. Bu iki enzimin aktivasyonunu Grb2-Ras veya SRC-Ras yolları üzerinden yapabileceğini varsayarak bu adaptörlerin bağlanma bölgelerinin TNFR1 üzerinde yer alabileceğini düşündük ve TNFR1 amino asit dizisini incelediğimizde, C-terminalinde SH3 bölgesi tarafından tanınan “P₄₄₈PAP₄₅₁” bölgesini keşfettik. Bu bilgiler doğrultusunda, bu bölgenin TNFR1 sinyal iletim mekanizmasında rolü olup olmadığını tespit etmek ve TNF- α varlığında TNFR1 reseptörünün SH3 bölgesi üzerinden sinyal iletimi başlatıp başlatmadığını gün ışığına çıkarmak istedik.

Yöntem: TNFR1’in SH3 bağlanma bölgesinde yer alan P₄₄₈ ve P₄₅₁ no’lu aminoasitlerin kodu, bölgeye spesifik mutasyon (side directed mutagenesis).16 yöntemiyle alanin kodlayan GCG kodonuna dönüştürülmüş ve plazmid TNFR1-SH3-P/A olarak isimlendirilmiştir. Ardından, yabanıl tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A ektopik olarak 293T hücrelerinde eksprese edilmiş ve bu ekspresyonların TNF α -aracılı ERK, p38, JNK ve AKT aktivasyon fosforilasyonlarına olan etkisi Western Blot yöntemi ile, NF- κ B aktivasyonuna olan etkisi “NF-Luc lusiferaz reporter” yöntemi ile, hücre proliferasyonuna olan etkisi MTT testi ile ve kaspaz aktivasyonunu “kaspaz aktivasyon kit” ile belirledik.

Bulgular: Yabanıl tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A’nin aşırı (ektopik) ekspresyonu insan embriyonik böbrek hücre hattı olan 293T hücrelerinde sağlanmıştır. Mutant proteinimizin aşırı ekspresyonu TNF α -aracılı p38, JNK, ERK ve AKT enzimlerinin fosforilasyonunu azaltırken, NF- κ B ve kaspaz-8 aktivasyonlarını da belirgin şekilde arttırmıştır.

Sonuç: TNF- α -aracılı ERK, AKT, JNK, p38 aktivasyonları TNFR1 SH3 bölge modifikasyonlarından etkilenmektedir.

Anahtar Kelimeler: TNF- α , TNFR1, Grb2, ERK, AKT

ABSTRACT

Objective: TNF- α is a pleiotropic cytokine and shows its biological function by binding to its receptors TNFR1 and TNFR2. While TNFR1 induces apoptosis by activation of caspase-8 via the “death domain”, it also activates enzymes such as IKK α/β , MKK3/6, MKK4/7 by activation of TAK1. While activation of IKK α/β induces NF-kB, activations of MKK3/6 and MKK4/7 induces activations of p38 and JNK kinases, respectively it is not known how ERK1/2 and AKT activation are achieved in TNFR signalling pathway. Assuming that these two enzymes can act on Grb2-Ras or SRC-Ras pathways, we thought the binding sites of these adapters may be present on the TNFR1. A proline-rich PPAP region, “P₄₄₈PAP₄₅₁”, a binding site for proteins containing the SH3 domain very close to the C-terminus, was discovered in the translation map of the TNFR1. We wanted to determine whether this region has a role in the TNFR1 signal transduction mechanism, and whether the TNFR1 receptor in the presence of TNF- α initiates signal transduction over the SH3 domain.

Method: The codons of P₄₄₈ and P₄₅₁ located in the SH3 recognition site on TNFR1 were changed to that of Alanin, GCG, using site-directed mutagenesis and this plasmid was named as TNFR1-SH3-P/A. Next, we ectopically expressed the wild type TNFR1 and TNFR1-SH3-P/A in 293T cells and determined the effect of these expressions on, TNF- α -mediated phosphorylations of ERK, p38, JNK and AKT using western blotting; on NF-kB activation using “NF-Luc Reporter Assay”; on cell proliferation using MTT assay and on caspase activation using colorimetric “Caspase Activation Kit”.

Results: The ectopic expressions of wild type TNFR1 and TNFR1-SH3-P/A was achieved in 293T cells. While ectopic expression of our mutant diminished TNF α -mediated phosphorylations of p38, JNK, ERK and AKT, it increased NF-kB and Caspase-8 activations.

Conclusion: TNF- α -mediated ERK, AKT, JNK, p38 activations are affected by TNFR1 SH3 domain modifications.

Key words: TNF- α , TNFR1, Grb2, ERK, AKT

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α /TNF)	2
2.2. TNF Tarihçesi ve Geleceğe Bir Bakış	3
2.3. TNF'nin Karakteristik Özellikleri	7
2.4. TNFR1 Sinyal İletim Mekanizması	9
2.4.1. TNFR1 Sinyalleşmesinde NF-kB Aktivasyonu	10
2.4.2. TNFR1 Sinyalleşmesinde Apoptoz ve Nekroptoz	12
2.4.3. TNFR1 Sinyalleşmesinde AKT Aktivasyon Yolağı	14
2.4.4. TNFR1 Sinyalleşmesinde ERK/p38/JNK Aktivasyon Yolakları	16
2.5. SH3 Protein Bölgesi	17
2.6. TNFR1 ile Grb2 Adaptör Proteininin İnteraksiyonu	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Bölge Spesifik Mutasyon (Side-Directed Mutagenesis/SDM)	20
3.2. Plazmidlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi	20
3.3. Dpn-I Kesim Ürününün DH5 α Bakterilerine Transformasyonu	21
3.3.1. Kompetan Hücre Hazırlanması	21
3.3.2. Agar Plate Hazırlama	22
3.3.3. E.Coli DH5 α Kompetan Hücrelerine Plazmid Transformasyonu	22
3.4. Bakteriden Fenol-Kloroform-İzomil Alkol Yöntemiyle Plazmid İzolasyonu	23

3.4.1. Bakteriden Plazmid İzolasyonu	24
3.5. Agaroze Jel Elektroforezi	25
3.6. TNFR1 Geninin Mutasyon Yaratılan Bölgesinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	26
3.6.1. PCR Purifikasyonu	26
3.7. Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulama Reaksiyonu	27
3.7.1. Sekans Purifikasyonu	27
3.7.2. Sekans Ürünlerinin Cihaza Yüklenmesi	28
3.8. Hücre Kültürü	28
3.9. 293T Hücrelerine CaPO ₄ Yöntemiyle Yabancı Tip TNFR1 ve Mutant Plazmid Transfeksiyonu	28
3.10. 293T Hücrelerinin TNF ile Muamelesi	29
3.11. Hücre Lizatı Hazırlanması	29
3.12. Hücre Lizatlarının Protein Miktarının Belirlenmesi (Bradford Yöntemi)	30
3.13. Western Blot Yöntemi	30
3.13.1. SDS-Page Jel Elektroforezi	31
3.13.2. Jele Yüklenecek Örneklerin Hazırlanması	32
3.13.3. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	33
3.13.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi	33
3.13.5. Strip-Off İşlemi	34
3.14. NF- κ B Aktivasyonunun Etkisinin Belirlenmesi	34
3.15. MTT Proliferasyon Testi	34
3.16. Apoptoz İndüksiyonu	35
4. BULGULAR	36
4.1. TNFR1 Translasyon Haritasının İncelenmesi ve SH3 Bağlanma Bölgesinin Belirlenmesi	36
4.2. TNFR1 Proteini SH3 Bağlanma Bölgesinin Alanin Mutantının Oluşturulması	36
4.3. Yabancı Tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A Mutantının 293T Hücrelerinde Ekspresyonunun Gösterilmesi	38

4.4. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı p38 Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	39
4.5. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı JNK Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	40
4.6. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı AKT Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	42
4.7. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı ERK Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	43
4.8. TNFR1-SH3-P/A Mutantının NF Kappa-B Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	45
4.9. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi	46
4.10. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 Aktivasyonlarına Olan Etkisinin Belirlenmesi	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1	Anti-TNF ilaçlarının tedavi amacıyla kullanıldığı hastalıklar	6
------------------	---	----------



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Tümör Nekroz Faktörü ile yaşam ve ölüm dengesi	2
Şekil 2.2	TNF disregülasyonunun yansımaları	4
Şekil 2.3	TNF- α 'nın trimerizasyon ile aktivasyonu	8
Şekil 2.4.	PI3K/AKT Sinyal Yolağı	15
Şekil 4.1	TNFR1 proteininin translasyon haritasındaki C-terminal bölgesinin SH3 bağlanma bölgesi PPAP aminoasitlerinin kırmızı ile gösterimi	35
Şekil 4.2	TNFR1 proteini üzerinde gerçekleştirilen mutasyonun veri tabanı analizi ile doğrulanması	37
Şekil 4.3	TNFR1-SH3-P/A mutantının 293T Hücrelerinde Ekspresyonunun Gösterilmesi	38
Şekil 4.4	TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı p38 Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	39
Şekil 4.5	TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı JNK Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	40
Şekil 4.6	TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı AKT Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	42
Şekil 4.7	TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı ERK Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	43
Şekil 4.8	TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı NF-KappaB Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	45
Şekil 4.9	TNFR1-SH3-P/A Mutantının Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	46
Şekil 4.10	TNFR1-SH3-P/A Mutantının Kaspaz 3 Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	47
Şekil 4.11	TNFR1-SH3-P/A Mutantının Kaspaz 8 Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi	48
Şekil 5.1	Muhtemel TNFR1-aracılı ERK Sinyalizasyonu	51
Şekil 5.2	Muhtemel TNFR1-aracılı AKT Sinyalizasyonu	52

Şekil 5.3	Muhtemel TNFR1-aracılı JNK Sinyalizasyonu	53
Şekil 5.4	Muhtemel TNFR1-aracılı p38 Sinyalizasyonu	54
Şekil 5.5	TNF- α -aracılı nekroptoz indüksiyonuna TNFR1-SH3-P/A mutantının etkisi	55



SİMGELER ve KISALTMALAR

A-SMase	:	Acidic Sphingomyelinase
A	:	Alanin
AKT	:	Protein Kinase-B
C-terminal	:	Karboksi uç
CRD	:	Sisteince Zengin Bölge
cIAP	:	Cellular Inhibitor of Apoptosis
DD	:	Ölüm bölgesi (death domain)
ERK	:	Extracellular Regulated Kinase
FADD	:	FAS-Associated Death Domain protein
FAN	:	Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation
Grb2	:	Growth Receptor Bound Protein
JNK	:	c-Jun NH2-terminal Kinase
kDa	:	Kilodalton
LPS	:	Lipopolisakarid
LUBAC	:	Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex
MADD	:	MAPK-Activating Death Domain protein
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MLKL	:	Mixed Lineage Kinase Domain-Like
n-SMase	:	Nötral Sfingomiyelinaz
N-terminal	:	Amino uç
NEMO	:	NF-kB essential modölatör (IKK γ)
NIK	:	NF-kB inducing Kinase
PLAD	:	Pre-Ligand Assembly Domain
PI	:	Phosphatidylinositol
PI3K	:	Phosphatidylinositol-3 Kinase
RIP1	:	Receptor-Interacting Serine/Threonine Kinase-1
RIP3	:	Receptor-Interacting Serine/Threonine Kinase-3
SH2 bölgesi	:	Src Homoloji 2 Bölgesi
SH3 bölgesi	:	Src Homoloji 3 Bölgesi

SODD	:	Silencer of Death Domains
T	:	Threonin
TACE	:	TNF- α converting enzyme
TAK	:	Transforming Growth Factor Associated Kinase
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör-alfa
TNFR1	:	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1
TNFR2	:	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 2
TRADD	:	TNFR1-Associated Death Domain protein
TRAF	:	TNF Receptor Associated Factor
α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gamma
rpm	:	Dönüş sayısı/dakika
μl	:	Mikrolitre

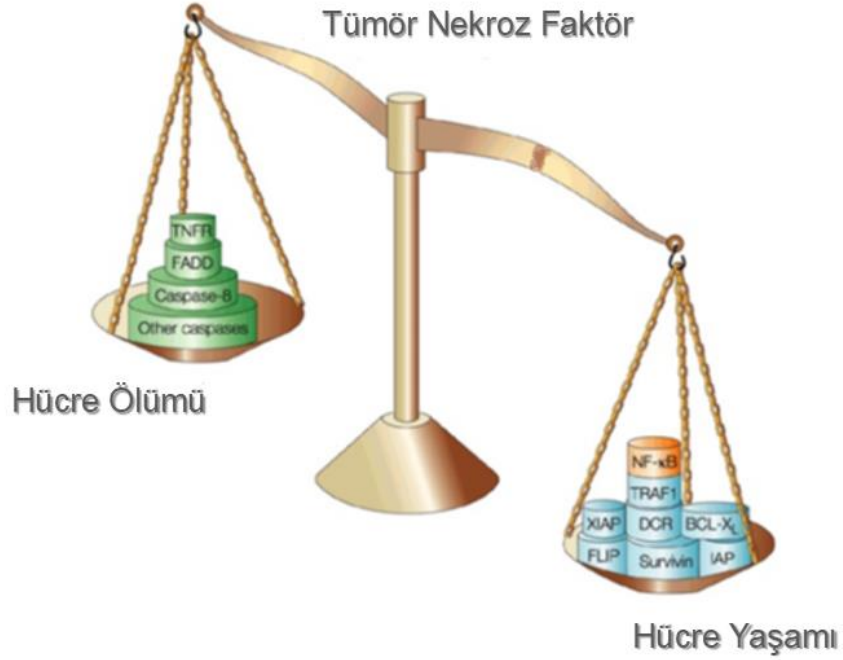
1. GİRİŞ

TNF- α , akut inflamasyon sırasında makrofajlar ve monositler tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokin olup, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, nekroptoz gibi biyolojik süreçlerde anahtar görevi üstlenir. TNF- α bir trimer olarak etkilerinin çoğunu 55 kDa büyüklüğündeki hücre membranı reseptörü TNFR1'e bağlanarak gösterir. TNF- α birçok işlevini, TNFR1 üzerinden, içerdiği ölüm bölgesi (death domain-DD) aracılığıyla gerçekleştirir. TNFR1 içerdiği ölüm domaini ile TNFR1-TRADD-FADD-kaspaz 8 kompleksini (kompleks-2) oluşturup kaspaz-8 aktivasyonu yaparak apoptozisi indüklerken aynı zamanda TNFR1-TRADD-RIP1 kompleksini (kompleks-1) oluşturup bu kompleks üzerinden TAK1 aktivasyonu yapar. Aktive olan TAK1, IKK α/β , MKK3/6 ve MKK4/7 fosforilasyonları ile bu enzimlerin aktivasyonunu sağlar. Aktive olan bu enzimlerden IKK α/β , NF- κ B indüksiyonu sağlarken, MKK3/6 aktivasyonu p38 yolağını, MKK4/7 aktivasyonu ise JNK kinazların aktivasyonunu sağlar. Bu yolakların yanı sıra, TNF- α , TNFR1 aracılığıyla AKT ve ERK aktivasyonuna yol açmaktadır fakat bu sinyal yolaklarını nasıl aktive ettiği henüz bilinmemektedir. Bu enzimlerin aktivasyonlarını Grb2-Ras veya SRC-Ras sinyal iletimi üzerinden yapabileceğini varsayarak, bu proteinlerin bağlanma bölgelerinin TNFR1 üzerinde olabileceğini düşündük. Bu noktadan yola çıkarak, TNFR1 translasyon haritasını incelediğimizde karboksi (COOH) terminal bölgesinde SH3 bağlanma bölgesi olan proline zengin 'P₄₄₈PAP₄₅₁' konsensüs dizisinin bulunduğunu farkettilik. SH3 bölgesi içeren proteinlerin bu bölgeye bağlanarak AKT ve MAPK aktivasyon yolakları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, P₄₄₈ ve P₄₅₁ kodonlarını bölge spesifik mutasyon ile Alanin kodonuna çevirerek bu bölgenin bozulmasını sağladık. Böylelikle TNFR1 proteininin post-translasyonel modifikasyonları ile sinyal iletimi üzerindeki etkilerini araştırmak ve SH3 bağlanma bölgesi üzerinden nasıl bir etki oluşturacağını gün yüzüne çıkarmak için çalışmalarımızı başlattık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α , TNF)

TNF- α , pleiotropik bir sitokindir yani farklı zaman dilimlerinde, farklı hücre tiplerinde, çok farklı etkiler oluşturabilmektedir. Hücreler arası iletişimi sağlayan bu protein, immün cevabın başrol oyuncularından biri, hatta belki de en önemlisidir. TNF- α ; işleyişini yüksek afiniteli ve dolayısıyla yüksek özgüllüğe sahip hücre reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. TNF'nin geniş ailesi 19 ligand ve 29 reseptörden oluşmuştur (Locksley, Killeen ve ark. 2001). Proliferatif ve apoptotik sinyaller; aynı hücrede, aynı anda TNF ailesinin süperüyeleri tarafından aktive edilir. Biyolojik sistemimizin ip üstünde yürüyen akrobatı olan TNF, hücrenin hayatta kalmasını, değişimlerini ve apoptozunu muazzam dengesi içinde düzenleyerek yaşamın karmaşık dansını en basit haliyle gözler önüne serer (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Tümör Nekrozis Faktör ile yaşam ve ölüm dengesi

(Aggarwal 2003) revize edilmiştir.

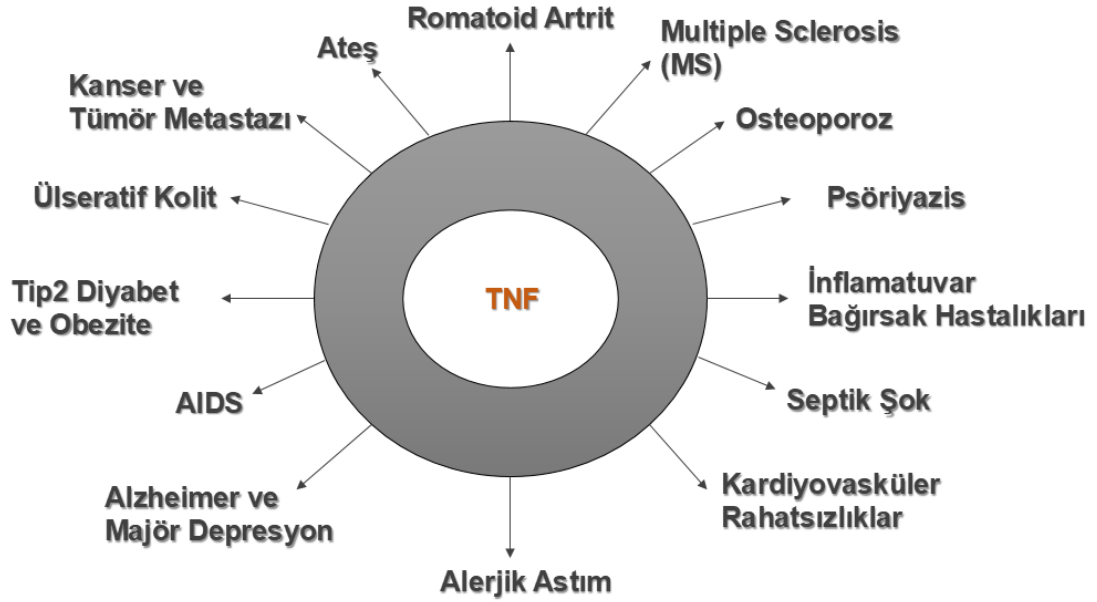
2.2. TNF Tarihçesi ve Geleceğe Bir Bakış

Bağışıklık sisteminin başrol oyuncularından tümör nekrozis faktörü keşfetmek için Fransa'ya 1800'lü yıllara döndüğümüzde, Dr.Bruns'un bakteriyel enfeksiyon geçiren hasta tümörlerinde gerileme veya nekroz gözlemleyerek kaydettiği sonuçlara ulaşırız (Bruns 1887). William tradd adlı onkolog New York Hastanesi'nin kayıtlarını incelerken Erizipel enfeksiyonu geçiren ve boynunda malign tümör bulunan bir hastanın, üzerinden yedi yıl geçmesine rağmen sağlıklı olduğunu keşfedince literatür araştırmalarına hız vererek tümörlerin bakteriyel enfeksiyon ile gerilediğine dair makaleler tespit etmiş ve 1891 yılında ilk hastasını *Streptococcus erysipelas* enjeksiyonu gerçekleştirerek malign bir tümör küçülmesini keşfetmiştir (Coley 1891). 1963 yılına kadar 'Coley toksini' adıyla bakteri ekstraktlarından oluşan karışım, tümöre karşı bağışıklık yanıtını arttırmak amacıyla kullanılmıştır (Coley 1910). 1940'lı yıllarda Shear ve ekibi tarafından tümör regresyonuna gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan lipopolisakkaritin (LPS) yol açtığı ve tümör regresyon mekanizmasının hemorajik nekroz olduğu kanıtlanmıştır (Shear, Turner ve ark. 1943) .

TNF'in büyüleyici tarihi bir yüzyıl kadar öncesine uzansa da TNF ilk olarak 1962 yılında *Serratia marcescens* ile tedavi edilen farelerin serumunda indüklenen tümörün (sarkom 37) geriletilmesi için kullanılmıştır (O'Malley, Achinstein ve ark. 1962). 1975 yılında Carswell ve arkadaşları tarafından *in vitro* ortamda tümör hücrelerinin ölümüne sebep olduğunun gösterilmesiyle bu molekül, tümör nekrozis faktör (TNF) olarak literatürde adını almıştır (Carswell, Old ve ark. 1975). 1984-85 yılları arasında TNF- α ve LT- α (Lenfotoksin/TNF- β) adıyla iki farklı TNF tanımlanmış ve klonlanmış bu iki ligandın aynı reseptöre bağlandığı gösterilmiştir (Aggarwal, Moffat ve ark. 1984, Aggarwal, Kohr ve ark. 1985).

1990 yılında yapılan bir çalışmada, TNF'in 55 kDa ve 75 kDa ağırlığında iki farklı reseptöre bağlandığı gösterilmiş ve tümör nekrozünü sağlayan molekülün 55-60 kDa ağırlığındaki TNFR1 reseptörü olduğu ortaya konmuştur (Brockhaus, Schoenfeld ve ark. 1990, Thoma, Grell ve ark. 1990). TNF reseptörlerinin keşfi, bu reseptörler üzerine yapılan çalışmaları hızlandırmış ve TNFR1'in 12p13, TNFR2'nin ise 1p36'da konumlandığı gösterilmiştir (Baker, Chen ve ark. 1991).

TNF endojen bir pirojen olarak yangın alarm sistemi olarak kabul edilebilir ve ateş, kaşeksi, apoptotik hücre ölümü, enflamasyon indüksiyonunu sağlarken, tümör oluşumu ve viral replikasyon inhibisyonu da yapabilmektedir. TNF disregülasyonu; romatoid artrit (Yamanaka 2015), multiple sclerosis (Carswell, Old et al.), inflamatuvar bağırsak rahatsızlığı (Kollias, Douni ve ark. 1999), Alzheimer hastalığı (Decourt, Lahiri ve ark. 2017), Chron hastalığı (Van Deventer 1997), kardiyovasküler rahatsızlıklar (Ferrari 1999), kanser (Wajant 2009), majör depresyon (Fasick, Spengler ve ark. 2015), Tip 2 diyabet ve obezite (Hotamisligil 1999) gibi sistemik birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. TNF disregülasyonunun yansımaları

TNF, herhangi bir yaralanma veya stresten sonra, dakikalar içinde kanda görülen ilk sitokindir. IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin TNF salınımıyla aktive olduğu bilinmektedir (Fong, Tracey ve ark. 1989). İnflamasyon sürecinin bu derece merkezinde yer alması, TNF blokajının bir tedavi yöntemi olarak kullanılmasına yol açmıştır.

TNF- α ile yapılan insan ve hayvan çalışmaları, anti-TNF ajanlarının teröpatik yaklaşımları ile sonuçlanmış ve başta romatoid artrit olmak üzere Chron hastalığı, ülseratif kolit, sedef hastalığı gibi birçok immün aracılı inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaya

başlanmıştır. Bu teröpatiklerden en önemlileri; hem çözünebilir hem de membran bağlı TNF- α 'ya bağlanarak reseptör-ligand bağlantısını bozan ve TNF- α üreten hücrelerin de parçalanmasına sebebiyet veren İnfliximab (Present, Rutgeerts ve ark. 1999), TNF- α ve TNF-beta'nın reseptör-ligand ilişkisini inhibe edebilen ve TNF inaktivasyonu sağlayabilen Etanercept (Moreland 1999) ve Humira adıyla bilinen TNF- α 'ya bağlanarak p55 ve p75 reseptör bağlantısını inhibe eden ve ayrıca TNF- α eksprese eden hücrelerin lizisini sağlayan Adalimumab (Scheinfeld 2003) olarak örneklendirilebilir. Bu teröpatiklerin kullanım alanları **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir.

İnfliximab gibi anti-TNF ajanlarının romatoid artrit hastalarında; IL-1, GM-CSF, IL-6, IL-8 gibi birçok proinflamatuvar sitokinlerin regülasyonunun düşürülmesinde (Feldmann, Brennan ve ark. 1996), VEGF gibi anjiyogenez faktörlerinde azalmasını (Ballara, Taylor ve ark. 2001), kemokin seviyelerinde ve lökosit trafiğinde azalmasını (Taylor, Peters ve ark. 2000), eklem tahribatının azalmasını (Brennan, Chantry ve ark. 1989), hematolojik normalizasyonu (Elliott, Maini ve ark. 1994) ve kardiyovasküler riskin azalmasını (Jacobsson, Turesson ve ark. 2005) sağladığı gösterilmiştir.

Anti-TNF tedavisi sadece romatoid artrit hastaları için değil aynı zamanda Chron hastalığı, ülseratif kolit, sedef hastalığı, ankilozan spondilit gibi birçok kronik inflamatuvar hastalığa sahip hastalar için de büyük bir umut ışığı olmuştur. Yaklaşık olarak yıllık 50 milyar dolarlık ilaç satışları ile ilaç şirketlerinin yüzünü güldürse de bu ilaçların bazı yan etkileri bulunmaktadır. TNF inhibitörleri tarafından provoke edilen immünolojik değişimlerin bir sonucu olarak bakteriyel, viral ve mantar enfeksiyonları ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında pnömoni, sepsis, tüberküloz, histoplazmoz ve koksidiyoidomikoz gösterilmiştir (Inanc and Direskeneli 2006, Rogan and Thomas 2007, Estrada, Garcia-Campos ve ark. 2009). TNF inhibitörlerinin immün sistemin baskılanmasından dolayı kanser riskini arttırdığına dair de araştırmalar bulunmaktadır. 147 hastanın katıldığı bir araştırmada İnfliximab kullanımı sonrasında %6 oranında malignite gelişmiş olduğu gösterilmiştir (de Vries, van Oijen ve ark. 2008). Anti-TNF'lerin neden olduğu sistemik değişiklikler; T hücrelerinin ve makrofajların otoreaktivitesinde dengesizliğe yol açarak, CNS ve periferel sinirlere saldıran otoimmün nöropatileri indükleyebilmektedir (Weimer and Sachdev 2009). TNF inhibitörlerinin en önemli yan etkilerinden biri de özellikle İnfliximab ve Adalimumab ile tedavi sırasında

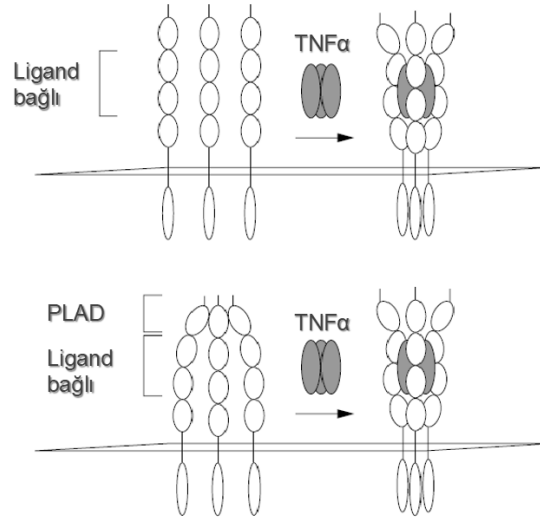
antinükleer antikorlar, anti-DNA çift sarmal, antikardiyolipinler gibi otoantikorların oluşmasıdır (Gonnet-Gracia, Barnetche ve ark. 2008). Her ilacın yan etkisi olabileceği göz önüne alınarak tedavilerde, insan immün sisteminin izleyeceği yol ayrıntılı olarak düşünülerek kişiye özel tedavi sistemi ön plana konulmalıdır. Bu sebeple, TNF- α 'nın ana reseptörü olarak sayabileceğimiz TNFR1'in moleküler mekanizmasını aydınlatmak önemlidir.

Tablo 2.1. Anti-TNF ilaçlarının tedavi amacıyla kullanıldığı hastalıklar

Anti-TNF Teröpatik ilaçları	Etki Gösterdiği Hastalıklar	Referanslar
İnfliximab	Chron Hastalığı	(Santos, Malaguti ve ark. 2017)
	Ülseratif Kolit	(Rutgeerts, Sandborn ve ark. 2005)
	Romatoid Artrit	(Blair and Deeks 2016)
	Ankilozan Spondilit	(Escudero-Vilaplana, Ramirez-Herraiz ve ark. 2015)
	Psöriatik Artrit ve Psöriyazis	(Papoutsaki and Costanzo 2013)
Etanercept	Tüm artrit tipleri (Romatoid, psoriatik, idiyopatik, juvenil)	(Cantini, Niccoli ve ark. 2017, Horneff, Schulz ve ark. 2017)
	Psöriyazis	(Feldman, Foster ve ark. 2017)
	Graft Versus Host Hastalığı	(De Jong, Saes ve ark. 2017)
	Hidradenitis Supuritiva	(Lee and Eisen 2015)
Adalimumab	Chron Hastalığı	(Nutti, Fiorino ve ark. 2015)
	Ülseratif Kolit	(Taxonera, Iglesias ve ark. 2017)
	Hidradenitis Supuritiva	(Lee and Eisen 2015)
	Tüm artrit tipleri (Romatoid, psoriatik, idiyopatik, juvenil)	(Mease, Hall ve ark. 2017, Ramanan, Dick ve ark. 2017, Taylor, Keystone ve ark. 2017)
	Psöriyazis	(Wu and Valdecantos 2017)
	Ankilozan Spondilit	(Escudero-Vilaplana, Ramirez-Herraiz et al. 2015)
Golimumab	Romatoid Artrit	(Tanaka, Senoo ve ark. 2016)
	Psöriatik Artrit	(Manara, Caporali ve ark. 2017)
	Ankilozan Spondilit	(Manara, Caporali et al. 2017)
	Ülseratif Kolit	(Flamant, Paul ve ark. 2017)

2.3. TNF'nin Karakteristik Özellikleri

TNF; tümör ölümü ile alakalı aynı zamanda doğal bağışıklık, hücre regülasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz süreçlerinde rol oynayan polipeptit yapıda inflamatuvar bir sitokindir. TNF- α geni insanda 6. Kromozom üzerinde lokalizedir (6p21.3); 3 kilobaz uzunluğundadır ve 4 ekzon içerir. İnsan TNF- α proteini 26 kDa moleküler ağırlığında, 233 aminoasit içerir ve membranöz TNF (mTNF) tip 2 transmembran proteini olarak sentezlenir (Kriegler, Perez ve ark. 1988).. Sinyal peptidi içermeyen TNF- α ; ADAM ailesinin bir üyesi olan TNF- α -converting enzyme (Wagner, Stacey ve ark.) (Wagner, Stacey et al.) (Wagner, Stacey et al.) tarafından, amino ucundaki (N-terminal) 76 aminoasitin enzimatik uzaklaştırmasına tabi tutularak, hücre yüzeyinden biyoaktif bir trimer olarak kana salınır ve 17 kDa'luk çözülebilir formu (sTNF) oluşur (Black, Rauch ve ark. 1997, Itai, Tanaka ve ark. 2001). ADAM ailesi disintegrin ve metalloproteinaz içerir ki membran bağlı proteazların genel adı olarak geçer. Hem mTNF hem de sTNF dediğimiz formlar trimer olan reseptörlerine bağlanarak trimerizasyon ile aktivasyon gösterirler (Smith and Baglioni 1987) (**Şekil 2.3**). TNF- α ; aktive edilmiş monositlerden, makrofajlardan, mikrogliyalardan, doğal öldürücü hücrelerden (NK), T hücrelerinden ve aynı zamanda immün özellik göstermeyen endotellerden ve fibroblastlardan eksprese edilir (Tsai, Jain ve ark. 1996, Falvo, Tsytsykova ve ark. 2010)



Şekil 2.3. TNF- α 'nın trimerizasyon ile aktivasyonu

(Chan 2000)'den uyarlanmıştır.

TNF- α 'nın membran bağı ve çözünür formları, reseptör seçiminde farklılık göstermektedir. mTNF- α tercihi olarak TNFR2'ye bağlanırken, sTNF- α TNFR1 ile aktivasyon sağlar (Grell 1995, Grell, Wajant ve ark. 1998). TNFR1 her hücrede eksprese olurken; TNFR2 özellikle CD4/8+ T hücrelerinde, timositlerde, endotel hücrelerinde, mikrogliyalarda, embriyonik mezenkimal hücrelerde ekspresyon gösterir (Ware, Crowe ve ark. 1991, Grell, Becke ve ark. 1998, Irwin, Mak ve ark. 1999, Arnett, Mason ve ark. 2001, Dopp, Sarafian ve ark. 2002, Yang, Lindholm ve ark. 2002, McCoy and Tansey 2008) Her iki reseptörün ekstraselüler bölgeleri benzerdir, CRD denilen sistince zengin tekrarlılardan oluşur ve ligand-öncesi bağlanma bölgeleri (pre-ligand assembly domain, PLAD) ihtiva ederler. PLAD, reseptörlerin ligand bağlantısı olmaksızın da trimerik şekilde durabilmesine, böylece trimer halindeki ligand geldiğinde sinyal iletiminin hızlı bir şekilde başlatılmasına aracılık eder (Chan, Chun ve ark. 2000). İki reseptör arasındaki esas fark, intraselüler bölgelerinden kaynaklanır. TNFR1 sitoplazmik kısmında “ölüm bölgesi” denilen 80 aminoasit uzunluğunda bir “death domain-DD” bulunurken TNFR2'de DD bulunmaz (Tartaglia, Ayres ve ark. 1993). TNFR1 sitoplazmik bölgesi aracılığıyla nötral sfingomiyelinaz aktivasyonu (Adam, Wiegmann ve ark. 1996), apoptozis indüksiyonu (Micheau and Tschopp 2003), nekroptozis indüksiyonu (He, Wang ve ark. 2009) sağlayabildiği gibi NF- κ B aktivasyonu (Duh, Maury ve ark. 1989), mitojenle aktive edilmiş protein kinazların (MAPK) aktivasyonunu (Sabio and Davis 2014) ve JAK/STAT yolağının aktivasyonunu (Miscia, Marchisio ve ark. 2002) gerçekleştirdiği gösterilmiştir. TNFR2'nin sitoplazmik kuyrukları DD içermemekle birlikte bunun yerine, TRAF (TNF-receptor associated factor) ile ilişkilendirilmesine izin veren dizilere sahiptir. Bugüne kadar altı TRAF proteini (TRAF1-TRAF6) tanımlanmış olmasına rağmen, sadece beş tanesi (TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 ve TRAF6) TNFR2'nin sitoplazmik kuyruklarına bağlanmaktadır (Sato, Irie ve ark. 1995). Hücre sağkalımının indüksiyonu sırasında MAP3K (Mitojenle-aktive edilmiş protein-3 kinaz) aile üyeleri, JNK'yi (c-Jun N-terminal kinaz) aktive eden TRAF2 ile birleşerek NIK (Nuclear Factor-kappaB Inducing Kinase) hayatta kalmaya yol açan TNFR2 kaynaklı NF-KappaB (Nükleer Faktör-KappaB) aktivasyonuna aracılık etmede TRAF2'nin aşağı akış hedefi olarak görev yapmaktadır (Cabal-Hierro, Rodriguez ve ark. 2014). TNFR2'nin genel olarak hücre

sağkalımında rol oynadığı gösterilmiş ve bu nedenle TNF- α 'nın fizyolojik fonksiyonlarının çoğu TNFR1 sorumluluğuna bırakılmıştır.

2.4. TNFR1 Sinyal İletim Mekanizması

Bir membran reseptörü olan TNFR1, *TNFRSF1A* geni tarafından kodlanan, 12p13'te konumlanmış, bir DD ve dört adet sistein tekrarı içeren, her hücrede eksprese olan bir proteindir (Fuchs, Strehl ve ark. 1992).

Keşfedildiği yıllarda ölüm bölgesi içermesi sebebiyle ilk hedefinin apoptoz olduğu düşünülen TNFR1 proteininin TNF- α -aracılı gen ekspresyonu NF-kB indüksiyonuna dayanmaktadır (Tartaglia, Ayres et al. 1993, Viemann, Goebeler ve ark. 2004). Membran bağlı halde hücre proliferasyonunu sağladıktan sonra hücre içine alınmasıyla birlikte apoptoz indüksiyonunu gerçekleştirir (Micheau and Tschopp 2003). Aynı zamanda NF-kB aktivasyonu TNFR1-aracılı apoptozu sınırlandırmaktadır (Liu, Hsu ve ark. 1996). NF-kB aktive edilmediği durumlarda hücre apoptoza yönelir.

TNFR1, ligandı TNF- α ile bağlanmasını takiben, TNFR1 ilişkili ölüm bölgesi proteini (TRADD) üzerindeki ölüm bölgesi ile TNFR1'in ölüm bölgesine bağlanır ve bu iki proteinin bağlanması ile iki zıt mekanizmanın kapıları açılır: Hücrenin hayatta kalması ve hücrenin ölümü (Tummers and Green 2017). TNFR1 ile TRADD arasındaki etkileşim; RIP1-TRADD kompleksinin TNFR1'den ayrılıp ölüm bölgesi interaksyonu ile FADD (Fas-associated death domain) bağlayarak ardından FADD üzerinden prokaspaz 8 ile ölüm yolağını başlatan apoptoz yolağına yönlendirirken (Boldin, Goncharov ve ark. 1996), RIP1 (Receptor-interacting protein) ve TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) ile oluşturdukları kompleks proliferatif yolların yolunu açar (Hsu ve ark 1996).

TNFR1 proteinine TNF- α ligandı bağlanmadığı zamanlarda ölüm susturucusu denilen SODD (Silencer of Death Domains) proteini bağlanır ve TNFR1'in kendi üzerinde yığılma olmasını önler. Aynı zamanda hücre içi sinyalleşmesini de durdurarak sinyal iletimine engel olur. SODD proteini, ligand bağlanmasının ardından TNFR1'den ayrılır (Miki and Eddy 2002). Hücre içi sinyal iletimini engelleyen proteinlerden biri de ARTS-1 (Aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding) proteindir. Bu protein, TNFR1'in

salınımını arttırarak membran ilişkili TNFR1'in azalmasına böylece TNF- α sinyalleşmesine engel olur (Cui, Hawari ve ark. 2002).

2.4.1. TNFR1 Sinyalleşmesinde NF-kB Aktivasyonu

NF-kB; proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri gibi doğuştan gelen immün cevapların yanısıra majör histokompatibilite kompleksi gibi spesifik immün yanıt oluşturan proteinlerin ve lenfosit proliferasyonu ile farklılaşmasını kontrol eden IL-2, interferon- γ gibi sitokinlerin bağışıklık tepkisini düzenler ve geniş yelpazedeki biyolojik süreçlerin transkripsiyon faktörüdür (Li and Verma 2002). NF-kB; apoptozu inhibe eden, hücre sağkalımı ve proliferasyonunu destekleyen proteinlerin ekspresyonunu düzenler (Karin and Lin 2002). Bir çok hücre tipinde eksprese edilen TNFR1 esas olarak, NF-kB ve AP-1 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar ve TNF- α -aracılı gen indüksiyonundan NF-kB yolağının sorumlu olduğu düşünülmektedir (Liu, Sidiropoulos ve ark. 2000, Fotin-Mleczek, Henkler ve ark. 2002).

Membrana bağlı TNFR1'in TNF- α ile bağlanması sonucu saniyeler içerisinde protein kompleksi (kompleks I) meydana gelir ve kanonikal NF-kB aktivasyonu yoluyla proinflamatuvar bir cevap oluşur (Shih, Tsui ve ark. 2011). TRADD aracılığıyla RIP1 ve TRAF2 bir kompleks oluştururlar (Hsu, Huang ve ark. 1996, Hsu, Shu ve ark. 1996). TRAF2 proteini; cIAP1 ve cIAP2 (Cellular inhibitor of apoptosis protein 1/2)'yi bu komplekse getirerek RIP1'i poliübikütinasyona uğratıp, RIP1'in TAK1 (Transforming growth factor-activated kinase 1) bağlayabilmesini sağlar (Bertrand, Milutinovic ve ark. 2008, Mahoney, Cheung ve ark. 2008). Bu oluşum gerçekleşmez ise RIP1, TAK1 yerine kaspaz-8'e bağlanarak apoptoz yolağını indükler (Bertrand, Milutinovic et al. 2008). Aynı zamanda cIAP1/2 kendi kendini übiküitleyerek LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) bağlanmasına aracılık eder. Adım adım kurulan bu übiküitel formasyonlar TNFR1-aracılı kompleks I'e NEMO (NF-Kappa-B essential modulator) proteinin de bağlanmasıyla kararlılık kazanır (Varfolomeev, Goncharov ve ark. 2008, Tokunaga, Sakata ve ark. 2009). Bu kompleks TAK1 aktivasyonu ile IKK α/β fosforilasyonuna dolayısıyla IKK (Inhibitor of NF-kB kinase) kompleksinin aktivasyonuna yol açar ve kanonikal NF-kB aktivasyonu sağlanır (Jackson-Bernitsas, Ichikawa ve ark. 2007). RIP1'deki K63/M1-bağlı poliübikütün zincirlerinin TAB2/3-TAK1 arasında yakınlık

sağladığını gösteren çalışma ile NEMO-IKK α -IKK β komplekslerinin oluşumunu ve IKK α ve IKK β 'nin TAK1 aktivasyonunu kolaylaştırır (Emmerich, Ordureau ve ark. 2013).

TNFR1 ile TNF ligandının trimerizasyonu sonucu oluşan kompleks I; TRADD, TRAF2, cIAP1/2, LUBAC, RIP1, TAB2/3-TAK1 ve NEMO-IKK α / β proteinlerini içerir. TRAF2-cIAP1/2 ile LUBAC formunun RIP1 proteinini übikitilasyonu sonucu TAB2/3-TAK1 ve NEMO-IKK α / β protein oluşumlarının komplekse katılmasıyla NF-kB aktivasyonu oluşur. RIP1; TNFR1-aracılı NF-kB aktivasyonunda anahtar rolü oynar (Ting, Pimentel-Muinos ve ark. 1996).

Klasik NF-kB aktivasyon yolağı TRAF2 veya cIAP1/2 olmadığı durumlarda, alternatif bir NF-kB sinyal yolağına döner (Zarnegar, Yamazaki ve ark. 2008). Alternatif (veya non-kanonik) NF-kB yolunda, NF-kB2 p100/RelB kompleksleri sitoplazmada aktif değildir. LTR, CD40 ve BR3 dahil olmak üzere bir reseptör alt kümesi aracılığıyla sinyalleşme, NF-kB2 p100'deki C-terminal kalıntıları fosforile eden IKK α komplekslerini aktive eden kinaz NIK (NFkB inducing kinase)'in aktivasyonunu sağlar. NF-kB2 p100'ün fosforilasyonu, NF-kB2 p52'nin übikitinasyon ve proteazomal işlenmesine yol açar. Bu modifikasyonlar, p52'nin nükleusa gidip hedef gen aktivasyonunu gerçekleştirecek NF-kB p52/RelB kompleksini oluşturabilmesini, dolayısıyla hedef genlerin transkripsiyonunun başlatılabilmesini sağlar (Sun 2011). RIP1'in yokluğunda, TNFR1 stimülasyonu, NIK stabilizasyonuna, IKK α fosforilasyonuna ve TRAF2 degradasyonu ile birlikte, kanonik olmayan NF-kB yolunun aktivasyonuna yol açar (Kim, Morgan ve ark. 2011). NIK aktivasyonunun yanında TNFR1 aracılığıyla aktive olan Akt, IKK α 'yı T23'den fosforile ederek aktivasyonuna dolayısıyla NF-kB indüksiyonuna sebebiyet verir (Ozes, Mayo ve ark. 1999).

2.4.2. TNFR1 Sinyalleşmesinde Apoptoz ve Nekroptoz

Grekçe yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz kelimesi ilk kez 1972'de yayınlanan bir makalede morfolojik olarak farklı bir ölüm şeklini anlatmak için kullanılmıştır (Kerr, Wyllie ve ark. 1972). Apoptoz, sistematik ve kademeli olarak ilerleyen programlanmış hücre ölüm biçimidir.

NF-kB aktivasyon yolağı olan Kompleks I (bkz. 2.4.1) kurulamadığı zamanlarda TNFR1, kompleks-IIa ve kompleks-IIb aracılığıyla apoptoz indüksiyonunu başlatır (Wang, Du ve ark. 2008).

TNFR1 ligand bağlanmasıyla indüklenen apoptoz; TRADD ve RIP1 kompleksinin adaptör protein FADD ve kaspaz-8 interaksyonu ile ilerleyen bir mekanizmadır (Hsu, Shu et al. 1996). TNFR1'in TNF- α trimerizasyonu ile TRADD, FADD, kaspaz-8 ve cFLIP (Cellular FLICE-inhibitory protein) içeren sitozolik bir kompleks oluşur. Eğer NF-kB bloke edilirse, cFLIP ekspresyon seviyesi azalır ve kaspaz-8, apoptozu başlatmak için oto-katalizme uğrar (Irmeler, Thome ve ark. 1997). Bu ölüm-sinyal kompleksine Kompleks IIa adı verilir ve RIP1 bu kompleks içinde fiziksel olarak düşük miktarlarda bulunabilirken, kaspaz-8 ve apoptozun aktivasyonu için gerekli değildir. Eğer NF-kB'ye ek olarak, kaspaz-8 de bloke edilirse, Kompleks IIa nekroptozu indükleyebilir ve bu durumda RIP1 RIP3'ü aktive etmek için gereklidir (Wegner, Saleh ve ark. 2017).

TNFR1 inhibitörü olarak çalışan, ölüm bölgesi susturucusu SODD proteininin serbest bırakılması ile ligand bağlanması ile trimerik bir yapı kazanan reseptör; TRADD, FADD ve RIP1 proteinlerinin bağlanmasıyla DISC (Death signaling inducing signaling complex) kompleksinin oluşumu ile sonuçlanır (Hsu, Shu et al. 1996). Bu kompleks apoptotik yolakları açan kaspazlar için bir iskele görevi görmektedir. DISC kompleksinin oluşumu yoluyla güçlü ve hızlı proapoptotik bir sinyal sağlanır (Scaffidi, Schmitz ve ark. 1999). Aynı zamanda FADD, DED (Death effector domain) aracılığıyla prokaspaz 8'in aktivasyonunu sağlar. Ardından sitoplazmik kaspaz-8 apoptotik sürecin yürütülmesine katılan kaspaz-3-6-7'yi aktive ederek prokaspazların kendilerini aktif kaspazlara dönüştürür (Ho and Hawkins 2005). Özellikle kaspaz 3 aktivasyonu; genomik DNA'yı bozan apoptotik bir DNAaz hedeflediği için TNF- α aracılı apoptoz indüksiyonu için önemli bir yere sahiptir (Enari, Sakahira ve ark. 1998). Kaspaz-8 enzim aktivasyonu negatif inhibitör protein cFLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β converting enzyme)-inhibitory protein) ile düzenlenir. cFLIP proteini DED içerir ve aktif kaspaz 8 fragmanlarının kompleksten salınmasını inhibe eder (Irmeler, Thome et al. 1997) ve böylelikle hücrede apoptoz indüksiyonu bloke olur.

TNFR1 üzerinden ilerleyen apoptoz indüksiyonunu düzenleyicilerinden biri de IAP (Inhibitor of Apoptosis protein) molekülleridir. IAP ile TRAF2 etkileşimi doğrudan gerçekleşir ve kaspaz bağımlı hücre ölümünü indükler (Wang, Mayo et al. 1998, Vince, Pantaki ve ark. 2009).

TNFR1'in TNF trimerizasyonu ile gerçekleşen hücre ölümünün çoğunlukla kanser hücreleri ve virüsle enfekte olmuş hücrelerde, biyokimyasal olarak dengesiz hücrelerde ölüm yolunu açan bir şövalye olduğu unutulmamalıdır (Munker and Koeffler 1987, Wong, Tartaglia ve ark. 1992).

Hücre bileşenlerinin enfeksiyon, travma, hipoksi veya toksik bir etki altında kalması sonucunda plazma membranının parçalanarak hücre içi materyallerin dağılıp düzensiz sindirimiyle meydana gelen duruma nekroz adı verilir (Adigun and Bhimji 2018). Önceki inanışların aksine nekroz sadece patolojik bir süreç değil, aynı zamanda apoptoz gibi programlanmış bir hücre ölümü mekanizmasına sahiptir ve apoptotik aktiviteye sahip hücrelerde ölüm yolları üzerindeki düzenleyici etkileri kanıtlanmıştır (Gizycka and Chorostowska-Wynimko 2015).

Nekroptoz adını alan inflamatuvar hücre ölüm mekanizmasının nekrozdan farkı, nekroptoz sırasında hücre membranının permeabilizasyonu kontrol altında tutulur ve apoptozdan farklı olarak da kaspaz aktivasyonunun olmadığı durumlarda gerçekleşir (Vandenabeele, Galluzzi ve ark. 2010).

TNF- α 'nın TNFR1 ile trimerizasyonu sonucu ölüm alanına bağlanan TRADD ile TRAF2 RIP1'i yanlarına alarak kompleks I oluşturduklarında ve kompleks IIa oluşmadığı zamanlara -kaspaz 8 yokluğunda- RIP3 proteininin katılımıyla ripoptozom adını alan bu kompleks nekroptoz indüksiyonunu başlatır (Zhang, Shao ve ark. 2009). RIP3 ve RIP1 proteinleri birbirlerine bağlanarak mikrofilamen bir yapı oluşturup, otofosforilasyon ve transfosforilasyon gerçekleştirirler ve bu şekilde nekroptoz indüksiyonunun devam etmesi sağlanır (Vanden Berghe, Linkermann ve ark. 2014). Ardından fosforilasyon yoluyla pro-nekroptotik protein olan MLKL aktive edilerek hücre içeriğinin hücre dışı boşluğa atılmasını sağlayan nekrotik mekanizmayı gerçekleştirir (Vanden Berghe, Linkermann et al. 2014).

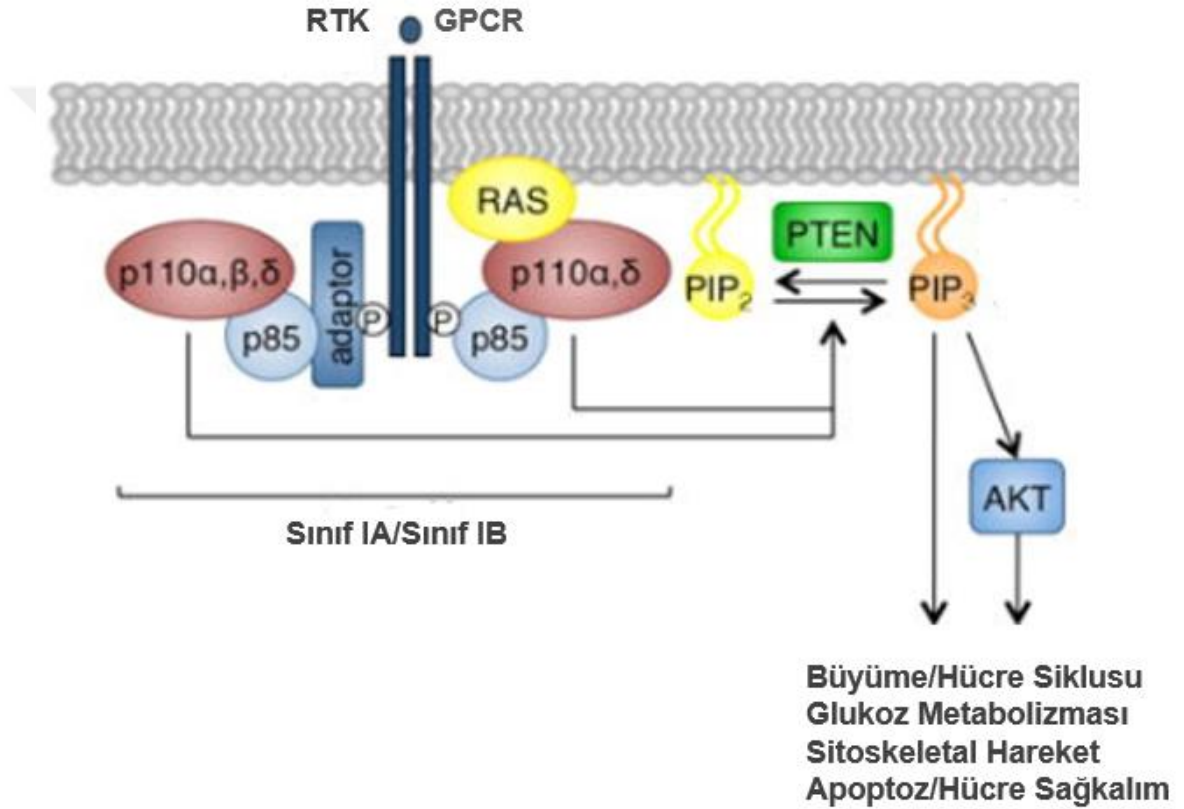
2.4.3. TNFR1 Sinyalleşmesinde PI3K/AKT Aktivasyon Yolağı

Fosfatidilinozitol-3 kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/AKT) sinyal yolağı; hücre dışı sinyallere yanıt olarak metabolizmayı, proliferasyonu, hücre sağkalımını, büyümesini düzenleyen hücre içi sinyal transdüksiyon yolağıdır (Engelman, Luo ve ark. 2006).

PI3K mekanizması temelinde 3 sınıfa bölünebilen bir ailedir (Jean and Kiger 2014). Sınıf I PI3K'ler adaptör seçilimine bağlı olarak sınıf IA ve sınıf IB olmak üzere ikiye ayrılır. Sınıf IA PI3K'ler ve sınıf IB PI3K'ler, sırasıyla reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve G-proteini kenetli reseptörler (GPCR) tarafından aktive edilir. Aktivasyonu gerçekleştiren PI3K'ler substratı fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat (PIP2) bağlanarak fosfatidilinozitol 3,4,5 trisfosfat (PIP3) oluşumunu sağlar (Thorpe, Yuzugullu ve ark. 2015). PIP3 ve PIP2 zar içerisinde birikerek lipid bağlayıcı protein kinaz olan AKT için kenetlenme bölgeleri oluşturur ve AKT aktivasyonu sağlanır (**Şekil 2.4**). AKT; apoptoz inhibisyonu ve hücre sağkalım mekanizmaları ile ilişkili serin/threonin kinazdır. Proteinin N-terminal ucu 100 aminoasitlik plekstrin homoloji (PH) bölgesi içerir ki proteinin membrana yakın yerleşimini sağlar. PIP3 ve PIP2 lipidlerine PH alanıyla bağlanan Akt, bu plazma membranı lokalizasyonu ve Thr308 ve Ser473'teki fosforilasyonu ile tamamen aktive olur (Tsuchiya, Kanno ve ark.).

Büyüme faktörlerinin bağlanmasıyla gerçekleşen anti-apoptotik cevapların çoğunda PI3K'lere bir p110 katalitik alt ünite ve bir p85 regülatör alt birim eşlik eder (Engelman, Luo et al. 2006). PI3K'ler; p85'lerdeki SH2 bağlanma bölgelerinin (fosfotirozin-tanım motifli) RTK'leri ile ve bunların substratları veya adaptörlerindeki 'YxxM' motiflerinin fosfo-tirozinlerine bağlanmasıyla aktive edilirler (Hartley, Meisner ve ark. 1995). PI3K'ler; SH2 bağlanma bölgesi ile 'YxxM' motifli üzerindeki fosfo-tirozinlere ya da SH3 bağlanma bölgesi ile hedef proteinlerdeki proline zengin motiflere bağlanarak protein-protein etkileşimlerine aracılık eder (Wagner, Stacey et al. , Batra-Safferling, Granzin ve ark. 2010). TNFR1'de 'YxxM' motifli olmamakla birlikte TNFR1'e bağlandığı gösterilmiştir (Madge and Pober 2000) (Hapil, 2017, Ref No:455120). Dolayısıyla PI3K ya TNFR1 üzerindeki diğer proteinlere, ya da SH3 bağlanma bölgesi ile TNFR1'e bağlanıyor olabilir. HEK293 hücrelerinde TNF- α -aracılı c-Src proteininin PI3K ile etkileşime girerek Akt aktivasyonu sağladığı bilinmektedir (Pincheira, Castro ve ark. 2008).

Akt sinyalleşme yolağı, B ve T hücresi reseptörleri, sitokin reseptörleri, G-proteini kenetli reseptörler, reseptör tirozin kinazlar ve PIP3 üretimini indükleyen diğer uyarıcılar tarafından aktive edilir (Fruman and Bismuth 2009, Jellusova and Rickert 2016). AKT geniş yelpazadaki tümörlerde ve hematolojik malignitelerde saldırganlığın ana bileşenlerinden biri olarak kabul edilir ve kanser terapilerinde potansiyel bir hedeftir (Mitsiades, Mitsiades ve ark. 2004).



Şekil.2.4. PI3K/AKT Sinyal Yolağı

(Thorpe, Yuzugullu et al. 2015)'den revize edilmiştir.

2.4.4. TNFR1 Sinyalleşmesinde ERK/p38/JNK Aktivasyon Yolakları

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ailesi, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre sağkalımının regülasyonunu sağlayan kritik düzenleyicilerdendir (Cowley, Paterson ve ark. 1994). MAPK ailesinin üç önemli üyesi, kendi içerisinde farklı izotiplere sahip p38 MAPK'ler, c-Jun amino-terminal kinazlar (JNK'ler) ve hücre dışı sinyallerce düzenlenen kinazlar (ERKler)'dir. ERKler hücre bölünmesinin kontrolünde önemli rol oynarken,

JNK'ler ve p38'ler transkripsiyonun kritik düzenleyicileri olup, inflamatuvar sitokinler ve çevresel stresler tarafından aktive edilir (Johnson and Lapadat 2002).

TNF- α ; MAP kinazların üç grubunun da aktivasyonunu sağlayabilir (Amrani, Ammit ve ark. 2001).

MAPK yolak aktivasyonu, bir MAPK kinaz kinazı (MAP3K, MKKK) ve MAPK kinaz (MAP2K, MKK) ile karakterize edilen, üç katmanlı bir protein kinaz sistemi kullanır. MAP3K, MAPK'yi aktive eder, MKK'yi fosforile eder ve aktive eder (Derijard, Raingeaud ve ark. 1995). p38 MAPK, en az iki MAP2K, MKK3 ve MKK6 tarafından aktive edilir (Raingeaud, Whitmarsh ve ark. 1996). MKK4 ve MKK7 doğrudan JNK'yi fosforile ederek aktivasyonunu sağlar (Kishimoto, Nakagawa ve ark. 2003).

TNFR1-aracılı MAPK aktivasyonu tam olarak aydınlatılmamış olsa da, TPL2 (Tumor Progression Locus 2) serin/treonin kinazın ERK aktivasyonuna TAK1-IKK2-TPL2 yolağı ile aracılık ettiği düşünülmektedir. Öte yandan, stresle aktive edilmiş MAP kinazların (p38 ve JNK) TNF- α ile uyarılmış aktivasyonuna, ASK1, MLK, TAK1 ve TPL2 ile bağlananlar dahil olmak üzere çoklu yollar aracılık eder (Sabio and Davis 2014).

TNFR1; MADD (MAPK Activating Death Domain) aktivasyonu ile da ERK sinyalleşmesinin yolunu açar (Schievella, Chen ve ark. 1997). TNFR1 proteininin ölüm bölgesi ile MADD proteinin ölüm bölgesi interaksyona girerek Grb2 (Growth Factor Adaptor Protein) adaptör proteini üzerinden ERK aktivasyonu sağlar (Kurada, Li ve ark. 2009).

TNFR1, MAP kinaz yolağını aktive etmek için; sfingomiyelinin seramide hidrolizi ve bir serin/threonin seramid ile aktive olan protein (Manara, Caporali et al.) kinazının uyarılmasıyla başlatılan sfingomiyelin yolağını da kullanabilir. CAP kinaz sitoplazmik Raf1 (proto-oncogene serine/threonine protein kinase)'i fosforile ederek MEK (MKK) aşağı akışına doğru aktivasyonunu arttırabilmektedir (Yao, Zhang ve ark. 1995).

2.5. SH3 Protein Bölgesi (SRC Homoloji 3 Bölgesi)

Fonksiyonel protein bölgesi (domain), protein zincirinin geri kalanından bağımsız olarak işlev görebilen ve proteinin dizisinin evrimsel olarak korunmuş bir parçasıdır. Genel

olarak bu bölgeler 50 ile 250 aminoasit uzunluğunda olabilmektedir (Xu and Nussinov 1998).

Src homoloji bölgeleri SH2 ve SH3 sırasıyla 100 ve 60 amino asit uzunluğunda küçük protein motifleridir. SH2 bölgeleri, proteinlerde fosforile olmuş tirozin amino asitini tanıırken, SH3 bölgeleri etkileşime girdiği proteinlerin proline zengin motiflerini ve hidrofobik aminoasitleri içeren dizileri tanır ve bağlanır (Vidal, Gigoux ve ark. 2001).

SH3 bölgeleri, hücre iskeleti, Ras proteini ve Src kinaz ve diğer birçok protein ailelerini düzenleyen sinyal yollarının proteinlerinde bulunur (Pawson and Schlessingert 1993). SH3 proteinleri, adaptör proteinleri ve tirozin kinazlar ile etkileşime girer.

Proteinlerin birçok SH3 bağlayıcı epitopu, kısa doğrusal motif olarak temsil edilebilen bir konsensüs dizisine sahiptir: P-x-x-P (Cheadle, Ivashchenko ve ark. 1994, Sparks, Rider ve ark. 1996).

SH3 bölgesi, sinyal iletişim yollarındaki protein-protein etkileşimlerinin kontrol edilmesinden (Schlessinger 1994) ve sitoplazmik sinyalleşmede yer alan proteinlerin etkileşimlerinin düzenlenmesinden sorumludur (Koch, Anderson ve ark. 1991).

SH3 bağlanma bölgesi, genellikle, diğer proteinlerle etkileşime giren proteinlerde bulunur ve spesifik protein komplekslerinin, bağlayıcı partnerindeki prolin açısından zengin peptitlere bağlanma yoluyla birleşmesine aracılık eder.

2.6. TNFR1 ile Grb2 Adaptör Proteinin İnteraksiyonu

Adaptör protein Grb2 normal hücre proliferasyonu ve onkogenik sinyal iletim olaylarının önemli bir aracıdır. İki SH3 bölgesi tarafından kuşatılmış bir merkezi SH2 bölgesi barındırır. Grb2 SH3 bölgesinin bağlanma özellikleri zayıf olarak tanımlansa da Grb2'nin etki alanları ile yapılan çöktme deneyleri, Gab1'in Grb2 SH3 C terminal alanına kararlı bir şekilde bağlanabileceğini göstermektedir (Lewitzky, Kardinal ve ark. 2001).

TNFR1'in, adaptör protein Grb2 ve SOS değişim faktörü ile etkileşime girerek bazı aktivasyonları sağladığı bulunmuştur (Hildt and Oess 1999). Grb2, -COOH terminali SH3 bölgesi ile TNFR1'e ve NH2 terminali SH3 bölgesi ile SOS proteinine bağlanır.

TNFR1/Grb2 etkileşimi, c-Raf-1 kinazın TNF- α -bağımlı aktivasyonu için esastır; c-Raf-1 kinazın TNF- α ile aktivasyonu, NH2 veya C terminali SH3 bölgesindeki inaktive edici nokta mutasyonlarını barındıran Grb2 mutantlarının, Grb2/TNFR1 etkileşimini veya transdominant negatif Ras'ı bozan hücre geçirgen peptitlerin birlikte sentezlenmesiyle bloke edilebilir. TNFR1/Grb2/SOS/Ras etkileşiminin işlevselliği bir ön koşuldur (Hildt and Oess 1999), ancak c-Raf-1 kinazın TNF- α -bağımlı aktivasyonu için yeterli değildir. Nötr sfingomiyelinazın aktivasyonu için gerekli olan TNFR1/FAN etkileşiminin inhibisyonu, ya hücre geçirgen peptidler ya da FAN bağlanma alanının silinmesi ile c-Raf-1 kinazın aktivasyonunu önler (Aggarwal 2000).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bölge Spesifik Mutasyon (Side Directed Mutagenesis/SDM)

TNFR1 proteinin translasyon haritasında C-terminal bölgesine çok yakın prolince zengin “P₄₄₈PAP₄₅₁” motifinde 448 ve 451’nci sırada yer alan prolin amino asitinin kodlari olan CCG ve CCC kodonlari Alanin kodlayan GCG ve GCC kodonlarına aşağıda gösterilen primerler kullanılarak bölge spesifik mutagenез yöntemi (site-directed mutagenesis) ile değiştirilmiştir.

TNFR1-SH3 İleri Primer:

5’ CCCGCCGCCCTCGCGCCCGCGGCCAGTCTTCTCAGATG 3’

TNFR1-SH3 Geri Primer:

5’ CATCTGAGAAGACTGGCCGCGGGCGCGAGGGCGGCGGG 3’

Primerlerimiz 100 uM derişimi stok haline getirebilmek için biyoteknoloji firmasının gönderdiği orana göre TE Buffer ile sulandırılmıştır.

PCR Reaksiyonu; mevcut pcDNA 3.1A vektöründe CMV promotorunun altına klonlanmış TNFR1 reseptörü kullanılarak mutant formu oluşturmak için tasarlanan primerler ve Pfu DNA Polimeraz (Thermo Cat. EP0502) ile gerçekleştirildi.

Reaksiyon:

Steril ddH₂O, 10X Pfu Buffer, 1 pmol dNTP, 0,5 µM final konsantrasyonda ileri ve geri primerler, 2,5 ünite Pfu DNA Polimeraz ve 50 ng plazmid kullanılarak 25 µl toplam hacimde Thermal Cycler cihazı ile reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları; 95°C’de 1 dakika ön denatürasyon olmak üzere, 95°C’de 30 saniye, 65°C’de 1 dakika ve 72°C’de 21 dakika olacak şekilde 18 döngü tekrarlandı. 72°C’de 7 dakika son uzama ve son olarak 4°C’de kalacak şekilde düzenlendi.

3.2. Plazmidlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi

PCR tüpünde çoğaltılan mutant vektörlerin, bakteriden izole edilmiş ve mutagenize kalıp olarak kullanılmış yabancı tip TNFR1’den ayırt edilebilmesi için DpnI enzim kesimi gerçekleştirildi. DpnI enzimi (Roche 10 742 988 001) bakteriden izole edildiği için metile

durumda olan yabancı tip TNFR1 plazmidini keserken, mutagenез amacıyla tüpte sentezlenmiş plazmid metile durumda olmadığı için tanıyamaz ve kesemez.

Reaksiyon:

Steril ddH₂O, 10X Cut Smart Buffer, 1 µl Dpn-I enzimi, 10 µl SDM ürünü toplam reaksiyon 25 µl olacak şekilde ve Dry Block Heating Thermostat cihazında 37°C’de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün 65 °C’de 20 dakika inkübe edilerek enzim inaktivasyonu sağlandı.

3.3. Dpn1 Kesim Ürününün DH5α Bakterilerine Transformasyonu

3.3.1. Kompetan Hücre Hazırlama

Bu işlem için kullanılan solüsyonlar;

LB (Luria-Bertani) Sıvı Besiyeri: 25 gr LB, 1 litre distile su içinde çözündürölüp cam erlenlere dağıtılarak 121°C ‘de 15 dakika otoklavlandı.

50 mM CaCl₂ (Sigma C1016) /10 mM Tris (pH:7.4): 5,55 gr CaCl₂ (pelet) 50 ml dH₂O vorteksleyerek çözündürölüp 1M CaCl₂ elde edilir. 1 M Tris hazırlanıp otoklav işlemine tabi tutulduktan sonra;

5 ml 1 M Tris + 25 ml 1 M CaCl₂ eklenerek 300 ml’ye dH₂O ile tamamlandı ve pH:7,4’e ayarlandıktan sonra son hacim 500 ml’ye tamamlandı.

Tez çalışmamızda DH5α E.Coli suşu kullanıldı ve işlemler sırasıyla;

- 1) DH5α E.Coli bakteri suşunda 20 µl alınarak 10 ml LB sıvı besiyerine eklendi ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C’de 120 rpm gece boyu inkübasyonu sağlandı.
- 2) Üreyen hücrelerden 1 ml alınarak 100 ml LB sıvı besiyeri içerisinde 4 saat inkübe edildi. Bakterilerin konakçı DNA’yı almaya hazır oldukları zaman büyüme eğrisinde log fazının ortalarına denk gelen süredir.
- 3) Inkübasyon sonrası 10 dakika buz üzerinde bekletildi.
- 4) 50 ml’lik falkonlara bölünerek 2000 rpm’de +4 °C’de santrifüj edildi.
- 5) Süpernatant atıldı ve pelete soğuk 50 mM CaCl₂ /10mM Tris (pH: 7.4)’den 100 ml

ilave edildi.

6) 15 dakika buzda bekletildi ve 2000 rpm 37 °C’de 15 dakika santrifüj edildi.

7) Süpernatant atıldı.

8) Pelete 9 ml 50 mM CaCl₂/10 mM Tris + 1 ml %100 gliserol eklendi.

9) Eppendorf tüplere bölünerek -80 °C’ye kaldırıldı.

3.3.2. Agar Plate Hazırlama

Ağırlık/Hacim oranı %1 olacak şekilde 200 ml besiyeri için 2 gr bakteriyolojik agar (Oxoid L11) tartıldı ve 200 ml LB sıvı besiyeri eklenerek otoklavlandı. Soğumaya bırakılan 200 ml sıvı besiyeri için final konsantrasyonu 100 mg/ml olacak şekilde 200 µl amfisilin (Sigma A9393) eklendi. Besiyeri bakteriyolojik petrilere 30- 40 ml dağıtılarak soğuması beklendi. Petriler su buharı oluşmaması adına yarı açık konumda laminar flow içerisinde bekletildi ve donma gerçekleştikten sonra kapaklar kapatılıp parafilmlenerek kullanım zamanına kadar +4C’de muhafaza edildi.

3.3.3. E.Coli DH5α Kompetan Hücrelerine Plazmid Transformasyonu

-80 °C’den çıkarılan kompetan hücrelerin buz üzerinde erimesi beklendi ve sırasıyla;

1) 75 µl kompetan hücre ile 25 µl DpnI kesim ürünü (50-10 ng) steril bir eppendorf tüpte ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi.

2) Süre sonunda 42 °C’de 1 dakika ısı şokuna maruz bırakıldı ve tekrar buz üzerine alındı.

3) Tüpün üzerine antibiyotiksiz 950 µl LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C 120 rpm’de gen ekspresyonu sağlaması adına 1 saat çoğalmaya bırakıldı.

4) Süre sonunda antibiyotikli Agar petrilere yayma işlemi gerçekleştirildi ve 37°C’de inkübasyonu sağlandı. Bu sayede amfisilin direnç geni içeren plazmid DNA’sını alan bakteriler çoğalıp koloni oluşturmuştur.

5) Oluşan kolonilerden tek koloni seçimi gerçekleştirildi ve amfisilin içeren 200 ml LB sıvı besiyeri içerisinde gece boyu 37 °C ve 150 rpm’de inkübasyonu sağlandı.

6) Ertesi gün plazmid izolasyonu gerçekleştirmek için 4500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek supernatant atıldı ve peletler -20 °C’ye kaldırıldı.

3.4. Bakteriden Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol Yöntemiyle Plazmid İzolasyonu

Glukoz/Tris/EDTA (Solüsyon 1)

- 50 mM Glukoz
- 25 mM TrisCl
- 10 mM EDTA

0,9 gr glukoz tartılır. 50 ml ddH₂O'da çözülür. 2,5 ml 1M TrisCl (pH.8) ve 10 ml 0,1 M EDTA (ethylenediamine tetra acetic acid) eklenerek 100 ml ddH₂O'ya tamamlandı.

Bu solüsyondaki EDTA; hücre yapısının korunması için gerekli olan Mg⁺² iyonlarını bağlayarak hücre yapısını bozar ve DNA degradasyonunu sağlayan hücre enzimlerini inhibe eder. Glukoz bir sonraki lizis aşaması için hücrelerin şişmesini sağlar. Tris ise ortam pH'sinin sabit kalmasını sağlayan bir tampondur.

NaOH/SDS (Solüsyon 2)

- 2 ml NaOH
- 10 ml %10 SDS

Bu solüsyondaki anyonik deterjanlar hücre zarının lipid yapısını lizise uğratarak uzaklaştırır ve hücre membran yapısını bozarak bakteri hücrelerinin lizise uğramasını ve plazmidlerin ortama salınmasını sağlar.

Potasyum–Asetat pH:4,8 (Solüsyon 3)

- 49,075 gr KAc tartılıp 80 ml dH₂O'da çözülüp pH ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

Bu solüsyon proteinlerin ve genomik DNA'nın yüksek konsantrasyonda potasyum asetat bağlayarak santrifügasyon ile çöktürölmelerini sağlar.

Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol

- Oranları sırasıyla 25:24:1 ml'dir.

1) Bütün gece üreyen bakterilerden 1,5 ml eppendorfa alındı.

2) 13400 rpm'de 75 saniye satrifüj yapıldı.

- 3) Süpernatant çekip atıldı.
- 4) Pelet 100 ul Solüsyon 1 ile vorteks ve pipetaj yapılarak kaldırıldı. Pelet tekrar süspanse edildikten sonra 5 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 5) 200 ul Solüsyon 2 eklenerek birkaç defa alt üst edildikten sonra 5 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 6) 150 ul Solüston 3 eklenerek 2 saniye vortekslendi ve 10 dk buz üzerinde inkübasyon sağlandı.
- 7) 8000 rpm 10 dk santrifüj edildi.
- 8) Üst faz yeni eppendorflara aktarıldı.
- 9) Final dozu 0,5 ug/ul olacak şekilde RNase eklendi ve 37°C'de 30 dk su banyosunda enzimin aktifleşmesi sağlandı.
- 10) Eşit hacimde Solüsyon 4 eklendi.
- 11) 8000 rpm 10 dk santrifüj edildi.
- 12) Üst faz yeni eppendorflara aktarıldı. Üst faz alınırken kesinlikle ara fazda bulunan beyaz çökeltiye temas edilmemelidir. F:C:I protein ve RNA komplekslerine bağlanıp çökmesini sağlar ve bu çökelti ile temas olursa protein kontaminasyonu ile karşılaşılacaktır.
- 13) Hacmin 2 katı oranında %100 Etanol eklendi ki bu DNA molekülünün etrafındaki H₂O moleküllerini çekmek amacıyla kullanılır.
- 14) En az 1 saat -80°C'de inkübe edildi.
- 15) 8000 rpm 10 dk santrifüj edildi.
- 16) Süpernatant atıldı ve peletin speedvac kullanılarak kurutulması sağlandı.
- 17) Alkolden tamamen arandıktan sonra pelet, 50 ul TE Buffer'da (TrisCl/EDTA: DNA'yı uzun süre saklamak için kullanılır) çözündürüldü.

3.4.1. Bakteriden Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu bir başka yöntem olan Invitrogen Purelink HiPure Midiprep kiti (K2100-14) ile de gerçekleştirildi. -20°C'den çıkartılan peletler vortekslenerek çözündürüldü ve buz üzerine alındı.

- 1) Peletin yoğunluğuna göre RNaz eklenmiş Resuspension Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) ilave edilerek süspansiyon bir karışım elde edildi.

- 2) Aynı oranda Lysis Buffer (0.2 M NaOH, %1 SDS) eklenerek birkaç defa nazik bir şekilde altüst edildi ve 5 dakika inkübasyon sağlandı.
- 3) Süre sonunda soğutulmuş Precipitation Buffer (3.1 M Potasyum asetat, pH 5.5) eklendi ve süt kesigi görünümü kazanana kadar hafifçe altüst edildi.
- 4) 10.000 rpm 15 dakika santrifüj edildi.
- 5) Bu sırada anyon takaslı kolonlara dengeleme amaçlı kullanılan kolonlara yüksek tuz konsantrasyonlu Equalibration Buffer 10 ml (0.1 M Sodyum asetat, pH 5.0, 0.6 M NaCl, 0.15% (v/v) TritonX-100) eklendi.
- 6) Santrifüj bitiminde süpernatant temiz tüplere alındı ve kolonlara yüklendi.
- 7) Sonrasında 2 defa 10 ml Wash Buffer (0.1 M Sodyum asetat pH 5.0, 825 mM NaCl) eklenerek kolonlar yıkandı.
- 8) Negatif yüklü DNA'yı tutan kolonlar 15 ml'lik falkona aktarılarak 5 ml Elution Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.25 M NaCl) ile temiz tüpe akması sağlandı.
- 9) 3,5 ml isopropanol eklenerek 10.000 rpm +4°C'de 1 saat santrifüj edildi.
- 10) Süpernatant atıldı ve soğuk %70'lik etanol eklendi ve çöken DNA'nın yeri belirlenerek 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 11) Süpernatant atıldı. Alkolün DNA etrafındaki suyu çekerek saflaştırma işlemini tamamlamasıyla çökelti kurumaya bırakıldı.
- 12) Çöken DNA miktarına göre 100-200 µl TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 M EDTA) ile çözdürülerek Multiskan Thermo spektrofotometrede DNA konsantrasyonu ölçüldü.
- 13) Plazmid DNA'sı, %1,5 agaroz jelde incelenerek -20°C'ye kaldırıldı.

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

%1,5'lik agaroz jel hazırlanması için 1,5 gr toz agaroz (Sigma Cat. A5093) tartıldı ve 100 ml TBE (Tris-Sigma /Borat- Merck 1.00165.1000 / EDTA- Sigma E5134) ile kaynatılarak çözdürüldü. Soğumaya bırakılan çözelti ılık hale geldiğinde içerisine 0,5 µg/ml etidyum bromür (EtBr/Sigma E87519) eklendi. EtBr DNA'ya interkalasyon yaparak UV ışığı altında floresan sinyal veren katyonik ve mutajenik bir ajandır. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek ılık agaroz jel elektroforez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden çıkarıldı ve agaroz jel elektroforez tankına (BIORAD) yerleştirildi.

100 bp'lik DNA marker ve jelde görüntülenmek istenen DNA ürünü mikropipet yardımıyla kuyucuklara koyularak tanka bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 20 dakika yürütüldü ve UV ışığı altında transillüminatör yardımıyla bantlar kontrol edildi.

3.6. TNFR1 Geninin Mutasyon Yaratılan Bölgesinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

Elde edilen plazmidlerde mutasyon, Sanger dizileme ile belirlendi. Bu amaçla, öncelikle, gen bölgesi PCR yöntemi ile Palm Cycler cihazında reaksiyon gerçekleştirildi.

Reaksiyon:

Steril ddH₂O, 5µl Q solüsyonu (Qiagen), 2,5µl 10X tampon (Qiagen), 1pmol dNTP, 1pmol ileri ve geri primerler, 2 ünite Taq Polimeraz, 100ng plazmid DNA'sı toplam hacim 25 µl olacak şekilde deney tüpünde hazırlandı.

pcDNA3.1A İleri Primer: 5' GCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTC 3'

pcDNA3.1A Geri Primer: 5' GTCGACGGCGCTATTCAGATCTC 3'

Reaksiyon koşulları; 95 °C'de 5 dakika ilk denatürasyonun ardından, 95 °C'de 45 saniye, 61 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 90 saniyeden oluşan 35 döngü, son olarak 72 °C'de 15 dakika son uzama evresi olacak şekilde düzenlendi. PCR reaksiyonu sonunda reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği %1,5'lik agaroz jelde kontrol edildi.

3.6.1 PCR Purifikasyonu

PCR purifikasyonu, istenmeyen dNTP'lerin, primer atıklarının kimyasallar yardımıyla uzaklaştırılmasını sağlar. Amacımız saf reaksiyon ürünü elde etmektir. PCR purifikasyonu, kit kullanılarak (Invitrogen, K3100-01) üretici firmanın protokolü çerçevesinde gerçekleştirildi:

- 1) Reaksiyon hacminin 4 katı kadar Binding Buffer (B2) eklendi.
- 2) Bu karışım negatif yüklü DNA'yı tutması için tasarlanan silika membrane yapısındaki pozitif yüklü kolonlara yüklendi.
- 3) 12500 rpm'de 60 saniye santrifüj edildi.
- 4) 650 µl Wash Buffer (W1) kolonlara yüklendi.
- 5) 12500 rpm 60 saniye, ve hemen ardından 13400 rpm 120 saniye santrifüj edildi.

6) Kolonlar yeni eppendorf tüplere alındı ve 50 µl Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyonu sağlandı.

7) 13400 rpm 120 saniye santrifüj edildi ve DNA kolondan ayrıldı.

Saflaştırma işlemi gerçekleştirilen plazmid DNA'sı öncelikle %1,5'lik agaroz jelde kontrol edildi ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.7. Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulama Reaksiyonu

Sekans reaksiyonu, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ile kuruldu ve ABI MicroAmp Fast 96 kuyucuklu optik plakalara örnekler yüklenip Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda bulunan 16 kapillerli sekans cihazında yürütölüp analiz edildi.

Reaksiyon:

Steril ddH₂O, 3.2 pmol geri primer, 2 µl 5X tampon, 1 µl BigDye, 1 µl PCR purifikasyon ürünü toplam hacim 10µl olacak şekilde , 96°C'de 1 dakika ön denatürasyonun ardından, 96°C'de 10 saniye, 50°C'de 5 saniye ve 60°C'de 4 dakika 25 döngü ile tamamlandı.

3.7.1 Sekans Purifikasyonu

Sekans reaksiyonunun ardından, tüp içerisinde kalan DNA atıklarını temizlemek amacıyla Etanol-Sodyum asetat presipitasyon yöntemiyle gerçekleştirildi.

3M NaAc: 4,92 gr NaAc tartıldı ve 10 ml steril su ile çözdürüldü. pH 5.2'ye ayarlanarak hacim 20 ml'ye tamamlandı. Eppendorflara alikotlanarak -20 °C'ye kaldırıldı.

1) Reaksiyon ürünlerinin üzerine 2 µl 3M NaAc yüklendi.

2) Bu karışım yeni eppendorf tüplere alınarak 30 µl %100 etanol eklendi. Birkaç saniye boyunca vorteksenerek 20 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyonu sağlandı.

3) 13400 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.

4) Tüpün dibine çöken çökeltiye değmeden supernatant atıldı.

5) 200 µl etanol eklenerek 13400 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.

6) Dikkatli bir şekilde çökeltiye değmeden supernatant atıldı.

7) Alkolden arıncaya dek SpeedVac cihazında kurumaya bırakıldı.

3.7.2 Sekans Ürünlerinin Cihaza Yüklenmesi

Sekans ürünleri 20 µl steril su ile çözündürülerek 96 kuyucuklu optik plakalara aktarıldı ve ışık görmeyecek şekilde septa ile kapatılarak ABI 3130 Genetic Analyzer cihazında yürütüldü. Sonuçlar Chromas programında incelendi.

3.8. Hücre Kültürü

In vitro olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, SV40 büyük T antijeni ile transforme edilmiş insan embriyonik böbrek hücre hattı 293T kullanıldı. Hücreler L-glutamin (Lonza), esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Dana Serum (FBS- Biochrom cat. No:S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B (BI- 03 033 113) ve gentamisin ilaveli DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Biochrom FG0415) içinde; %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde monolayer kültür olarak çoğaltıldı.

3.9. 293T Hücrelerine CaPO₄ Yöntemiyle Yabancı Tip TNFR1 ve Mutant Plazmid Transfeksiyonu

Yabancı DNA'nın ökaryotik memeli hücrelerine aktarılması ve gen ekspresyonunu gerçekleştirme işlemi olan transfeksiyon yöntemi, kimyasal yöntemle uygulandı. Bu yöntem için kullanılan solüsyonlar;

0,25 M CaCl₂ (Sigma C1016): 2,75 gr CaCl₂ 100 ml distile su ile çözündürüldü ve 0,2 µm filtreden geçirilerek 15'lik falkonlara alikotlandı

2X HEPES (pH 7.05): 500 ml hazırlamak için; 8 gr 280 mM NaCl (Merck 1.06404.1000), 0,37 gr 10 mM KCl (Sigma P9333), 0,3 gr 1.5 mM Na₂HPO₄.H₂O (Merck 1.06345.1000), 1 gr 12 mM D-Glukoz (Sigma 16301), 5 gr 50 mM HEPES (Sigma H3375) kullanıldı.

PBS (Phosphate Buffer Saline) Solüsyonu (pH 7.4): 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl (Sigma), 1,44 gr NaH₂PO₄ (Sigma), 0,24 gr KH₂PO₄ 800 ml distile su içerisinde çözündürülüp pH 7.4 olarak ayarlandıktan sonra hacim 1 litreye tamamlandı. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmadan önce otoklavlandı.

293T hücreleri transfeksiyondan bir gün önce, Tripsin-EDTA (Gibco 25200-056) solüsyonu ile kaldırılıp, 100x20 mm steril petri kaplarına ertesi gün %60-70 yoğunluk olacak şekilde pasajlandı. Petri başına 8 µg DNA olacak şekilde karışım hazırlandı. 15'lik falkon tüplere öncelikle DNA koyuldu ve üzerine 500 µl'ye tamamlanacak şekilde 2X HEPES solüsyonu eklendi. 500 µl 0,25 M CaCl₂ yavaşça ve damlalar halinde köpürtülerek çözeltiye eklendi. 30 dakika kadar DNA+CaPO₄ kompleksinin oluşması beklendi. Presipitatlar gözlemlendikten sonra vortekslenerek pipetaj yapılan karışım 10 cm yükseklikten hücrelerin üzerine bırakıldı ve gece boyu inkübasyonu sağlandı. Ertesi gün transfeksiyonun etkinliğini arttırmak amacıyla besiyeri çekilerek, hücreler 1 dakika %10 gliserollü DMEM ile muamele edildi ve süre sonunda 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından normal büyüme ortamına alınarak %10 serumlu DMEM ile inkübatöre kaldırıldı.

3.10. 293T Hücrelerinin TNF ile Muamelesi

Transfeksiyon işleminden 48 saat sonra gen ekspresyonu gerçekleşen hücrelere; %10 serumlu besiyeri uzaklaştırılarak, büyüme faktörlerinin olmadığı serumsuz besiyeri eklendi. Hücreler 16 saat boyunca serumsuz ortamda inkübe edildi. Süre sonunda 1 saat fosfataz inhibitörü olan Sodyum orthovanadate (Na₃VaO₄)'den 5 ul eklenerek 1 saat inkübe edildi. Final konsantrasyonu 10 ng/ml TNF muamelesi ardından deney basamaklarına göre değişen süreler içerisinde hücre lizatları toplandı.

3.11. Hücre Lizatı Hazırlanması

Triton-X Lizis Tamponu (pH 7.4): 100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl₂-SigmaM8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadate (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche-cat. no: 11 836 145 001).

Hücre petri kaplarından besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. 1 ml Triton-X Lizis tamponu hücrelere verilerek hücre kazıyıcısı (Greiner cell scraper 541 080) ile petrilere toplanan lizatlar 1,5 ml'lik ependorflara alınarak -80 °C'de saklandı.

3.12. Hücre Lizatlarının Protein Miktarının Belirlenmesi (Bradford Yöntemi)

Stok BSA (10 mg/ml): 100 mg BSA tartılarak 10 ml steril su içerisinde çözündürüldü ve 0,2 µm filtreden geçirilerek -20°C’de saklandı.

-80 °C’den buz üzerine alınan hücre lizatları, 10.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra dibe çöken hücre artıkları atılarak süpernatant yeni ependorfa aktarıldı. 10 mg/ml stok BSA solüsyonundan 1 mg/ml BSA hazırlandı. Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi ddH₂O ile 5 kat seyreltilerek hazırlandı ve ışık görmeyecek şekilde saklandı. 96 kuyucuklu kültür kaplarına 0, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 µl BSA üzer tekrarlı olacak şekilde eklendi. Aynı şekilde hücre lizatlarından 1 µl üçlü tekrarlar halinde ayrı ayrı koyuldu. 100 µl Bradford Assay Reagent eklenerek 595 nm dalga boyunda protein miktarı tayin edildi. İşlem BSA solüsyonu baz alınarak standart eğri formülüne göre proteinlerin miktarlarını ortaya koyar.

3.13. Western Blot Yöntemi

5X PBS (pH 7.4): 40gr NaCl, 1gr KCl, 7,2gr Na₂HPO₄, 1,2gr KH₂PO₄ tartılıp, 800 ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7.4’e ayarlanarak hacim 1 litreye tamamlandı.

1X PBS-T: 800 ml distile su ile 200 ml 5X PBS içerisine 1 ml Tween-20 (Merck 8.22184.1000) eklendi ve altüst edilerek karıştırıldı.

Resolving Buffer (1,5M TrisBase pH 8.8): 90,85 gr Tris Base tartıldı ve 400 ml distile suda çözödürölüp pH ayarı yapıldıktan sonra hacim 500 ml’ye tamamlandı.

Stacking Buffer (0,5M TrisBase pH 6.8): 30,28 gr Tris Base tartıldı ve 400 ml distile suda çözödürölüp pH ayarı yapıldıktan sonra hacim 500 ml’ye tamamlandı.

%10 SDS: 50gr Sodyum Dodesil Sölfat (SDS) tartılıp 300ml distile suda çözödürölüdü ve hacim 500 ml’ye tamamlandı.

10X Running Buffer: 15 gr Tris Base ile 94 gr Glisin (Vivantis PR0608) tartıldı. 800 ml distile suda çözödürölerek 50 ml %10 SDS eklendi ve hacim 1 litreye tamamlandı.

1X Running Buffer: 1350 ml distile su ile 150 ml 10X Running Buffer ile karıştırılarak elde edildi.

Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8): 290 gr Akrilamid (Merck 8.00830.1000) ile 8 gr Bisakrilamid (Merck 2610) 1 litre distile suda çözdürülerek 0,22 µm vakum filtreden geçirilerek ışık almayacak şişelerde saklandı.

%10 Amonyum Persülfat: 0,1 gr APS (Sigma A3678) 1 ml steril distile su içerisinde vortekslenerek çözdürüldü.

Transfer Buffer: 14,5 gr Tris Base ile 7,5 gr Glisin 2 litre su içerisinde çözdürüldü ve deney öncesinde 500 µl metanol eklendi.

SDS Yükleme Tamponu: 1 ml gliserol, 3 ml %10 SDS, 1.25 ml 1M Tris-HCl pH 6.7, 1,2µg bromofenol mavisi eklendi. 0,22 µm filtreden geçirilerek alikotlanıp -20 °C'ye kaldırıldı. Kullanmadan önce 1ml'ye 50 µl β-merkaptotanol (Sigma M3148) ilave edildi.

Membran Bloklama için %1 BSA: 1 gr Bovine Serum Albumine tartılarak 100 ml 1X PBS-T içerisinde çözdürüldü ve kağıt filtreden geçirildi.

Kullanılan Antikorlar: p-JNK (Santa Cruz sc-12882), JNK (Santa Cruz, sc-7345), p-p38 (Cell Signalling, 9211L), p38 (Cell Signalling, 9212S), p-AKT (Cell Signalling, 9271S), AKT (Cell Signalling, 9272S), p-ERK (Santa Cruz, sc-7383), ERK (Santa Cruz, sc-94), GAPDH (Santa Cruz, sc-47724), Anti-Mouse Sekonder Antikoru (KPL, 474-1806), Anti-Rabbit Sekonder Antikoru (KPL, 474-1506) katalog numaralarıyla Cell Signalling, Santa-Cruz ve KPL Biyoteknoloji firmalarından temin edilmiştir.

3.13.1 SDS-Page Jel Elektroforezi

İşaretlediğimiz proteinler 25-120kDa aralığında olduğu için işaretleme ve rezolüsyon etkinliği açısından %10'luk resolving jel kullanımı tercih edildi.

Resolving Jel için;

Resolving Jel	%7	%10	%12	%15
Su	15 ml	11,55 ml	10,5 ml	7,05 ml
Resolving Buffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Acr:Bis	7,05 ml	10,5 ml	12 ml	15 ml
%10 SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
APS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Temed	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Toplam	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Resolving jel hazırlanan camların arasından döküldükten sonra jelin üzeri %1 SDS ile düz bir yapı oluşması için kaplandı. Ardından Stacking jel hazırlandı:

Stacking Jel	5 ml(Tek jel için)	10 ml(İki jel için)
Su	3 ml	6 ml
Stacking Buffer	1,25 ml	2,5 ml
Acr:Bis	625 µl	1,25 ml
%10 SDS	50 µl	100 µl
APS	50 µl	100 µl
Temed	5 µl	10 µl
Toplam	5 ml	10 ml

Stacking hizalama jeli hazırlanınca taraklar takılarak jelin 1 saat süre boyunca donması beklendi. Resolving ayrıştırıcı, Stacking hizalama jeli olarak anılır.

3.13.2. Jele Yüklenecek Örneklerin Hazırlanması

Protein konsantrasyonları belirlenen lizatlar buz üzerine çıkarılarak erimesi beklendi. Örneklerden 100 µg alınarak, üzerlerine lizat hacminin yarısı kadar SDS yükleme tamponu koyuldu. 95 °C’de 5 dakika boyunca Dry Block Heating Thermostat (Bio TDB-

100) cihazında inkübe edildi. Jel yükleme tipleri (ExactaCruz sc-201732) ile poliakrilamid jele yüklendi. Jelin ilk sırasına protein marker (Bio-Rad 161-0374) yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 120 voltta, resolving jelde ise 150 voltta 1X running buffer ile yürütüldü. (Cihaz: Amersham 80-6171-96). Yürütülen örneklerin görüntülenmesi amacıyla, jelden PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.13.3. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Proteinlerin jel içerisinde yürüme işlemi sonlandıktan sonra camlar akan soğuk suyun altında bekletildi. Transfer cihazının aparatları, transfer sünger, whatman kağıdı (Sigma Z691011), PVDF membran (Biorad Cat. No: 1620177), transfer tamponu ve metanol hazırlandı. Transfer aparatının negatif yüklü siyah kısmına transfer tamponu ile ıslatılmış transfer sünger yerleştirildi. Üzerine whatman kağıdı uygun boyutlarda yerleştirilerek üzerine camların arasından dikkatlice çıkarılan jel koyuldu. Poliakrilamid jelin üzerine metanol ile ıslatılmış PVDF membran hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Ardından tekrar whatman kağıdı ve en üste sünger gelecek şekilde konularak transfer aparatı dikkatlice kapatıldı. Transfer tamponu ile doldurulan transfer cihazına aparatlar hızlıca yerleştirildi. Cihaz buz üzerine yerleştirilip, gece boyu 40V akımda yürütülerek proteinlerin membrana transferi sağlandı.

3.13.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi

Proteinlerin PVDF membrana transferi gerçekleştikten sonra, membran metanol ile fiks edilip kurutulduktan sonra %1 BSA solüsyonu ile 2 saat boyunca bloklandı. Sonrasında %1 BSA ile hazırlanmış primer antikor (1/1000 ile 1/10.000 arasında değişen oranlarda) ile 1 saat işaretlendi. Bazı primer antikorların işaretlemesi gece boyu +4 °C’de yapıldı. Primer antikor uzaklaştırılarak 30’ar dakika 2 kere 1X PBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve %1 BSA ile hazırlanmış sekonder antikor olan anti-mouse veya anti-rabbit (1/2500 ile 1/5000 arasında değişen oranlarda) ile oda sıcaklığında 1 saat işaretlendi. Süre sonunda sekonder antikor alınarak 2 kez 30’ar dakika 1X PBS-T ile yıkama gerçekleştirildi. Membran temiz bir alana alınarak 1 dakika boyunca ECL (Biorad Clarity ECL Cat.1705061) reaktifine maruz bırakıldı. Ardından karanlık odada kemüliminesans olarak ECL reaktifi kullanılarak membran üzerindeki spesifik sinyaller radyolojik filme (Kodak 8116428) aktarıldı. Filme geçen sinyaller Developer solüsyonu

ile geliştirilerek Fixer solüsyonunda fikse edildi ve son olarak su içerisinde yıkanarak kurumaya bırakıldı (ILFORD PQ UNIVERSAL Cat. 1155082).

Fosforilasyon seviyesi belirlenen proteinlerin aynı membran üzerindeki bazal seviyelerini belirlemek amacıyla strip-off işlemi gerçekleştirildi.

3.13.5. Strip Off İşlemi

Strip-off Solüsyonu: 67,5 ml steril H₂O, 20 ml %10 SDS, 12,5 ml TrisBase 0.5M pH 6.5 solüsyonları cam bir şişede hazırlanarak mikrodalga fırında 55°C'ye kadar ısıtıldı ve 704 µl β-Merkaptoetanol eklendi.

Çalkamalı inkübatör sıcaklığı 55°C'ye ayarlandı ve membran ağzı kapalı bir kap içerisinde 55°C sıcaklıktaki strip-off solüsyonu ile 20-30 dakika boyunca çalkalandı. Daha sonra oda sıcaklığında 15'er dakika 3 defa 1X PBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Membran başka bir antikorla işaretlenmek üzere 3.13.4 başlığı altında anlatılan işlemlere tabi tutuldu.

3.14. NF-kB Aktivasyonun Etkisinin Belirlenmesi

293T hücrelerine; her kuyucuğa 150 ng NF-kB bağlanma bölgesi içeren ve lusiferaz geni klonlanmış NF-luc plazmidi ve 150 ng salmon sperm DNA'sı (boş), yabancı tip TNFR1, TNFR1-SH3-P/A ile lipofektamin 2000 ajanı kullanılarak 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında, her kuyucukta eşit hücre olacak şekilde transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Transfeksiyon işlemi 25 µl serumsuz besiyeri içerisinde; 150 ng NF-luc, 150 ng plazmid örneği ve 0,4 µl Lipofectamine-2000 (Thermo-Fisher Cat. 18324012) ajanı ilave edilerek kuyucuklara dağıtıldı. 20 dakika kompleks oluşumu beklendi. Her bir kuyucuk için thoma lamında sayılan 293T hücreleri, 25.000 hücre/100 µl serumlu besiyeri olacak şekilde kuyucuklara ilave edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, her bir setten (mutant, yabancı tip ya da boş transfekte örnek setleri) 5'er kuyucuğa TNF-α verilir, 5'er kuyucuğa verilmeyecek şekilde tasarlandı. Serumlu besiyeri içerisinde final konsantrasyonu 10 ng/ml olacak şekilde TNF-α verilecek kuyulara ilave edildi. TNF-α verilmeyen kuyulara serumlu besiyeri eklendi. TNF-α muamelesinden 6 saat sonra, hücrelerde gerçekleşen lusiferaz aktivitesi Promega OneGlo lusiferaz assay kiti ile luminometrede ölçümü gerçekleştirildi.

3.15. MTT Proliferasyon Testi

MTT (5 ng/ml): (Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, AppliChem, A2231), belirtilen konsantrasyonda 1X PBS ile çözdürüldü ve steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek karanlıkta muhafaza edildi.

NF-kB aktivasyon sonucunun hücre sayısına bağlı olmadığını kanıtlamak amacıyla MTT canlılık testi ile karşılaştırıldı. MTT deneyine başlamadan önce 96 kuyulu kültür kapları ile 3.14 başlığı altında anlatılan deney tekrarlandı. Daha sonra kuyu başına 20 µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat boyunca 37°C etüvde inkübe edildi. Elde edilen verilerin analizleri Prism GraphPad programları kullanılarak değerlendirildi.

Sonuçlar normalize edilerek ve $\pm$ standart hata değerleri belirlenerek gösterildi.

3.16. Apoptoz İndüksiyonu

Yabanıl tip TNFR1 ile mutant plazmidin apoptoz indüksiyonuna olan etkilerinin belirlenmesi adına kolorimetrik Kaspaz-3 (Biovision K106) ve Kaspaz-8 (K113-200) aktivasyon deneyleri yapıldı.

Transfeksiyon işleminin 48. saatinde, 24 saat boyunca kuyucuklara 10 ng/ml TNF- α muamelesi yapıldı. TNF- α muamelesi yapılan kuyucuk kadar işlem görmemiş kuyucuklarda 24 saat boyunca serumlu besiyerinde bekletildi. Süre sonunda lizatlar 1X PBS ile kazınarak toplandı ve 13400 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek çöken peletin üzerine 50 µl Cell lysis buffer ile hücreler lizis edildi. 10 dakika buz üzerinde inkübasyon gerçekleştirildi. 13400 rpm'de 1 dakika santrifüj tekrarlandı ve süpernatant yeni ependorf tüpe alınarak -80 °C'ye kaldırıldı.

Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi (3.12) ile belirlendi. Her bir protein lizatı, 150 µg lizat hacmi olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına eklendi ve hacim hücre liziz tamponu ile 50 µl'ye tamamlandı. 10 mM DTT içeren 2X reaksiyon tamponu her bir kuyucuğa 50 µl ilave edildi. Lizatlar, 2 saat boyunca kaspaz 3 aktivasyon deneyi için 200 µM DEVD-pNA ile veya kaspaz 8 aktivasyon deneyi için 200µM IETD-pNA ile 37 °C'de ışık almayacak şekilde inkübe edildi. 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu (Thermo Labs Multiskan Spectrum) ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. TNFR1 Translasyon Haritasının İncelenmesi ve SH3 Bağlanma Bölgesinin Belirlenmesi

TNFR1 proteininin aminoasit dizilimi incelendiğinde C-terminal bölgesinde prolince zengin P₄₄₈PAP₄₅₁ motifini belirledik ve bu dizinin SH3 domain içeren proteinler için bir bağlanma bölgesi olabileceğini öngördük (Şekil 4.1).

241	S	K	L	Y	S	I	V	C	G	K	S	T	P	E	K	E	G	E	L	E
261	G	T	<u>T</u>	<u>T</u>	K	P	L	A	P	N	P	S	F	S	P	T	P	G	F	T
281	P	T	L	G	F	S	P	V	P	S	<u>S</u>	T	F	T	S	<u>S</u>	<u>S</u>	T	Y	T
301	P	G	D	C	P	N	F	A	<u>A</u>	P	R	<u>R</u>	E	V	A	P	<u>P</u>	Y	Q	G
321	A	D	P	I	L	A	T	A	L	A	S	D	P	I	P	N	P	L	Q	K
341	W	E	D	S	A	H	K	P	Q	S	L	D	T	D	<u>D</u>	P	A	T	L	Y
361	A	V	<u>V</u>	E	N	V	P	<u>P</u>	L	R	W	K	E	F	V	R	<u>R</u>	L	G	L
381	S	D	H	E	I	D	R	L	E	L	Q	N	G	R	C	L	R	E	A	Q
401	Y	S	M	L	A	T	W	R	<u>R</u>	<u>R</u>	T	P	R	<u>R</u>	E	A	T	L	E	L
421	L	G	R	V	L	R	D	M	D	L	<u>L</u>	G	C	L	E	D	I	E	<u>E</u>	A
441	L	C	G	P	A	<u>A</u>	L	P	P	A	P	S	L	<u>L</u>	R	*	G	C	A	P

Şekil 4.1. TNFR1 proteininin translasyon haritasındaki C-terminal bölgesindeki SH3 bağlanma bölgesi PPAP aminoasitlerinin kırmızı ile gösterimi

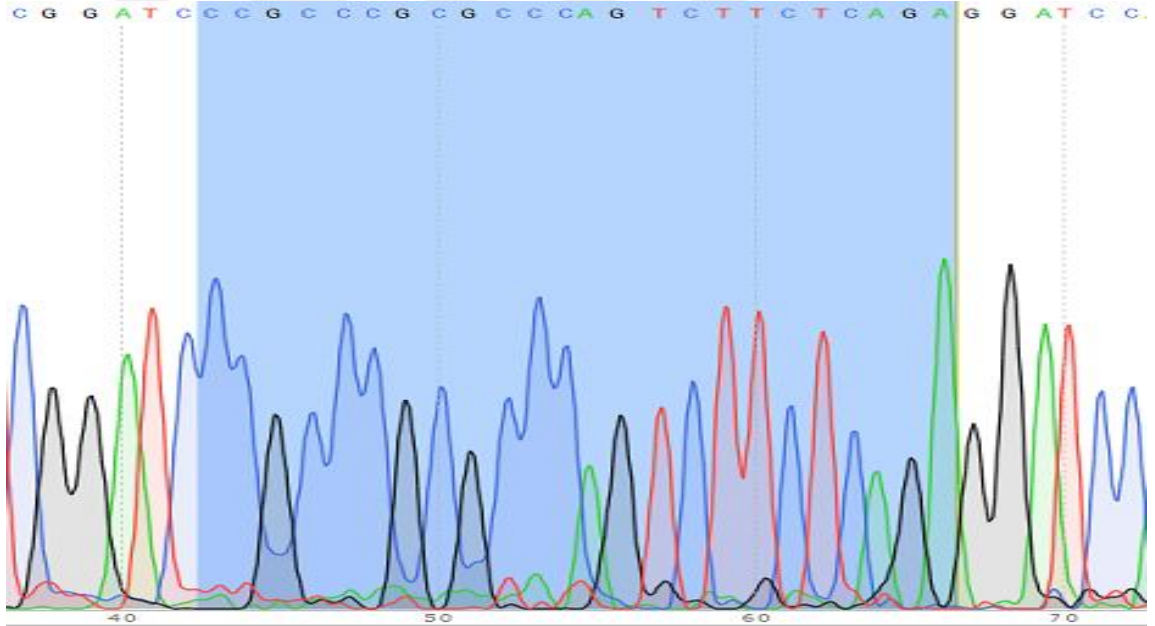
Çalışmamızda prolince zengin SH3 bağlanma bölgesi olabileceğini düşündüğümüz bölgeye spesifik olarak mutasyon gerçekleştirerek, insan TNFR1 proteininin aktivasyonuna olan etkilerini araştırdık.

4.2. TNFR1 Proteini SH3 Bağlanma Bölgesinin Alanin Mutantının Oluşturulması

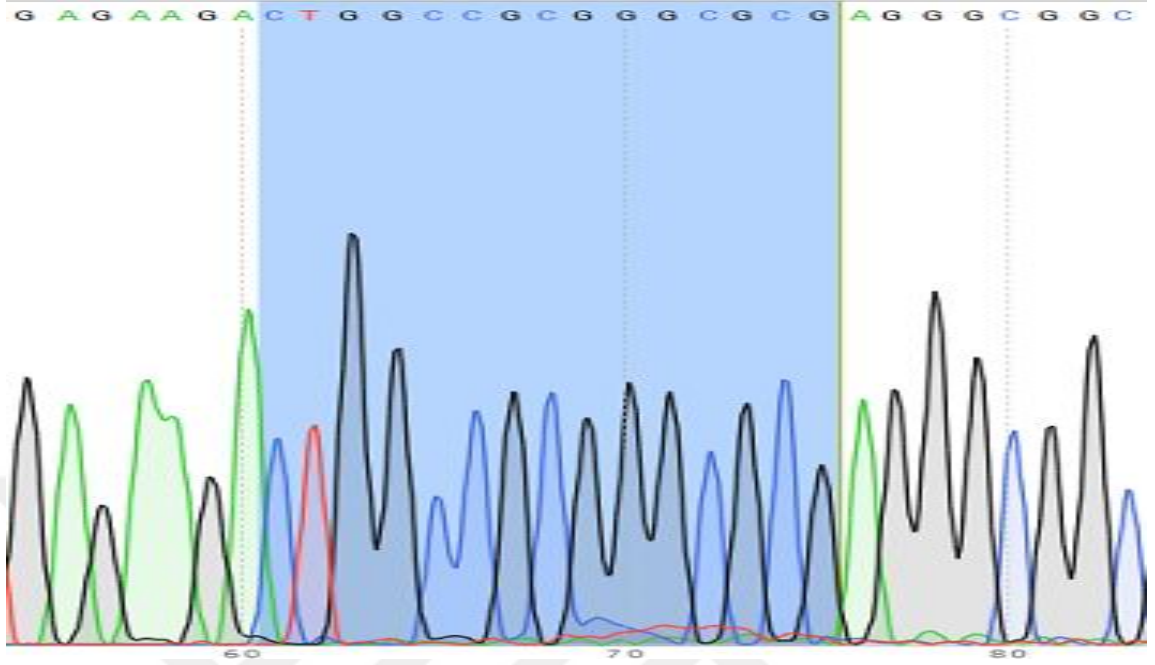
İnsan TNFR1 proteini C-terminal bölgesinde prolince zengin PPAP motifli SH3 bölgesi içeren proteinlerin bağlanma bölgesi olabileceğinden prolin kodlayan kodonları SH3

bölgesini bozacak fakat başka hiçbir yapısal değişikliğe yol açmayacağını düşündüğümüz bir aminoasit olan alanin (A) kodlayan kodonlara çevrildi. PPAP bölgesinin TNFR1 sinyal iletimi üzerinde rolü olup olmadığını anlayabilmek adına; PPAP motifini kodlayan “**CCG CCC GCG CCC**” dizisi “**GCG CCC GCG GCC**” dizisine çevrilerek “PPAP” motifinin “APAA” kodlamasını sağladık. Bunu gerçekleştirmek için, bölgeye spesifik primerler ve daha önce Derya Özeş tarafından pcDNA3.1A vektörü kullanılarak yaratılmış insan TNFR1 ekspresyon vektörü kullanılmıştır.

Bölge özgül mutasyon (site-directed-mutagenesis-SDM) yöntemini kullanarak yarattığımız vektörün ilgili bölgesi Sanger dizileme ile dizilendiğinde elde ettiğimiz mutant plazmiddeki değişimler aşağıda gösterilmiştir (**Şekil 4.2**).



Yabani tip TNFR1 proteini



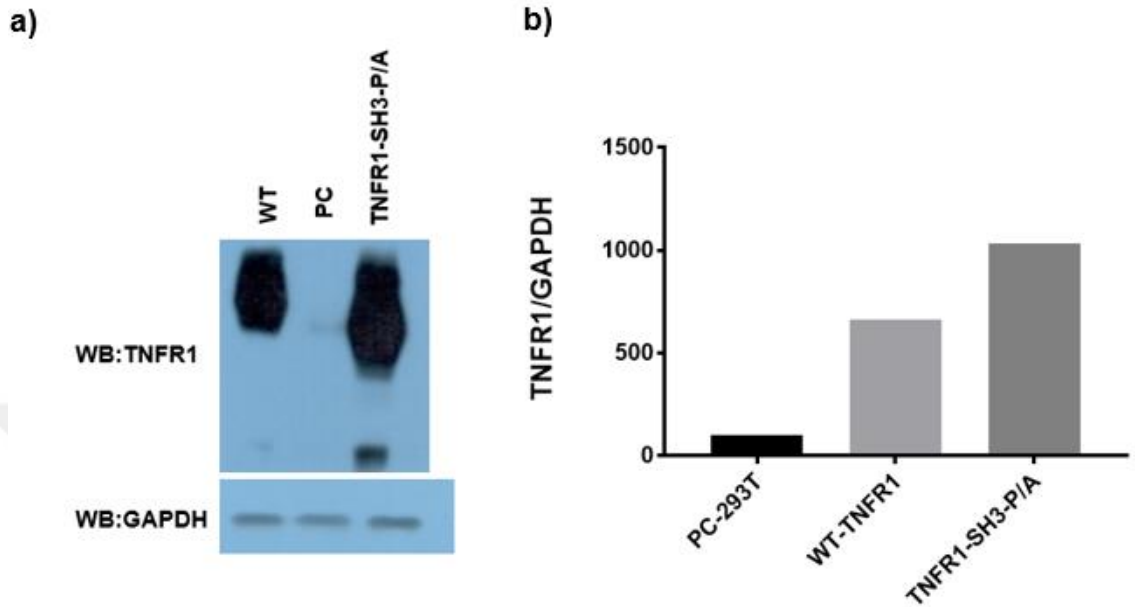
TNFR1-SH3-P/A mutantı reverse dizi CCG>GCG ve CCC>GCC

Şekil 4.2. TNFR1 proteini üzerinde gerçekleştirilen mutasyonun veri tabanı analizi ile doğrulanması
İlk görüntüde pcDNA3.1A plazmidi içerisine klonlanmış yabancı tip TNFR1 proteininin sekans analiz görüntüsü verilmiştir. İkinci görüntüde ise mutasyon yaratılan aminoasitler analiz sonucu ile doğrulanmıştır.

4.3. Yabancı Tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A Mutantının 293T Hücrelerinde Ekspresyonunun Gösterilmesi

SDM yöntemi ile oluşturulan mutant plazmidin, özellikle C-terminal bölgesinde yer aldığını göz önünde bulundurularak sentezin gerçekleştiğini göstermek ve 293T hücrelerinde ekspresyon sağladığını ortaya çıkarmak amacıyla CaPO₄ yöntemiyle transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra lizatlar toplanarak, western blot yöntemiyle TNFR1 antikoru ile ve demirbaş protein olarak da GAPDH ile işaretleme gerçekleştirildi. (Şekil 4.3a).

Aşağıda görüldüğü gibi, mutant proteinimizin ekspresyonu yabancı tip TNFR1'den daha fazla gerçekleşmiştir. Bu durum, mutant proteinimizin mRNA'sının daha yüksek oranda translasyona uğramasının bir sonucu olabileceği gibi, mutant proteinin konformasyonunda meydana gelen değişimden dolayı mutant proteinin parçalanmasının daha yavaş olmasından da kaynaklanıyor olabilir (Şekil 4.3b).



Şekil 4.3. TNFR1-SH3-P/A mutantının 293T hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi. a) Boş vektör pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant vektörleri ile 293T hücrelerinde kalsiyum fosfat yöntemiyle transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra Triton-X liziz tamponuyla lizatlar toplanarak protein konsantrasyonları belirlendikten sonra eşit protein miktarı olacak şekilde hazırlanan örnekler, %10 poliakrilamid jelde yürütüldü ve PVDF membrana transferi sağlanarak TNFR1 antikoru ile işaretlendi. Strip-off işlemi gerçekleştirilen membran ormalizasyon sağlamak adına GAPDH antikoru ile işaretlendi. WT: Yabancı tip TNFR1, PC: Boş vektör pcDNA3.1A, WB: Western Blot **b)** TNFR1 ve GAPDH bant ışımalarının Image J programı kullanılarak değerleri hesaplandı. Ardından, TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A bantlarının Image J değerleri bunların GAPDH değerlerine bölünerek normalizasyon sağlanmış ve GraphPad Prism programında grafik oluşturulmuştur.

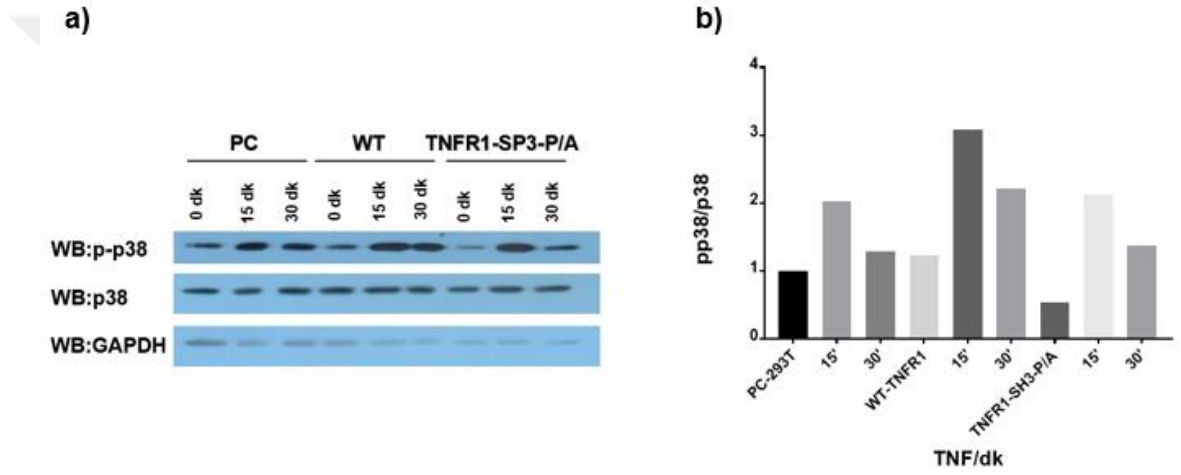
4.4. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α Aracılı p38 Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

TNF- α -aracılı p38 aktivasyonunun 15. Dakikadan itibaren başlayarak 60. Dakikada sinyalin kaybolduğu bilinmektedir (Hapil, 2017, Ref No:455120).

Yaratmış olduğumuz mutant TNFR1'in ektopik ekspresyonunun TNF- α -aracılı p38 aktivasyonunu nasıl etkilediğini göstermek için; pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A vektörlerinin 8 mikrogramını 293T hücrelerine transfekte edip hücrelerin bu proteinleri 48 saat eksprese etmesini sağladıktan sonra, 24 saat boyunca serumsuz ortamda inkübe edildi. Ardından 1 saat fosfataz inhibitörü olan Na_3VO_4 ile inkübasyonu sağlanan hücreler; 0, 15 ve 30 dakika boyunca TNF- α muamelesine tabi tutuldu. Süre sonunda liziz tamponuyla lizatlar toplandı ve %10 poliakrilamid jelde protein konsantrasyonu belirlenmiş örnekler 100 μg yüklenerek yürütüldü. Öncelikle

fosfo-p38 (p-p38) antikoruyla işaretlenen membran, strip-off işlemi yapılarak ardından p38 antikoruyla işaretlendi. Tekrar aynı membrana kısa süreli strip-off işlemi uygulayarak GAPDH antikoru ile işaretleme yapıldı ve normalizasyon sağlandı (Şekil 4.4a).

Aşağıda gösterildiği gibi mutant TNFR1-SH3-P/A vektörünün ekspresyonunun sağlandığı hücrelerde TNF- α -aracılı p38 fosforilasyonunun yabancı tip TNFR1 ekspresyonunun sağlandığı hücelere göre %40 oranında baskılandığı görülmektedir (Şekil 4.4b).



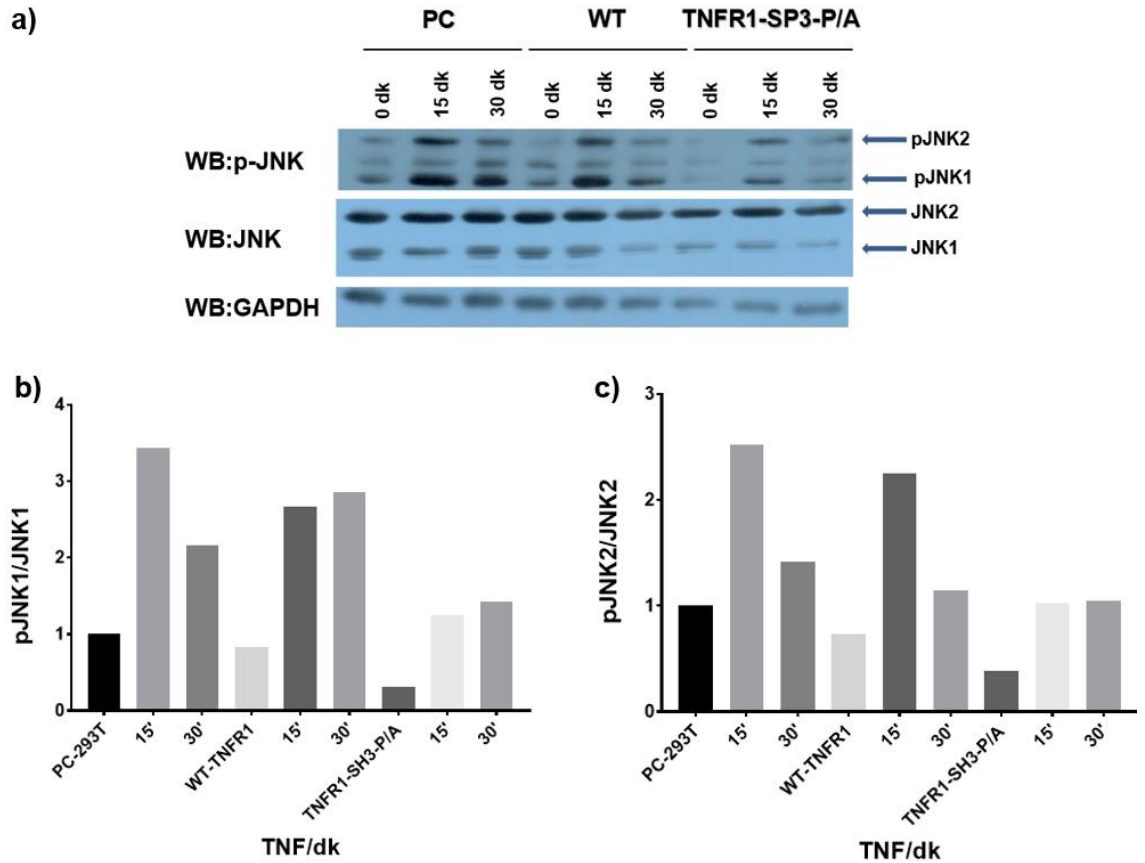
Şekil 4.4. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı p38 Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi. 293T hücrelerine transfekte edilen pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant vektörlerinin farklı zamanlarda TNF- α muamelesi ile toplanan lizatlar sonucunda p-p38 ve p38 işaretlemleri gösterilmiştir. Aynı membran üzerinde strip-off yapılarak GAPDH antikoru ile işaretleme gerçekleştirilmiştir.(a). Image J kullanılarak yapılan tarama ile elde edilen p-38 değerleri p38 değerlerine bölünerek p-p38 indüksiyonunun kaç kat olduğu belirlenmiştir (b).

4.5. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α Aracılı JNK Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

TNF- α -aracılı JNK1/2 aktivasyonunun 30. dakikada en üst seviyeye çıkıp bu zamandan itibaren azalmaya başladığı bilinmektedir (Hapil, 2017, Ref No:455120). Yaratmış olduğumuz mutant TNFR1'in ektopik ekspresyonunun TNF- α -aracılı pJNK1/2 aktivasyonunu nasıl etkilediğini göstermek için boş vektör, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A vektörlerinin 8 mikrogramını 293T hücrelerine transfekte edip hücrelerin bu proteinleri 48 saat eksprese etmesini sağladıktan sonra, hücreler 24 saat boyunca serumsuz ortamada inkübe edilmişlerdir. Ardından 1 saat fosfataz inhibitörü olan Na₃VO₄ ile

inkübasyonu sağlanan hücreler; 0, 15 ve 30 dakika boyunca TNF- α muamelesine tabi tutuldu. Süre sonunda liziz tamponuyla lizatlar toplandı ve %10 poliakrilamid jelde protein konsantrasyonu belirlenmiş örnekler 100 μ g yüklenerek yürütüldü. Öncelikle fosfo-JNK1/2 antikoruyla işaretlenen membran, strip-off işlemi yapılarak ardından JNK1/2 antikoruyla işaretlendi. Tekrar aynı membrana kısa süreli strip-off işlemi uygulayarak GAPDH antikoru ile işaretleme yapıldı ve normalizasyon sağlandı (Şekil 4.5a).

Aşağıda gösterildiği gibi mutant TNFR1-SH3-P/A vektörünün ekspresyonun sağlandığı hücrelerde TNF- α -aracılı JNK1/2 fosforilasyonunun yabancı tip TNFR1 ekspresyonu yapan hücrelere göre 3 kata yakın oranda baskılandığı görülmektedir. (Şekil 4.5b ve Şekil 4.5c).



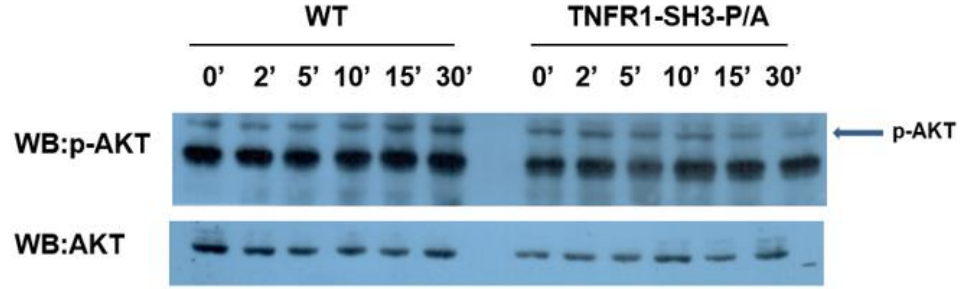
Şekil 4.5. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı JNK Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi. 293T hücrelerine transfekte edilen pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant vektörlerinin farklı zamanlarda TNF- α muamelesi ile toplanan lizatlar sonucunda p-JNK ve JNK işaretlemeleri gösterilmiştir. Aynı membran üzerinde strip-off yapılarak GAPDH antikoru ile işaretleme gerçekleştirilmiştir (a). Image J kullanılarak yapılan tarama ile elde edilen pJNK1/2 değerleri JNK1/2 değerlerine bölünerek pJNK1/2 indüksiyonunun kaç kat olduğu belirlenmiştir (b,c).

4.6. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α Aracılı AKT Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

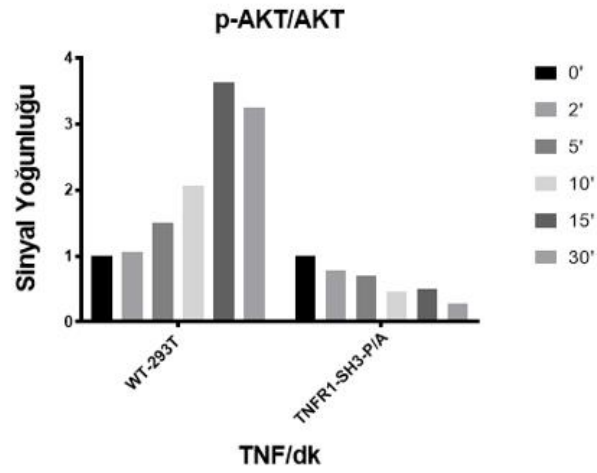
TNF- α -aracılı AKT aktivasyonunun 30. dakikada en üst seviyeye çıkıp bu zamandan itibaren azalmaya başladığını bilinmektedir (Hapil, 2017, Ref No:455120). Yaratmış olduğumuz mutant TNFR1'in ektopik ekspresyonunun TNF- α -aracılı AKT aktivasyonunu nasıl etkilediğini göstermek için pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A vektörlerinin 8 mikrogramı 293T hücrelerine transfekte edilip hücrelerin bu proteinleri 48 saat eksprese etmesini sağlandı. Ardından, hücreler 16 saat boyunca serumsuz ortamda inkübe edildi. Ardından 1 saat fosfataz inhibitörü olan Na_3VO_4 ile inkübasyonu sağlanan hücreler; 0, 15 ve 30 dakika boyunca TNF- α muamelesine tabi tutuldu. Süre sonunda liziz tamponuyla lizatlar toplandı ve %10 poliakrilamid jelde protein konsantrasyonu belirlenmiş örnekler 100 μg yüklenerek yürütüldü. Öncelikle fosfo-JNK1/2 antikoruyla işaretlenen membran, strip-off işlemi yapılarak ardından JNK1/2 antikoruyla işaretlendi. Tekrar aynı membrana kısa süreli strip-off işlemi uygulayarak GAPDH antikoru ile işaretleme yapıldı ve normalizasyon sağlandı (**Şekil 4.6a**).

Aşağıda gösterildiği gibi TNF- α muamelesi ile 5. dakikadan itibaren fosforile olmaya başlayan AKT sinyali, 15. dakikaya kadar artan bir grafik ortaya sererek 30. dakikada maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Mutant plazmid ile yabancı tip TNFR1 0. dakikada eşit sinyali verirken, TNFR1-SH3-P/A mutantı ile transfekte edilmiş hücrelerde TNF- α muamelesi Akt aktivasyonuna yol açamamaktadır. Dolayısıyla TNFR1-SH3-P/A mutantı hem Akt aktivasyonuna yol açamamakta, hem de endojen TNFR1 aracılığıyla gerçekleşen Akt aktivasyonunu da 2.5 kat baskılar görünmektedir (**Şekil 4.6b**).

a)



b)



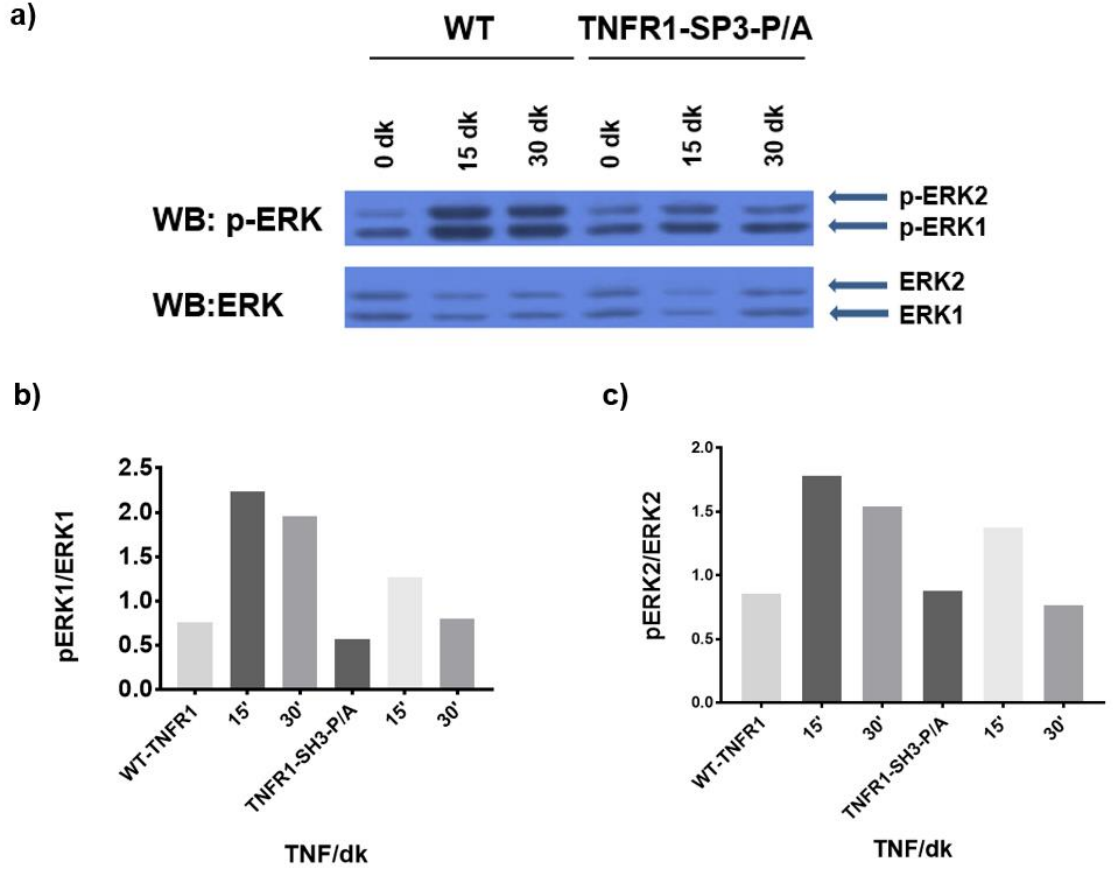
Şekil 4.6. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı AKT Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi. 293T hücrelerine transfekte edilen pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant vektörlerinin farklı zamanlarda TNF- α muamelesi ile toplanan lizatlar sonucunda pAKT ve AKT işaretlemeleri gösterilmiştir. Aynı membran üzerinde strip-off yapılarak GAPDH antikoru ile işaretleme gerçekleştirilmiştir.(a). Elde edilen Image J kullanılarak yapılan tarama ile elde edilen pAKT değerleri, AKT değerlerine bölünerek pAKT indüksiyonunun kaç kat olduğu belirlenmiştir (b) .

4.7. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α Aracılı ERK Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

TNF- α -aracılı ERK aktivasyonunun 15. dakikada en üst seviyeye çıkıp bu zamandan itibaren azalmaya başladığını biliyoruz (Hapil, 2017, Ref No:455120). Yaratmış olduğumuz mutant TNFR1'in ektopik ekspresyonunun TNF- α -aracılı ERK aktivasyonunu nasıl etkilediğini göstermek için TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A vektörlerinin 8 mikrogramını 293T hücrelerine transfekte edip hücrelerin bu proteinleri

48 saat eksprese etmesini sağladıktan sonra, hücreler 24 saat boyunca serumsuz ortamda inkübasyonu sağlandı. Ardından 1 saat fosfataz inhibitörü olan Na_3VO_4 ile inkübasyonu sağlanan hücreler; 0, 15 ve 30 dakika boyunca TNF- α muamelesine tabi tutuldu. Süre sonunda liziz tamponuyla lizatlar toplandı ve %10 poliakrilamid jelde protein konsantrasyonu belirlenmiş örnekler 100 μg yüklenerek yürütüldü. Önce fosfo-ERK antikoruyla işaretlenen membran, strip-off işlemi yapılarak ardından ERK antikoruyla işaretlendi. Tekrar aynı membrana kısa süreli strip-off işlemi uygulayarak GAPDH antikoru ile işaretleme yapıldı ve normalizasyon sağlandı (Şekil 4.7a).

Aşağıda gösterildiği gibi TNF- α muamelesi ile 15 ve 30.cu dakikalarda benzer seviyede ERK fosforilasyonuna sebep olmaktadır. Buna karşın TNFR1-SH3-P/A mutantı ile transfekte edilmiş hücrelerde TNF- α muamelesi sonunda elde edilen ERK aktivasyonu yabancıl tip TNFR1 ekspresyonu yapan hücelere göre %50 oranında azalmıştır (Şekil 4.7b).

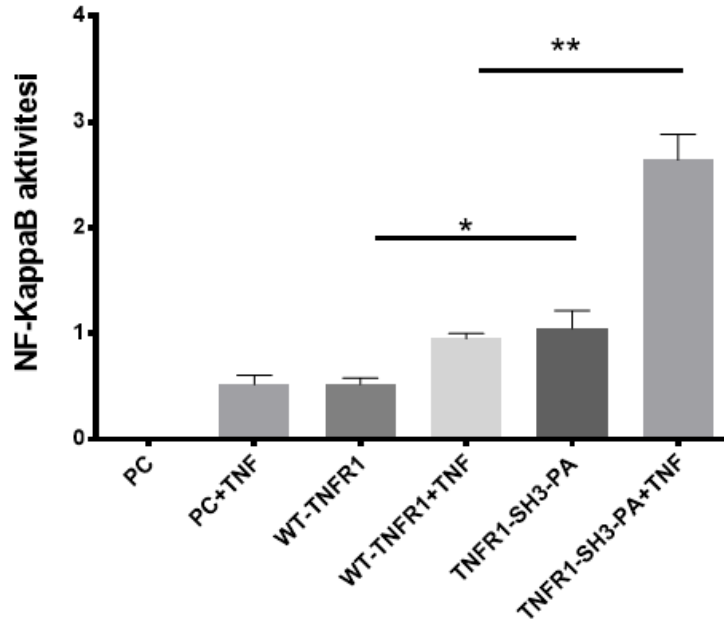


Şekil 4.7. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı ERK Aktivasyonuna olan Etkisinin Belirlenmesi. 293T hücrelerine transfekte edilen pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant vektörlerinin farklı zamanlarda TNF- α muamelesi ile toplanan lizatlar sonucunda pERK ve ERK işaretlemeleri gösterilmiştir (a). Aynı membran üzerinde strip-off yapılarak GAPDH antikoru ile işaretleme gerçekleştirilmiştir.(a). Image J kullanılarak yapılan tarama ile elde edilen pERK değerleri ERK değerlerine bölünerek pERK indüksiyonunun kaç kat olduğu belirlenmiştir (b) .

4.8. TNFR1-SH3-P/A Mutantının NF-kB Aktivasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

TNFR1-SH3-P/A mutantının NF-kB aktivasyonuna olan etkisinin belirlenmesi için pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant plazmidlerinin 300 nanogramı ve NF-kB-Lusiferaz reporter plazmidinin 150 nanogramı eş zamanlı olarak ters transfeksiyon (reverse transfection) yöntemi ile Lipofektamin-2000 (Thermo Fisher Cat. 18324012) ajanı kullanımı ile 293T hücrelerine transfekte edilmiştir. 293T hücreleri bu plazmidlerle 48 saat inkübe edildikten sonra besiyeri değiştirilmiş ve serumsuz besiyerinin ilavesinin ardından TNF- α verilmiş ve 6 saat sonra Lusiferaz aktivitesi Luminometrede (Fluoroskan Ascent) ölçülmüştür.

Lusiferaz aktivitesi ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, pcDNA3.1A ile transfekte edilen hücrelerde hiç NF-kB aktivitesi gözlenmezken, aynı hücrelerde TNF- α muamelesi ile Lusiferaz aktivitesi elde edilmiş ve bu aktivite TNFR1 transfekte edilen hücrelerde daha da artmıştır. Dikkat çekecek bir şekilde mutant plazmid ile transfekte edilmiş hücrelerde TNF- α yokluğunda bile yüksek Lusiferaz aktivitesi saptanmış ve bu hücrelerde TNF- α verildiğinde yabancı tip TNFR1 ekspresyonu gösteren hücrelere oranla 3 kat daha fazla Lusiferaz aktivitesi elde edilmiştir. Bu sonuç PPAP motifini kullanan faktörlerin aslında NF-kB indüksiyonunu engellediğini göstermektedir (**Sekil 4.8**).



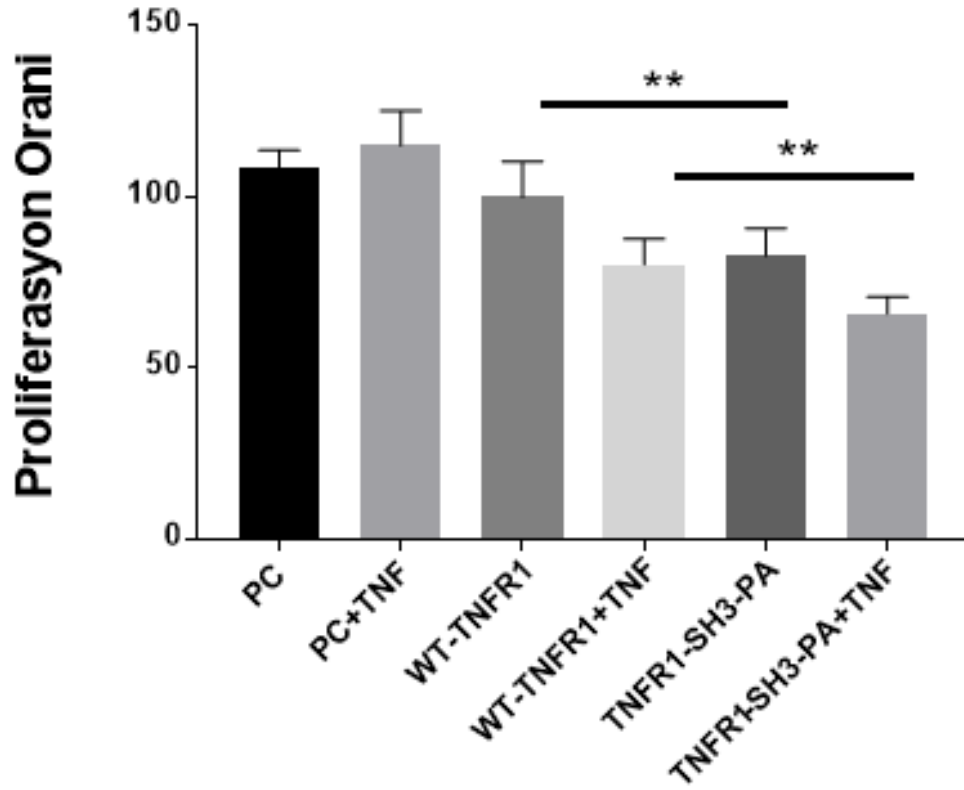
Şekil 4.8. TNFR1-SH3-P/A Mutantının TNF- α aracılı NF-KappaB Aktivasyonuna Olan Etkisi. Lusiferaz aktivitesi sonucu Fluroskan Ascent Luminometre ile ölçüldü ve sonuçlar GraphPad Prism programı kullanılarak grafiğe döküldü.

4.9. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Hücre Proliferasyonuna Olan Etkisinin Belirlenmesi

Boş vektör, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant vektörlerinin hücre proliferasyonuna olan etkisini ve NF-kB aktivasyonu sonuçlarının değerlendirilmesi adına MTT analiz testi uygulandı. MTT (Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium kimyasalı tetrazolyum bileşikleri içerir ve tetrazolyum halkası aktif mitakondri tarafından parçalanarak renk değişimini ortaya çıkarır. Canlılık gösteren hücreleri belirlemek amacıyla kullanılan MTT testi ile yaşam faaliyeti göstermeyen hücrelerde renk değişimi gözlenmeyeceği literatürde gösterilmiştir ((Mosmann, 1983 #233), (Niles, Moravec ve ark. 2009)).

Lipofektamin-2000 ajanı kullanılarak boş vektör, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A mutant plazmidlerinin 300 nanogramı ters transfeksiyon (reverse transfection) işlemine tabi tutuldu. Transfeksiyon işleminin ardından 48 saat inkübe edilen hücreler, 10 ng/ml konsantrasyonda TNF- α ile muamele edildikten sonra 24 saat inkübe edilerek MTT işlemi gerçekleştirildi.

MTT analizi sonucu ortaya çıkan sonuçlarda, yabancı tip TNFR1 ekspresyonu sağlanan hücrelerde, pcDNA3.1A transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelere göre azalan bir proliferasyon ortaya çıkmaktadır. TNF- α verilen boş vektörün hücre canlılığına olan etkisine göre oranlandığında TNFR1 transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelerde TNF- α ilavesi hücre canlılığının azaldığı ve bu etkinin TNFR1-SH3-P/A transfeksiyonu yapılmış hücrelerde daha da azaldığı gözlenmektedir (**Şekil 4.9**).



Şekil 4.9. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi. Hücreler kuyucuk başına eşit sayıda ve 6 tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. 25 μ l MTT solüsyonu ile 4 saat süresince 37 °C’de ve %5 CO₂’li ışısız ortamda inkübe edilen hücreler; süre sonunda 100 μ l DMSO ile çözdürülerek spektrofotometrik cihazda ölçümler yapıldı. Sonuçlar GraphPad Prism programı kullanılarak grafiklendirilmiştir. PC: Boş vektör pcDNA3.1A, WT-TNFR1: Yabancı Tip TNFR1

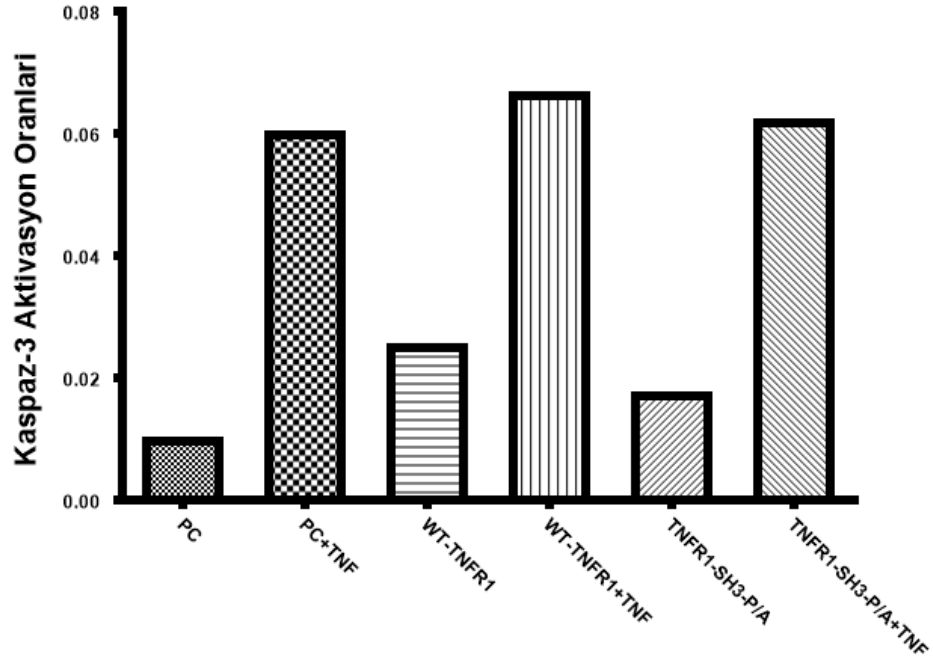
4.10. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 Aktivasyonlarına Olan Etkisinin Belirlenmesi

TNFR1 reseptörünün hücre içindeki en önemli görevlerinden biri olan apoptoz indüksiyonunu TNFR1-SH3-P/A mutant vektörünün nasıl etkilediğini araştırmak

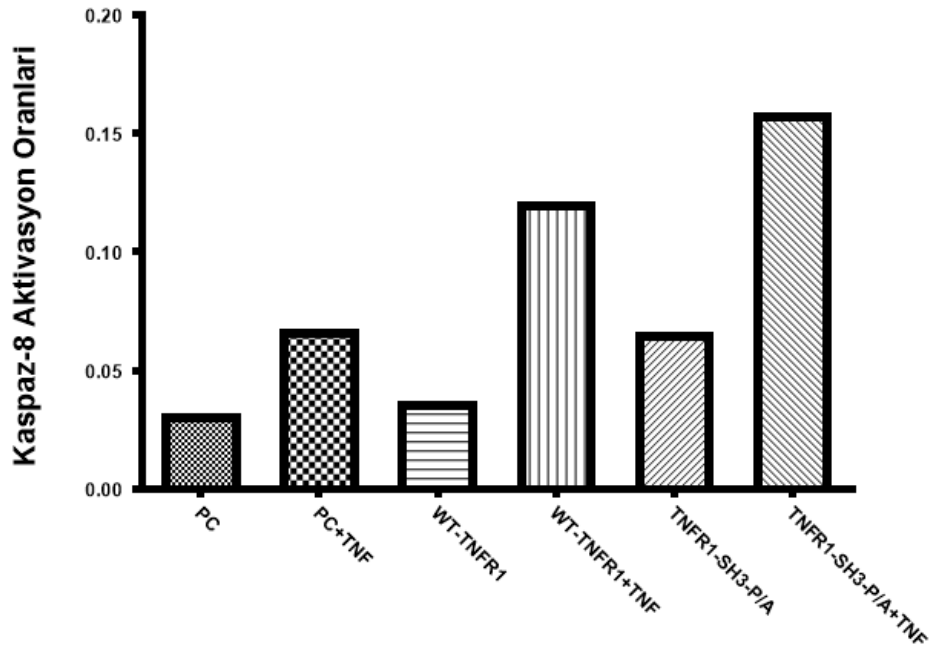
amacıyla; 293T hücrelerine pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 ve TNFR1-SH3-P/A plazmidlerinin 300 nanogramı ters transfeksiyon yöntemi ile transfekte edildikten 48 saat sonra, deney düzeneğine göre belirlenen 96-well kuyucuklara 10 ng/ml final konsantrasyonunda TNF- α ilave edilmiş ve hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda lizatlar toplanarak, DEVD-pNA (kaspaz-3) ve IETD-pNA (kaspaz-8) etiketli substratlar kullanılarak 3.16 konu başlığı altında anlatıldığı gibi kolorimetrik kitler ile proteolitik kırılma sağlanmıştır.

Kaspaz-3 kolorimetrik deneyi; peptid substrat asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'in (Ac-DEVD-pNA) kaspaz-3 ile hidrolizi, p-nitroanilin (pNA) parçasının serbest kalmasıyla sonuçlanır. Kaspaz-8 kolorimetrik deneyi; peptid substrat Asetil-Ile-Glu-Thr-Asp p-nitroanilin (Ac-IETD-pNA) kaspaz-8 tarafından hidrolizine dayanır. Analiz, etiketli substratlar DEVD-pNA ve IETD-pNA'dan ayrıldıktan sonra kromofor p-nitroanilinin (pNA) spektrofotometrik tespitine dayanmaktadır.

Elde edilen sonuçlar analiz edildiğinde; kaspaz-3 aktivasyonu pcDNA3.1A, yabancı tip TNFR1 transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücrelere göre daha az seviyededir ve TNF- α ilavesi ile yüksek oranda artış göstermektedir. TNF- α varlığında kaspaz-3 aktivasyon seviyeleri beklenen şekilde artışa yol açmaktadır. TNFR1-SH3-P/A mutantının kaspaz-3 aktivasyon profili yabancı tip TNFR1'e benzer şekildedir (**Şekil 4.10**). Kaspaz-8 aktivasyon grafiğine baktığımızda ise TNFR1-SH3-P/A mutantı, yabancı tip TNFR1'e göre daha yüksek seviyede kaspaz-8 aktivasyonu sağlasa da sonuçlar benzerlik göstererek korelasyon sağlamaktadır (**Şekil 4.11**).



Şekil 4.10. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Kaspaz-3 Aktivasyonuna olan Etkisi. Sonuçlar 405 nm absorbansta spektrofotometrik ölçümler ile ortaya konmuştur.



Şekil 4.11. TNFR1-SH3-P/A Mutantının Kaspaz-8 Aktivasyonuna olan Etkisi. Sonuçlar 405 nm absorbansta spektrofotometrik ölçümler ile ortaya konmuştur.

5. TARTIŞMA

TNF- α , inflamatuvar yanıtlara ve doğal immüniteye aracılık eden öncü bir sitokindir. TNF- α ; kanser, sepsis, romatoid artrit, diyabet ve inflamatuvar bağırsak hastalığı dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (Parameswaran and Patial 2010). TNF- α 'nın etkilerine aracılık eden mekanizmalar yoğun olarak incelenmiştir. TNF- α tarafından aktive edilen ana yollar arasında kaspazlar, NF-kB ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAP kinazlar) bulunur. Bu sinyal yolları arasındaki fonksiyonel etkileşim, TNF- α yanıtlarının fizyolojik sonucunu belirleyebilir. Gerçekten de, TNF- α sinyalizasyon ağının anlaşılmasını sağlamak için bir sistem biyolojisi yaklaşımı gereklidir. Bu ağ cevabı, TNF- α 'nın reseptörü aracılığıyla dolaylı olarak TGF-alfa (Transforming Growth Factor-alfa), IL-2 (İnterleukin 2), IL-1 α gibi otokrin kaskadı olarak uyardığı hücre dışı sinyallerin ekspresyonunda yer aldığı bulgusuyla daha da karmaşık hale gelmektedir (Janes, Gaudet ve ark. 2006). TNF- α sinyalinin bu iki yönlü yapısı, TNF- α sinyalinin biyokimyasal analizini zorlaştırır. Örneğin, TNF- α tarafından aktive edilen MAP kinazlar, hedef hücreler tarafından TNF- α 'nın ekspresyonunun artmasına neden olur. Sonuç olarak, MAP kinazlar TNF- α sinyalinin yukarı ve aşağı akışında işlev görür (Sabio and Davis 2014). ERK sinyali inhibisyonunun TNF- α üretimini azalttığı gösterilmiştir (Trotta, Kanakaraj ve ark. 1996). ERK1 ve ERK2 yollarının transkripsiyonel (Hoffmeyer, Grosse-Wilde ve ark. 1999) ve post-transkripsiyonel olarak sitokin üretimi düzenlenmesinde işlevi büyüktür.

TNF- α reseptörlerine bağlanarak işlev gören bir protein olmakla birlikte TNFR1 ile trimerizasyonu sonucu hücrel aktivasyon göstermektedir. TNFR1 proteinin transkripsiyon haritası; tirozin kinazların bağlanma motifleri SH2 bölgesi ve Ras proteinini, Src kinazı ve diğer birçok sinyal yollarının aktivasyonunda görev alan proteinlerin bağlanma motifleri olan SH3 bölgesi içermektedir. Grb2 gibi adaptör proteinleri ve tirozin kinazlar ile etkileşime giren SH3 bölgesinin, TNFR1 sinyalleşmesinde önemli bir işlevsel nokta olduğunu düşünerek çalışmalarımız başlamıştır. TNFR1 proteininin C-karboksi terminalinde bulunan SH3 bölgesindeki, prolin kodlayan aminoasitleri alanine (A) dönüştürerek yarattığımız form TNFR1-SH3-P/A mutanı, 293T embriyonik böbrek hücrelerinde ekspresyon sağlamaktadır. 293T hücrelerine hiçbir gen eklenmemiş boş

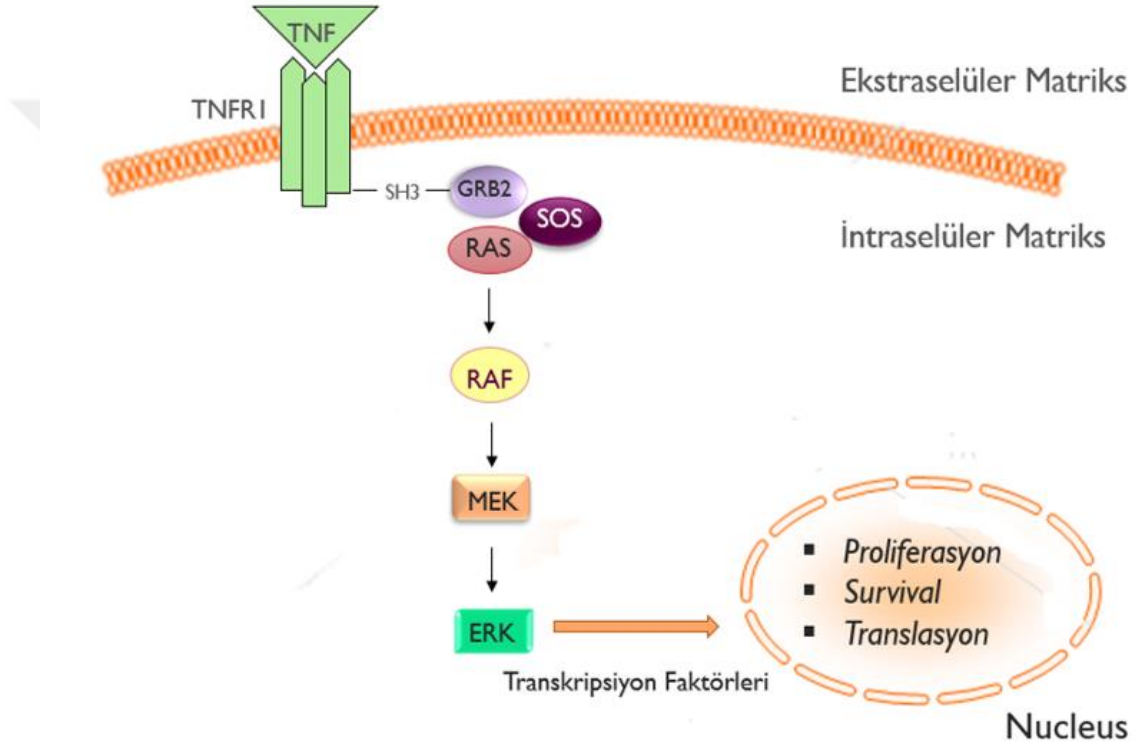
plazmid, TNFR1 sinyalleşmesini gerçekleştiren TNFR1 geni klonlanmış bir plazmid ve mutant form plazmidleri transfeksiyon işlemiyle aktararak sonuçları karşılaştırıldığında, TNFR1-SH3-P/A mutantı, boş plazmide nazaran 10 kat, yabancı tip TNFR1 plazmidine göre neredeyse 2 kat daha fazla aktivasyon göstermiştir (**Şekil 4.3**).

TNFR1-SH3-P/A mutantı TNFR1'in aşırı ekspresyonuna yol açmaktadır. Bant görüntüsündeki konformasyonel değişiklik mutant plazmidimizin post-translasyonel modifikasyonlara uğramış olabileceğini göstermektedir. TNFR1-SH3-P/A mutantının ve yabancı tip TNFR1 plazmidinin ekspresyon bant görüntüsünde 25-30 kDa civarında bir kırılma belirlemektedir. TNFR1 işlevini TACE enzimi ile kırılarak gerçekleştirir ve TNFR1'in TACE aracılı kırılımının sonrasında, γ -Sekretaz tarafından da kırılarak 25 kDa'lık bir ürün oluştuğu gösterilmektedir (Chhibber-Goel, Coleman-Vaughan ve ark. 2016). Dolayısıyla TNFR1-SH3-P/A mutantı TACE aracılı bir kırılıma uğruyor olabilir ve bu görüş TNF'in SH3 bölgesi üzerinden de aktivasyonunu sağladığını düşündürmektedir.

TNF- α aşırı aktivasyonu ile hücre içindeki proteinlerin ekspresyon seviyesi değişeceğinden western blot yöntemiyle AKT, ERK, p-38 ve JNK aktivasyon profillerinin incelenmesi TNFR1 sinyal yolağının nasıl kullanıldığını anlamamızı sağlayacaktır. Bölümümüzde daha önce gerçekleştirilmiş bir doktora tez çalışmasında (TDK-2016-1272) proteinlerin fosforilasyon daikalarının tespiti ile TNFR1 plazmidi ve TNFR1-SH3-P/A mutantı içeren 293T hücrelerini ERK aktivasyonu için 15 ve 30 dakika, p38 ve JNK aktivasyonu için yine 15 ve 30 dakikada fosforile oldukları zamanlarda TNF- α muamelesi gerçekleştirilmiştir. Hipotezimiz esas olarak, SH3 bölgesinin bağlanma partneri olarak adaptör protein Grb2 ve c-Raf1 Kinaz yolaklarındaki sinyalleşmeyi hedef olarak belirlediğini düşünerek, TNF- α -aracılı AKT aktivasyonu erken fosforile zamanlarının ilk dakikalarından başlayarak 30 dakika boyunca sinyalin nasıl değiştiği izlenmiştir.

ERK aktivasyon grafiğini mercek altına alındığında, SH3-P/A mutantı ile transfekte hücrelerde yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelere nazaran daha düşük ERK fosforilasyonu gözlenmiştir. Grb2 proteinin Sos1 (Son of Sevenless 1) ile ERK aktivasyon yolağında önemli bir adaptör proteini olduğu bilinmektedir (Baltensperger, Kozma ve ark. 1993). TNFR1 plazmidinde yer alan SH3 bölgesinin Grb2 proteini için bir bağlanma alanı

olabileceği göz önünde bulundurularak, yaratılan TNFR1-SH3-P/A mutantındaki ERK fosforilasyon sinyalinin azalması hipotezimizle doğru orantılıdır. ERK2 sinyal aktivasyonu ERK1 fosforilasyonuna nazaran daha az etkilenmiştir (**Şekil 4.7**). Dolayısıyla, TNF aracılı ERK1 aktivasyon yolağında TNFR1 SH3 bölgesi ile adaptör proteinler arasındaki etkileşim dikkat çekerken, TNF aracılı ERK2 aktivasyonunda farklı mekanizmalar söz konusu olabilir (**Şekil 5.1**).

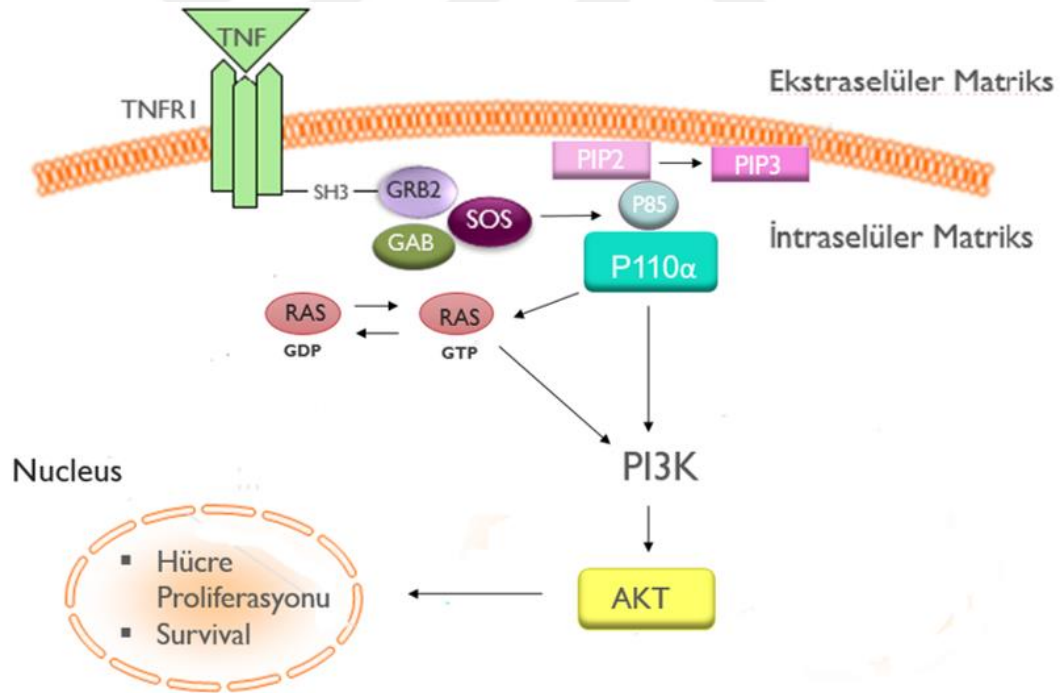


Şekil 5.1. Muhtemel TNFR1-aracılı ERK Sinyalizasyonu

PI3K aktivasyonunun ERK1/2 fosforilasyonundan da sorumlu olduğu göz önünde bulundurularak (Bell, O'Riordan ve ark. 2004) AKT aktivasyon grafiğindeki TNFR1-SH3-P/A mutant plazmidinde gözlenen aktivasyon düşüklüğü (**Şekil 4.6**) dolaylı yoldan ERK fosforilasyonunu da etkiliyor olabilir.

AKT aktivasyon grafiğindeki şaşırtıcı sonuç, TNF- α muamelesi yapılmaksızın yabancı tip TNFR1 ile mutant plazmid TNFR1-SH3-P/A'nın eşit seviyede aktivasyon göstermesi olmuştur. PI3K/AKT sinyal yolunun plazma zarındaki bir reseptör kinaza bağlanmasıyla aktive edildiği sinyalleşmesine alternatif olarak Grb2 proteinin GAB (Grb-2 associated

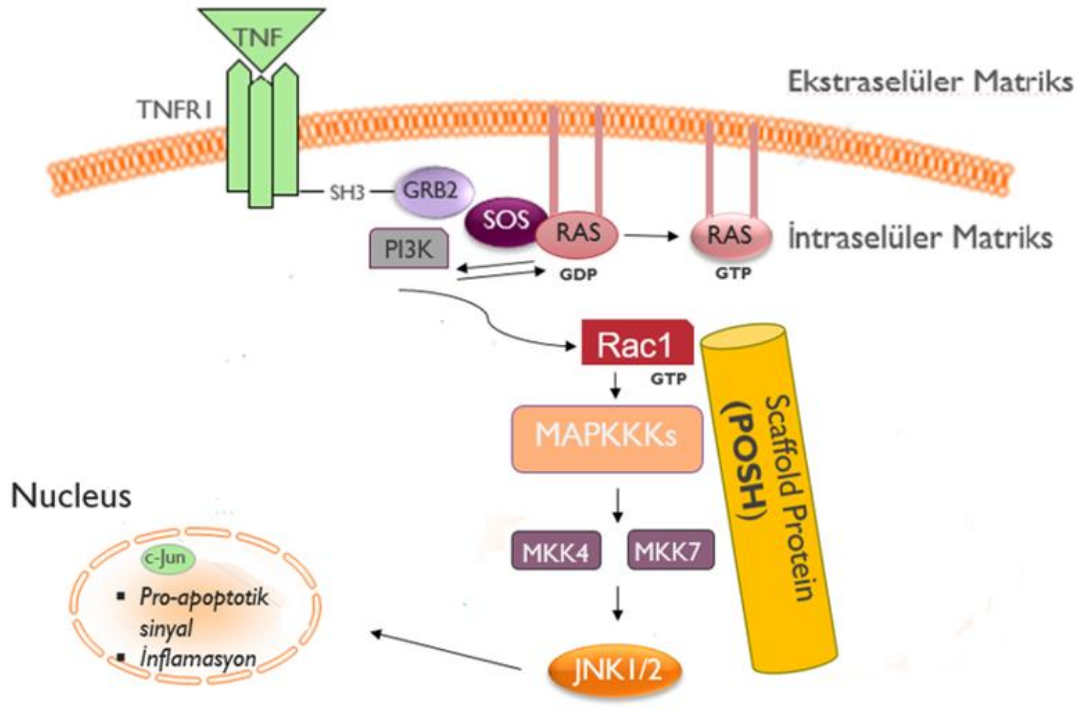
binding protein) ile birlikte PIK3 alt ünitesi olan p85'in aktivasyonunu gerçekleştirdiği bir yolak daha bulunmaktadır (Castellano and Downward 2011). Aynı zamanda PI3K alt ünitelerinden p110 proteinin de Grb2 aracılı Ras aktivasyonu sağlayabildiği bilinmektedir (Hemmings and Restuccia 2012). GPCR (G protein-coupled receptor) protein ilişkili Gα alt ünitesi Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase) bağımlı integrin sinyali oluşturabilir ve bu sinyalleşme de AKT aktivasyonuna yol açar (New, Wu ve ark. 2007). TNFR1-SH3-P/A mutantının TNF-α ile muamelesi sonucu AKT sinyali azalarak kaybolma seviyesine ulaşmaktadır (**Şekil 4.6**). Dolayısıyla, SH3 bölgesine bağlanan proteinlerin bağlanamaması durumunda TNF-α-TNFR1 etkileşimi, AKT aktivasyonundan ziyade AKT yolağının susturulmasına yol açıyor görünmektedir. TNFR1-aracılı AKT sinyal yolu SH3 bağlanma bölgesi içeren Grb2 adaptör proteini veya Src bağımlı olarak aşağı akışında ilerliyor olabilir (**Şekil 5.2**).



Şekil 5.2. Muhtemel TNFR1-aracılı AKT Sinyalizasyonu

Stres faktörü ile aktivasyon gösteren JNK sinyal yolları üzerinden TNFR1 aracılığıyla elde edilen sonuçlar ışığında, JNK1/2 aktivasyonunun baskılandığı tespit edilmiştir (**Şekil 4.5**). JNK kaynaklı nöronal ölüm çalışmalarında POSH (Plenty of SH3s) iskelet

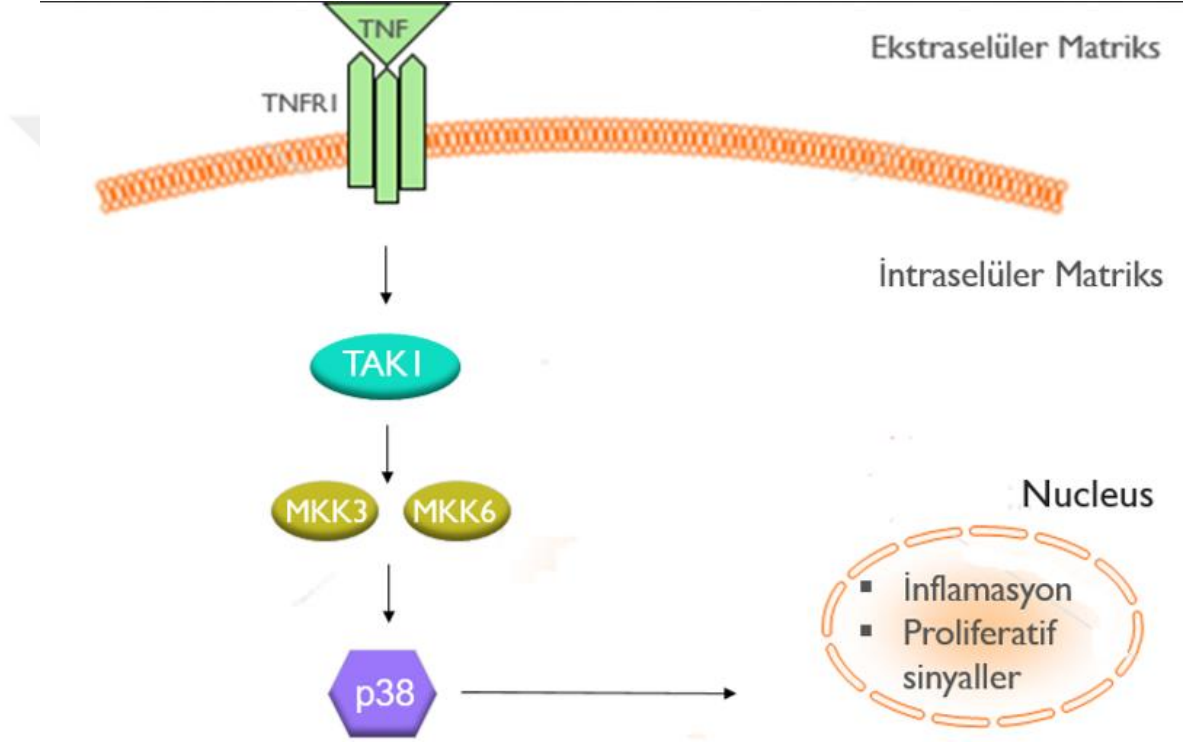
proteininin etkisi MKK4/7 ve JNK1/2 ile ilişkilendirilerek belirlenmiştir (Tapon, Nagata ve ark. 1998, Xu, Kukekov ve ark. 2003). Scaffold proteini POSH'nin JNK yolunun önemli bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir. POSH; Rac1 aktivasyonu için bir bağlanma partneri ve NF-kB ile JNK sinyalleşmesinin aktivatörü olarak tanımlanmıştır (Tapon, Nagata et al. 1998). Elde edilen verilerde, mutant plazmidimizin JNK aktivasyon yolunu baskıladığı göz önüne alınarak; TNF- α -aracılı JNK aktivasyon inhibisyonunun POSH proteinin bağlanma bölgesi engellendiği için gerçekleşiyor olabilir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Muhtemel TNFR1-aracılı JNK Sinyalizasyonu

P38 MAPK ailesi, stres faktörü ve TNF- α dahil olmak üzere inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilir (Cuenda and Rousseau 2007). P38 inhibitörü kullanılan çalışmalarda makrofajlar tarafından üretilen TNF- α seviyesinde düşüş kaydedilmiştir (Lee, Laydon ve ark. 1994). Ayrıca p38 kinazı, NF-kB ekspresyonunu artırır (Carter, Knudtson ve ark. 1999) ve Mitogen and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)'i aktive ederek NF-kB regülasyonu sağlar (Vermeulen, De Wilde ve ark. 2003). Aynı şekilde TNF- α -aracılı TNFR1 trimerizasyonu ile TAK1 fosforilasyonu gerçekleşir ve aktive olan TAK1; IKK α/β , MKK3/6 gibi enzimleri aktive ederek NF-kB ve p38 aktivasyonunu

gerçekleştirir (Kim, Kwak ve ark. 2007, İsraël 2010). SH3 bağlanma bölgesinin TNFR1-aracılı p38 sinyal aktivasyonuna etkilerini belirlemek amacıyla yaptığımız deneylerde; TNFR1-SH3-P/A mutantının transfekte edildiği hücrelerde, yabancı tip TNFR1 transfekte edilen hücrelere nazaran p38 aktivasyonunun baskılandığı gözlenmiştir (**Şekil 4.4**). Dolayısıyla, TNFR1 SH3 bağlanma bölgesine bağlanan proteinler, TAK1 ve MKK3/6 enzimlerinin aktivasyonunda da rol oynuyor olabilir (**Şekil 5.4**).

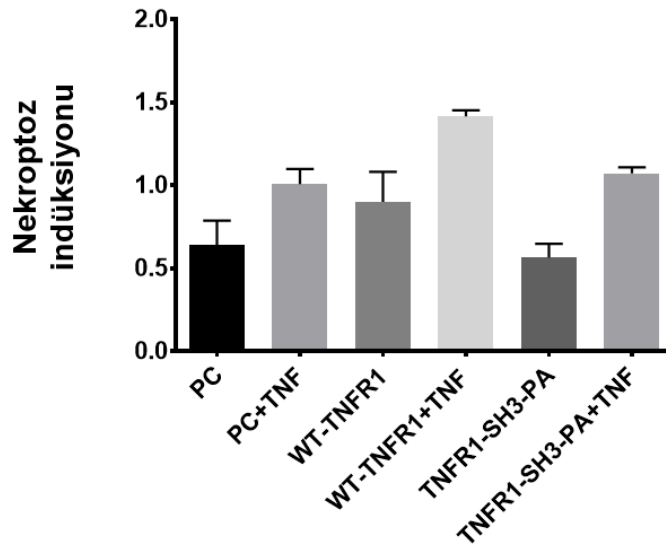


Şekil 5.4. Muhtemel TNFR1-aracılı p38 Sinyalizasyonu

TAK1 enzimi vasıtasıyla aktive olan p38 ve JNK yolaklarının aktivasyonunun baskılanmasına rağmen, TNF- α aracılı NF-kB aktivasyon seviyesi TNFR1-SH3-P/A mutantının transfekte edildiği hücrelerde 2 katının üstünde bir artış göstermektedir (**Şekil 4.8**). Bu sonuç TNFR1-SH3-P/A mutantının kanonik NF-kB yolağını kullanmadığını düşündürülebilir. Kanonik olmayan NF-kB2 yolunda IKK α komplekslerinin fosforilasyonunu sağlayan NIK stabilizasyonu ile NF-kB aktivasyonu gerçekleşmektedir (Sun 2011). SH3 bağlanma bölgesi aracılığıyla fiziksel etkileşimleri susturulan TNFR1-SH3-P/A mutanı ile muamele edilen hücrelerde NF-kB aktivasyonunun arttığı gözlenmektedir. Bu bilgiler ışığında NF-kB aktivasyonunun hücre sağkalımı ile doğru

orantılı olarak arttığı düşünülebilir ancak TNFR1-SH3-P/A mutantı yabancı tip TNFR1 transfekte hücrelere göre daha az bir proliferasyon sergilemektedir (**Şekil 4.9**). Bu sonuç NF- κ B aktivitesindeki artışın hücre proliferasyon hızına bağlı olmadığını kanıtlar niteliktedir.

TNFR1-SH3-P/A mutantının apoptoz indüksiyonuna olan etkilerini araştırmak amacıyla kolorimetrik kitler aracılığıyla gerçekleştirdiğimiz kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyon deneyleri sonucunda; kaspaz-3 aktivitesinin yabancı tip TNFR1'e oranla büyük bir değişim yaratmadığını gözlemlese de (**Şekil 4.10**), kaspaz-8 aktivasyonu yabancı tipe nazaran artış göstermektedir (**Şekil 4.11**). TNFR1-aracılı nekroptoz indüksiyonunun, kaspaz-8 yokluğunda RIP1 ile RIP3 proteinlerinin ripoptozom adı verilen kompleks oluşturarak aktivasyon gerçekleştirdiği bilinmektedir (Wegner, Saleh et al. 2017). Yabancı tip TNFR1'e göre TNFR1-SH3-P/A mutantının kaspaz-8 ativasyonundaki artış ile nekroptoz indüksiyonunun azalabileceğini düşünerek, tez çalışmamızın dışında gerçekleştirilen nekroptoz indüksiyon deneyinde TNFR1-SH3-P/A mutantının transfekte edildiği hücrelerde nekroptoz seviyesinde azalma gözlenmiştir (**Şekil 5.5**). Bu sonuç TNF- α -aracılı kaspaz-8 aktivasyonundaki artış ile apoptoz indüksiyonunun gerçekleştiğini ve kaspaz-8 varlığında nekroptoz inhibisyonunun sağlandığını düşündürülebilir.



Şekil 5.5. TNF- α -aracılı nekroptoz indüksiyonuna TNFR1-SH3-P/A mutantının etkisi

Tez çalışmamızın sonucunda SH3 bağlanma bölgesi interaksyonu engellenen TNFR1'in işlevinde farklılıklar ortaya çıktığını gözlemledik. TNF- α 'nın TNFR1 reseptörü ile gerçekleştirdiği sinyal yollarında gerçekleşen ağ sistemi, TNFR1-SH3-P/A mutantı ile değişikliklere yol açmış ve TNFR1'in işlevini SH3 bağlanma bölgesiyle de gerçekleştirdiğini kanıtlamıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. TNFR1 reseptörü üzerinde, SH3 bölgesi içeren proteinler için bir bağlanma alanı bulunan C-terminalde prolince zengin 'PPAP' konsensüs dizisindeki Prolin aminoasitlerinden ikisi, Alanin (A)'e dönüştürülerek SH3 bağlanma bölgesi barındırmayan TNFR1 mutantları elde edilmiştir.
2. TNFR1 SH3 bölgesi mutantı TNFR1-SH3-P/A'nın, 293T hücrelerinde aşırı ekspresyon sağladığı gösterilmiştir.
3. MAPK ailesi üyeleri hücre dışı sinyallerce düzenlenmiş kinazlar (ERKler), c-Jun NH2-terminal kinazlar (JNKler) ve p38 MAPK'ler TNF- α -aracılı TNFR1 sinyal iletim mekanizmasında SH3 bağlanma bölgesinin engellendiği mutant plazmid ile baskılanmıştır.
4. TNFR1 sinyal iletim mekanizmasında TNF- α stimülasyonu ile PI3K/AKT yolağının aktivasyonu, SH3 bölgesi alanin mutantı tarafından engellenerek baskılanmıştır.
5. TNFR1-SH3-P/A SH3 bölgesi alanin mutantı, TNF- α -aracılı NF-kB aktivasyonunu indüksiyonu sağlamıştır.
6. TNFR1-SH3-P/A mutantının hücre proliferasyonunda azalma olduğu gözlenmiştir.
7. TNFR1-SH3-P/A mutantı Kaspaz-3 aktivasyonunda kayda değer bir farklılık yaratmamıştır ancak TNF- α -aracılı Kaspaz-8 aktivasyonunun artmasını sağlamıştır.

Proteinlerin fosforile olup aktivasyon sağlayabilmeleri başka proteinlerle interaksyona girebilmelerine bağlıdır. Birbirine bağlanan iki protein immünpresipitasyon ve proteinlere spesifik antikorlar kullanılarak western blot aracılığıyla gösterilebilmektedir. TNFR1 bağlanma partnerlerini göstermek amacıyla denatüre edilmemiş lizattan TNFR1 çöktürme işlemi gerçekleştirilir. Bu bilgiler ışığında, TNFR1-SH3-P/A mutantının SH3 bağlanma bölgesi olabileceği göz önüne alınarak ve TNFR1 proteinin işleyiş mekanizmasında bir yol çizmek amacıyla GRB2 (Hildt and Oess 1999) gibi adaptör proteinlerle etkileşime girdiği bilindiğinden c-SRC ve p85 gibi SH3 bağlanma bölgesi bulunduran proteinlerle immünpresipitasyon yöntemi uygulanabilir. Bu sayede TNFR1 proteininin c-SRC, p85 gibi proteinlerle SH3 bölgesi aracılığıyla fiziksel etkileşime girip/girmediğini ve sinyal iletimini hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiği ortaya çıkabilir.

KAYNAKLAR

- Adam, D., ve ark. (1996). "A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway." J Biol Chem **271**(24): 14617-14622.
- Adigun, R. and S. S. Bhimji (2018). Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous). StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing. StatPearls Publishing LLC.
- Aggarwal, B. B. (2000). "Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i6-16.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nature Reviews Immunology **3**: 745.
- Aggarwal, B. B., ve ark. (1985). "Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization." J Biol Chem **260**(4): 2345-2354.
- Aggarwal, B. B., ve ark. (1984). "Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization." J Biol Chem **259**(1): 686-691.
- Amrani, Y., ve ark. (2001). "Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases." Mol Pharmacol **60**(4): 646-655.
- Arnett, H. A., ve ark. (2001). "TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." Nat Neurosci **4**(11): 1116-1122.
- Baker, E., ve ark. (1991). "Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes." Cytogenet Cell Genet **57**(2-3): 117-118.
- Ballara, S., ve ark. (2001). "Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **44**(9): 2055-2064.
- Baltensperger, K., ve ark. (1993). "Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes." Science **260**(5116): 1950-1952.
- Batra-Safferling, R., ve ark. (2010). "Structural studies of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) SH3 domain in complex with a peptide ligand: role of the anchor residue in ligand binding." Biol Chem **391**(1): 33-42.

Bell, K. A., ve ark. (2004). "MAPK recruitment by beta-amyloid in organotypic hippocampal slice cultures depends on physical state and exposure time." J Neurochem **91**(2): 349-361.

Bertrand, M. J., ve ark. (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." Mol Cell **30**(6): 689-700.

Black, R. A., ve ark. (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-733.

Blair, H. A. and E. D. Deeks (2016). "Infliximab Biosimilar (CT-P13; Infliximab-dyyb): A Review in Autoimmune Inflammatory Diseases." BioDrugs **30**(5): 469-480.

Boldin, M. P., ve ark. (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." Cell **85**(6): 803-815.

Brennan, F. M., ve ark. (1989). "Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis." Lancet **2**(8657): 244-247.

Brockhaus, M., ve ark. (1990). "Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(8): 3127-3131.

Bruns, P. (1887). "Die heilwirkung des erysipels auf geschwulste." Beitr Klin Chir **3**(3): 443-466.

Cabal-Hierro, L., ve ark. (2014). "TRAF-mediated modulation of NF-kB AND JNK activation by TNFR2." Cell Signal **26**(12): 2658-2666.

Cantini, F., ve ark. (2017). "Second-line biologic therapy optimization in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis." Semin Arthritis Rheum **47**(2): 183-192.

Carswell, E. A., ve ark. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.

Carter, A. B., ve ark. (1999). "The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP)." J Biol Chem **274**(43): 30858-30863.

Castellano, E. and J. Downward (2011). "RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway." Genes Cancer **2**(3): 261-274.

Chan, F. (2000). The pre-ligand binding assembly domain: A potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function.

Chan, F. K., ve ark. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-2354.

Cheadle, C., ve ark. (1994). "Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library." J Biol Chem **269**(39): 24034-24039.

Chhibber-Goel, J., ve ark. (2016). "gamma-Secretase Activity Is Required for Regulated Intramembrane Proteolysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1 and TNF-mediated Pro-apoptotic Signaling." J Biol Chem **291**(11): 5971-5985.

Coley, W. B. (1891). "II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma." Ann Surg **14**(3): 199-220.

Coley, W. B. (1910). "The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)." Proc R Soc Med **3**(Surg Sect): 1-48.

Cowley, S., ve ark. (1994). "Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells." Cell **77**(6): 841-852.

Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1358-1375.

Cui, X., ve ark. (2002). "Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding." J Clin Invest **110**(4): 515-526.

De Jong, C. N., ve ark. (2017). "Etanercept for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: A single center experience." PLoS One **12**(10): e0187184.

de Vries, H. S., ve ark. (2008). "Serious events with infliximab in patients with inflammatory bowel disease: a 9-year cohort study in the Netherlands." Drug Saf **31**(12): 1135-1144.

Decourt, B., ve ark. (2017). "Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease." Curr Alzheimer Res **14**(4): 412-425.

Derijard, B., ve ark. (1995). "Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms." Science **267**(5198): 682-685.

Dopp, J. M., ve ark. (2002). "Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells." Neurochem Res **27**(11): 1535-1542.

Duh, E. J., ve ark. (1989). "Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5974-5978.

Elliott, M. J., ve ark. (1994). "Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis." Lancet **344**(8930): 1125-1127.

Emmerich, C. H., ve ark. (2013). "Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(38): 15247-15252.

Enari, M., ve ark. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.

Engelman, J. A., ve ark. (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-619.

Escudero-Vilaplana, V., ve ark. (2015). "Efficiency of adalimumab, etanercept and infliximab in ankylosing spondylitis in clinical practice." Int J Clin Pharm **37**(5): 808-814.

Estrada, S., ve ark. (2009). "Pneumocystis jiroveci (carinii) pneumonia following a second infusion of infliximab in a patient with ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(2): 315-316.

Falvo, J. V., ve ark. (2010). "Transcriptional control of the TNF gene." Curr Dir Autoimmun **11**: 27-60.

Fasick, V., ve ark. (2015). "The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression." Neurosci Biobehav Rev **53**: 139-159.

Feldman, S. R., ve ark. (2017). "Cost Per Additional Responder Associated With Ixekizumab and Etanercept in the Treatment of Moderate-to-Severe Psoriasis." J Drugs Dermatol **16**(12): 1246-1252.

Feldmann, M., ve ark. (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol **14**: 397-440.

Ferrari, R. (1999). "The role of TNF in cardiovascular disease." Pharmacol Res **40**(2): 97-105.

Flamant, M., ve ark. (2017). "Golimumab for the treatment of ulcerative colitis." Expert Opin Biol Ther **17**(7): 879-886.

Fong, Y., ve ark. (1989). "Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia." J Exp Med **170**(5): 1627-1633.

Fotin-Mleczek, M., ve ark. (2002). "Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2757-2770.

Fruman, D. A. and G. Bismuth (2009). "Fine tuning the immune response with PI3K." Immunol Rev **228**(1): 253-272.

Fuchs, P., ve ark. (1992). "Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]." Genomics **13**(1): 219-224.

Gizycka, A. and J. Chorostowska-Wynimko (2015). "[Programmed necrosis and necroptosis - molecular mechanisms]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **69**: 1353-1363.

Gonnet-Gracia, C., ve ark. (2008). "Anti-nuclear antibodies, anti-DNA and C4 complement evolution in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis treated with TNF-alpha blockers." Clin Exp Rheumatol **26**(3): 401-407.

Grell, M. (1995). "Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF." J Inflamm **47**(1-2): 8-17.

Grell, M., ve ark. (1998). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1." Eur J Immunol **28**(1): 257-263.

Grell, M., ve ark. (1998). "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 570-575.

Hartley, D., ve ark. (1995). "Specific association of the beta isoform of the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase with the proto-oncogene c-cbl." J Biol Chem **270**(31): 18260-18263.

He, S., ve ark. (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." Cell **137**(6): 1100-1111.

Hemmings, B. A. and D. F. Restuccia (2012). "PI3K-PKB/Akt pathway." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a011189.

Hildt, E. and S. Oess (1999). Identification of Grb2 As a Novel Binding Partner of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor I.

Hildt, E. and S. Oess (1999). "Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I." J Exp Med **189**(11): 1707-1714.

Ho, P. K. and C. J. Hawkins (2005). "Mammalian initiator apoptotic caspases." Febs j **272**(21): 5436-5453.

Hoffmeyer, A., ve ark. (1999). "Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes." J Biol Chem **274**(7): 4319-4327.

Horneff, G., ve ark. (2017). "Experience with etanercept, tocilizumab and interleukin-1 inhibitors in systemic onset juvenile idiopathic arthritis patients from the BIKER registry." Arthritis Res Ther **19**(1): 256.

Hotamisligil, G. S. (1999). "Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(2): 119-125.

Hsu, H., ve ark. (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." Immunity **4**(4): 387-396.

Hsu, H., ve ark. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.

Inanc, N. and H. Direskeneli (2006). "Serious infections under treatment with TNF-alpha antagonists compared to traditional DMARDs in patients with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **27**(1): 67-71.

Irmiler, M., ve ark. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-195.

Irwin, M. W., ve ark. (1999). "Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium." Circulation **99**(11): 1492-1498.

Israël, A. (2010). "The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation." Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**(3): a000158-a000158.

Itai, T., ve ark. (2001). "Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form." Eur J Biochem **268**(7): 2074-2082.

Jackson-Bernitsas, D. G., ve ark. (2007). "Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma." Oncogene **26**(10): 1385-1397.

Jacobsson, L. T., ve ark. (2005). "Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **32**(7): 1213-1218.

Janes, K. A., ve ark. (2006). "The response of human epithelial cells to TNF involves an inducible autocrine cascade." Cell **124**(6): 1225-1239.

Jean, S. and A. A. Kiger (2014). "Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance." J Cell Sci **127**(Pt 5): 923-928.

Jellusova, J. and R. C. Rickert (2016). "The PI3K pathway in B cell metabolism." Critical reviews in biochemistry and molecular biology **51**(5): 359-378.

Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-1912.

Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol **3**(3): 221-227.

Kerr, J. F., ve ark. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Kim, J. Y., ve ark. (2011). "TNFalpha induced noncanonical NF-kappaB activation is attenuated by RIP1 through stabilization of TRAF2." J Cell Sci **124**(Pt 4): 647-656.

Kim, S. I., ve ark. (2007). "TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1471-1478.

Kishimoto, H., ve ark. (2003). "Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells." J Biol Chem **278**(19): 16595-16601.

Koch, C. A., ve ark. (1991). "SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins." Science **252**(5006): 668-674.

Kollias, G., ve ark. (1999). "On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease." Immunol Rev **169**: 175-194.

Kriegler, M., ve ark. (1988). "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." Cell **53**(1): 45-53.

Kurada, B. R., ve ark. (2009). "MADD, a splice variant of IG20, is indispensable for MAPK activation and protection against apoptosis upon tumor necrosis factor-alpha treatment." J Biol Chem **284**(20): 13533-13541.

Lee, J. C., ve ark. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-746.

Lee, R. A. and D. B. Eisen (2015). "Treatment of hidradenitis suppurativa with biologic medications." J Am Acad Dermatol **73**(5 Suppl 1): S82-88.

Lewitzky, M., ve ark. (2001). "The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif." Oncogene **20**(9): 1052-1062.

Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-734.

Liu, H., ve ark. (2000). "TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta." J Immunol **164**(8): 4277-4285.

Liu, Z. G., ve ark. (1996). "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death." Cell **87**(3): 565-576.

Locksley, R. M., ve ark. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.

Madge, L. A. and J. S. Pober (2000). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells." J Biol Chem **275**(20): 15458-15465.

Mahoney, D. J., ve ark. (2008). "Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11778-11783.

Manara, M., ve ark. (2017). "Two-year retention rate of golimumab in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis: data from the LORHEN registry." Clin Exp Rheumatol **35**(5): 804-809.

McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." J Neuroinflammation **5**: 45.

Mease, P., ve ark. (2017). "Tofacitinib or Adalimumab versus Placebo for Psoriatic Arthritis." N Engl J Med **377**(16): 1537-1550.

Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-190.

Miki, K. and E. M. Eddy (2002). "Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain." Mol Cell Biol **22**(8): 2536-2543.

Miscia, S., ve ark. (2002). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells." Cell Growth Differ **13**(1): 13-18.

Mitsiades, C. S., ve ark. (2004). "The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development." Curr Cancer Drug Targets **4**(3): 235-256.

Moreland, L. W. (1999). "Inhibitors of tumor necrosis factor: new treatment options for rheumatoid arthritis." Cleve Clin J Med **66**(6): 367-374.

Munker, R. and P. Koefler (1987). "In vitro action of tumor necrosis factor on myeloid leukemia cells." Blood **69**(4): 1102-1108.

- New, D. C., ve ark. (2007). "G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis." Febs j **274**(23): 6025-6036.
- Niles, A. L., ve ark. (2009). "In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening." Curr Chem Genomics **3**: 33-41.
- Nuti, F., ve ark. (2015). "Adalimumab for the treatment of pediatric Crohn's disease." Expert Rev Clin Immunol **11**(9): 963-972.
- O'Malley, W. E., ve ark. (1962). "Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated With Serratia Marcescens Polysaccharide, and Induced Tolerance." JNCI: Journal of the National Cancer Institute **29**(6): 1169-1175.
- Ozes, O. N., ve ark. (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." Nature **401**(6748): 82-85.
- Papoutsaki, M. and A. Costanzo (2013). "Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis." BioDrugs **27 Suppl 1**: 3-12.
- Parameswaran, N. and S. Patial (2010). "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **20**(2): 87-103.
- Pawson, T. and J. Schlessingert (1993). "SH2 and SH3 domains." Curr Biol **3**(7): 434-442.
- Pincheira, R., ve ark. (2008). "Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity." J Immunol **181**(2): 1288-1298.
- Present, D. H., ve ark. (1999). "Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease." N Engl J Med **340**(18): 1398-1405.
- Raingaud, J., ve ark. (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." Mol Cell Biol **16**(3): 1247-1255.
- Ramanan, A. V., ve ark. (2017). "Adalimumab plus Methotrexate for Uveitis in Juvenile Idiopathic Arthritis." N Engl J Med **376**(17): 1637-1646.
- Rogan, M. P. and K. Thomas (2007). "Fatal miliary Coccidioidomycosis in a patient receiving infliximab therapy: a case report." J Med Case Rep **1**: 79.
- Rutgeerts, P., ve ark. (2005). "Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis." N Engl J Med **353**(23): 2462-2476.

Sabio, G. and R. J. Davis (2014). "TNF and MAP kinase signalling pathways." Semin Immunol **26**(3): 237-245.

Santos, J. C. D., ve ark. (2017). "Impact of biological therapy on body composition of patients with Chron's disease." Rev Assoc Med Bras (1992) **63**(5): 407-413.

Sato, T., ve ark. (1995). "A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40." FEBS Lett **358**(2): 113-118.

Scaffidi, C., ve ark. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." J Biol Chem **274**(3): 1541-1548.

Scheinfeld, N. (2003). "Adalimumab (HUMIRA): a review." J Drugs Dermatol **2**(4): 375-377.

Schievella, A. R., ve ark. (1997). "MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(18): 12069-12075.

Schlessinger, J. (1994). "SH2/SH3 signaling proteins." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 25-30.

Shear, M. J., ve ark. (1943). "Chemical Treatment of Tumors. V. Isolation of the Hemorrhage-Producing Fraction from *Serratia marcescens* (Bacillus prodigiosus) Culture Filtrate1." JNCI: Journal of the National Cancer Institute **4**(1): 81-97.

Shih, V. F., ve ark. (2011). "A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling." Cell Res **21**(1): 86-102.

Smith, R. A. and C. Baglioni (1987). "The active form of tumor necrosis factor is a trimer." J Biol Chem **262**(15): 6951-6954.

Sparks, A. B., ve ark. (1996). "Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1540-1544.

Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res **21**(1): 71-85.

Tanaka, Y., ve ark. (2016). "Evaluation of golimumab for the treatment of patients with active rheumatoid arthritis." Expert Opin Drug Metab Toxicol **12**(3): 319-326.

Tapon, N., ve ark. (1998). "A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways." Embo j **17**(5): 1395-1404.

Tartaglia, L. A., ve ark. (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." Cell **74**(5): 845-853.

Taxonera, C., ve ark. (2017). "Adalimumab Maintenance Treatment in Ulcerative Colitis: Outcomes by Prior Anti-TNF Use and Efficacy of Dose Escalation." Dig Dis Sci **62**(2): 481-490.

Taylor, P. C., ve ark. (2017). "Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis." N Engl J Med **376**(7): 652-662.

Taylor, P. C., ve ark. (2000). "Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(1): 38-47.

Thoma, B., ve ark. (1990). "Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses." J Exp Med **172**(4): 1019-1023.

Thorpe, L. M., ve ark. (2015). "PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting." Nat Rev Cancer **15**(1): 7-24.

Ting, A. T., ve ark. (1996). "RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis." Embo j **15**(22): 6189-6196.

Tokunaga, F., ve ark. (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation." Nat Cell Biol **11**(2): 123-132.

Trotta, R., ve ark. (1996). "Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes." J Exp Med **184**(3): 1027-1035.

Tsai, E. Y., ve ark. (1996). "Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp." Mol Cell Biol **16**(2): 459-467.

Tsuchiya, A., ve ark. "PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway." The Journal of endocrinology **220**(1): 49-59.

Tummers, B. and D. R. Green (2017). "Caspase-8: regulating life and death." Immunol Rev **277**(1): 76-89.

Van Deventer, S. J. (1997). "Immunomodulation of Crohn's disease using TNF-alpha neutralizing monoclonal antibodies." Clin Nutr **16**(6): 271-275.

Vanden Berghe, T., ve ark. (2014). "Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 135-147.

Vandenabeele, P., ve ark. (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714.

Varfolomeev, E., ve ark. (2008). "c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation." J Biol Chem **283**(36): 24295-24299.

Vermeulen, L., ve ark. (2003). "Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)." Embo j **22**(6): 1313-1324.

Vidal, M., ve ark. (2001). "SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents." Crit Rev Oncol Hematol **40**(2): 175-186.

Viemann, D., ve ark. (2004). "Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells." Blood **103**(9): 3365-3373.

Vince, J. E., ve ark. (2009). "TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (tnf) to efficiently activate nf-{kappa}b and to prevent tnf-induced apoptosis." J Biol Chem **284**(51): 35906-35915.

Wagner, M. J., ve ark. "Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling." Cold Spring Harbor perspectives in biology **5**(12): a008987-a008987.

Wajant, H. (2009). "The role of TNF in cancer." Results Probl Cell Differ **49**: 1-15.

Wang, C.-Y., ve ark. (1998). "NF-κB Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation." Science **281**(5383): 1680-1683.

Wang, L., ve ark. (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.

Ware, C. F., ve ark. (1991). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells." J Immunol **147**(12): 4229-4238.

Wegner, K. W., ve ark. (2017). "Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis." Trends Pharmacol Sci **38**(3): 202-225.

Weimer, L. H. and N. Sachdev (2009). "Update on medication-induced peripheral neuropathy." Curr Neurol Neurosci Rep **9**(1): 69-75.

Wong, G. H., ve ark. (1992). "Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type I TNF receptor [corrected]." J Immunol **149**(10): 3350-3353.

Wu, J. J. and W. C. Valdecantos (2017). "Adalimumab in Chronic Plaque Psoriasis: A Clinical Guide." J Drugs Dermatol **16**(8): 779-790.

Xu, D. and R. Nussinov (1998). "Favorable domain size in proteins." Fold Des **3**(1): 11-17.

Xu, Z., ve ark. (2003). "POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis." Embo j **22**(2): 252-261.

Yamanaka, H. (2015). "TNF as a Target of Inflammation in Rheumatoid Arthritis." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **15**(2): 129-134.

Yang, L., ve ark. (2002). "Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways." J Neurosci **22**(8): 3025-3032.

Yao, B., ve ark. (1995). "Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase." Nature **378**(6554): 307-310.

Zarnegar, B., ve ark. (2008). "Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3503-3508.

Zhang, D. W., ve ark. (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." Science **325**(5938): 332-336.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma Ece	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ÇOPUROĞLU	Tel no	05069417715
Doğum tarihi	11/08/1990	e-posta	ececopuroglu@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Hacı Malike ve Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi	2008
Lisans	Ankara Üniversitesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajyer	Akdeniz Üniversitesi- SBAUM	2014-2015

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	72,5
İngilizce	YDS	61,25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1 (TNFR1)'in Sinyal İletim Mekanizmasının Araştırılması	TÜBİTAK	2013-2016
Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1 (TNFR1) SH3 Bağlanma Bölgesinin TNFR1 Sinyal İletimi Üzerine Etkisi	AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ BAP	2016-2018

Yayınlar ve Bildiriler:

Bildiriler:

1. Hapil FZ., Copuroglu FE, Ertosun MG, Ozes ON. *Tyrosine phosphorylation of tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) by Janus Kinase 2 (JAK2) influences TNFR1 signalosome* 41st FEBS Congress, 2016 **Sözlü Bildiri**
2. Hapil FZ., Ertosun MG, Copuroglu FE, Ozes ON. *cAMP activated protein kinase (PKA) plays role in regulation of TNF-induced tumor necrosis factor receptor type I (TNFR1) signaling* 41st FEBS Congress, 2016 **Sözlü Bildiri**

Yayınlar:

Özeş AR, Pulliam N, Ertosun MG, Yılmaz Ö, Tang J, Çopuroğlu E, Matei D, Özeş ON, Nephew KP. *Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates STAT3 activation and oncogenic EZH2 activity*. *Oncogene*. 2018 Jun;37(26):3589-3600.
