T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FARE LOKAL ARTRİT MODELİNDE YANGI SIRASINDA İNDÜKLENEBİLEN İNDOLAMİN-2,3 DİOKSİJENAZ (İDO) GEN AKTARIMININ ETKİSİ

AYŞE ÖZDEN SOYDAŞ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

KASIM 2018


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

FARE LOKAL ARTRİT MODELİNDE YANGI SIRASINDA İNDÜKLENEBİLEN İNDOLAMİN-2,3 DİOKSİJENAZ (IDO) GEN AKTARIMININ ETKİSİ

Ayşe Özden SOYDAŞ

DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KASIM 2018

Ayşe Özden SOYDAŞ tarafından hazırlanan "**FARE LOKAL ARTRİT MODELİNDE YANGI SIRASINDA İNDÜKLENEBİLEN İNDOLAMİN-2,3 DİOKSİJENAZ (İDO) GEN AKTARIMININ ETKİSİ**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/ ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Vedat BULUT
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Başkan: Prof.Dr.Ayşegül ATAK YÜCEL
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye: Prof. Dr. Barbaros ORAL
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Bursa Uludağ Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye: Doç.Dr. Resul KARAKUŞ
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye: Prof.Dr. A.Lale DOĞAN
Temel Onkoloji Anabilim Dalı,
Hacettepe Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 08/11/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayşe Özden SOYDAŞ

08/11/2018

FARE LOKAL ARTRİT MODELİNDE YANGI SIRASINDA İNDÜKLENEBİLEN İNDOLAMİN-2,3 DİOKSİJENAZ (İDO) GEN AKTARIMININ ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Ayşe Özden SOYDAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2018

ÖZET

Romatoid artrit (RA), en sık rastlanılan sistemik otoimmün, el ve ayak küçük eklemleri başta olmak üzere simetrik olarak eklemlerde artrite yol açan, kalıcı eklem hasarı ve sakatlığa neden olabilen, kronik yangısal bir hastalıktır. Romatoid artrit (RA) gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda triptofan katabolizmasındaki değişiklikler ile ilgili kanıtlar bulunmaktadır. Triptofan yıkılımını başlatan enzim olan indolamin-2,3-dioksijenaz (IDO) aktivasyonunun bir göstergesidir. E-selektin 115 kDa'luk bir glikoprotein olup, TNF ve İL1 gibi proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak erken dönemde ifade edilen bir adezyon molekülüdür. E-selektin promoter kontrolündeki gen ekspresyonu yangının başladığı ilk birkaç saatlik evrede terapötik ajanın üretilerek devreye girmesini sağlayabilir. Bu tez çalışmasında yangı sırasında sentezlenen proinflamatuvar sitokinler ve mediyatörler tarafından uyarılabilen E-selektin promotorun kontrolü altında IDO geninin ifade düzeyini arttırarak otoimmün yanıt baskılanmaya çalışılmıştır. Ayrıca, fare artrit modelinde bu orijinal gen tedavisi yaklaşımının uygulanabilirliği ile bir gen tedavi protokolü oluşturulması hedeflenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen ana bulgular, insan IDO gen ekspresyonunun pELAM-1pro/hIDO ile transfekte edilen hücre hatlarında İL-1β ile uyarıyı takiben anlamlı derecede arttırılabildiği; hastalıkla indüklenen İDO ekspresyonunu sağlayan bu gen kombinasyonu artrit oluşturulan farelere lipozom aracılı olarak aktarıldığında klinik ve histopatolojik olarak belirgin olarak iyileşme sağladığı şeklinde özetlenebilir. Artritin belirgin olarak oluştuğu farelerde 3. haftadan itibaren yapılan izlemlerine bakıldığında özellikle indüklenebilir İDO eksprese eden plazmit transfer edilmiş hem genç hem de yaşlı farelerde belirgin olarak klinik iyileşme (eklem kalınlığında gerileme) gözlenmiştir. Çalışmadaki yaklaşım sadece yangı sırasında lokal olarak üretilecek olan immünoterapötik molekülün sentezlenmesi temeline dayandığı için sistemik yan etki olasılığının çok düşük olması ve ileride geliştirilecek uygun ve kalıcı gen transferi metodlarıyla uygulandığında, tekrarlayan enjeksiyon veya uygulamalar yapmaksızın hayat boyu koruyucu ve/veya tedavi edici bir özelliğe sahip olabilecek görünmektedir. Bu yaklaşımın sadece RA değil diğer otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklarda da uygulanabilir olma potansiyeli mevcut olup çalışmamız bu konuda yapılacak birçok yeni projeye de ışık tutacak nitelik taşımaktadır.

BilimKodu	:	1.064
AnahtarKelimeler	:	Romatoid artrit, İndolamin 2,3-dioksijenaz (İDO), ELAM-1 promotor, Gen aktarımı
SayfaAdedi	:	82
Danışman	:	Prof. Dr. Vedat BULUT
İkinci Danışman	:	Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

THE EFFECT OF INDUCIBLE INDOLAMINE-2,3 DIOXYGENASE (IDO) GENE TRANSFER DURING INFLAMMATION IN LOCAL MOUSE ARTHRITIS MODEL

(Ph. D. Thesis)

Ayşe Özden SOYDAŞ

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

November 2018

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic chronic autoimmune disease causing disability which affects joints symmetrically especially small hand and foot joints. There is evidence about the changes in tryptophan catabolism in autoimmune diseases such as RA. Indolamine 2,3-dioxigenase (IDO) is the marker of activation and the enzyme that initiates tryptophan degradation. E-selectin is a glicoprotein which has molecular weight of 115 kDa and an adhesion molecule that is expressed in early period in response to proinflammatory cytokines such as TNF and IL-1. Gene expression which is under the control of E-selectin promoter can cause the therapeutic agent move in first hours of inflammation. In this study autoimmune response is tried to supress by increasing IDO gene expression under the control of E-selectin promoter which is stimulated by proinflammatory cytokines synthesized during inflammation. Also a gene therapy protocole is targeted by applicability of this original gene therapy in mouse arthritis model. Main findings from this study :human IDO gene expression in PELAM-1pro/hIDO transfected cell lines is significantly increased after IL-1β stimulation; there is markable clinic and histopathologic improvement when this disease induced IDO expression gene combination is transferred by liposome to rats with arthritis. From the third week follow up of the rats in which arthritis became evident, significant clinical improvement is observed especially in both young and elderly plasmid transferred rats which expressses inducible IDO. Since the approach to the study is based only on the synthesis of the immunotherapeutic agent that will be produced locally during the inflammation and because of the very low systemic side effect possibility, it appears to be a lifelong protective and/or therapeutic aspect without repeated injections or implementations when applied wtih approciate and permanent gene transfer methods. This approach has the potential to be applicable not only to RA but also to other autoimmune and autoinflammatory diseases and also guide many new studies that will be carried out in this respect.

ScienceCode	:	1.064
KeyWords	:	Rheumatoid Arthritis, Indolamine-2,3 dioxygenase (IDO), ELAM-1 promotor, Gene transfer
PageNumber	:	82
Advisor	:	Prof. Dr. Vedat BULUT
Co Advisor	:	Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim esnasında engin bilgi ve tecrübesinden yararlanma fırsatı bulduğum, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, her zaman hoşgörü ve desteğini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Vedat BULUT'a; hem tez çalışmam hem de İmmünoloji ve Doku Laboratuarında yetişmem için bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen çok değerli ek danışman hocam Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a; bizlere her zaman destek olan anabilim dalı başkanımız çok değerli hocamız Prof.Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL'e; immünolojide doktora yapma imkanı sağlayan eski danışman hocam Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK'e; doktora eğitimim esnasında emekleri geçen değerli hocalarımız Doç. Dr. Resul KARAKUŞ'a, Prof. Dr. Cemalettin AYBAY'a, Prof. Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK'a,

Yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli doktora arkadaşlarım Rahime AKSOY, Handan AKSOY, Emine YAVUZ'a, Melek YAMAN'a; sevgi ve desteğini hep yanımda hissettiğim eşim Ramazan SOYDAŞ'a, yaşam kaynağım çocuklarıma ve beni yetiştiren anne ve babama,

Bu tez çalışmasının dahil olduğu proje çalışmaları esnasında bana çok destek olan Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilimdalı doktora öğrencilerinden değerli arkadaşlarım Mehmet KARAÇAY ve İzel YILMAZ'a ve tüm Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Çalışmamıza maddi destek sağlayan TUBİTAK'a (113S375 nolu ''Kollajen ile indüklenen artrit modelinde inflamasyon durumlarda ifade edilen tolerans indükleyici potansiyel terapötik genle artrit tedavisi: Romatoid artrit tedavisi için yeni bir strateji'' isimli proje),

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Romatoid Artrit ve İmmünopatogenez 5

2.1.1. RA ve immünolojik tolerans 7

2.2. Triptofan Metabolizması 8

2.2.1. Kinürenin yolağı 10

2.2.2. İndolamin 2,3-dioksijenaz 11

2.3. Selektinler 13

2.3.1. L-Selektin 13

2.3.2. P-Selektin 13

2.3.3. E- Selektin 14

2.4. Gen Tedavisi ve Gen Transfer Yöntemleri 15

2.4.1. Biyolojik yöntemler 16

2.4.2. Fiziksel ve kimyasal yöntemler 17

2.5. Artrit Hayvan Modelleri 19

2.6. Artrit Modellerinde Gen Tedavisi 19

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM 23

3.1. Kullanılan Solusyon, Reaktif, Kit ve Plazmitler 23

3.1.1. Kullanılan solusyonlar 23

3.1.2. Hücrelere ve hayvanlara uygulanan reaktifler 25

3.1.3. Kullanılan hazır kitler 25

3.1.4. Plazmitler 25

3.2. ELAM-1 Promotorun İnsan IDO (*hIDO*) Geninin Ön Kısmına Klonlanması 26

3.3. Hücre Kültürü 27

3.3.1. Donmuş hücrelerden kültür yapılması 27

3.3.2. Hücrelerin ayrılması ve pasajlanması 27

3.4. Klonlanan pELAM-1pro./hIDO Plazmitinin HeLa Hücrelerine Transfer Edilmesi 28

3.4.1. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen hela hücrelerindeki Ido ekspresyon seviyesinin belirlenmesi 29

3.4.2. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen HeLa hücrelerindeki Total protein miktarının belirlenmesi 29

3.4.3. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen HeLa hücrelerindeki IDO ekspresyon seviyesinin ELISA ile belirlenmesi 30

3.4.4. İDO aktivite testi 31

3.4.5. Western Blot analizi 32

3.5. Hayvan Modeli Çalışmaları 33

3.5.1. Balb/c farelerde lokal artrit oluşturulması 33

3.5.2. Histopatolojik inceleme 34

3.5.3. Dokuda X-Gal boyanması 35

3.5.4. Dokularda CD4 ve CD68 immünohistokimyasal boyanması ve değerlendirilmesi 36

3.6. İstatistiksel Analiz 37

4. BULGULAR 39

Sayfa

4.1. E-selektin Promotor Kontrolünde İnsan IDO (hIDO) Genini Eksprese Eden Plazmitin Klonlanması 39

4.2. Hücre Hattına Uygun Gen Transferi Yöntemlerinin Optimizasyonu 39

4.3. pELAM-1pro./hIDO ile Transfekte HeLa Hücrelerde İDO İndüklenebilirliğinin Gösterilmesi 41

4.3.1. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte HeLa hücrelerde ELISA yöntemi ile hIDO düzeylerinin ölçümü 41

4.3.2. IDO aktivite testi 42

4.3.3. Western blot protein analiz sonuçları 44

4.4. Kollajen (CIA) ile İndüklenen Artritli Fare Modelinin Oluşturulması 45

4.5. Artrit Oluşturulmuş Farelere İntraartiküler Lipozom-Aracılı Gen Transferi 49

4.6. Terapötik Gen Aktarımı Yapılan Artritli Farelerde Gözlenen Klinik Yanıtlar .. 51

4.7. Terapötik Gen Aktarımı Yapılan Artritli Farelerde Gözlenen Histopatolojik Yanıtlar 51

4.8. Dokularda CD68+ sinoviyal makrofajların ve CD4+ Lenfositlerin İmmunohistokimyasal Boyanması ve Değerlendirilmesi 55

5. TARTIŞMA 59

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 63

KAYNAKLAR 67

EKLER 75

Ek-1. Etik Kurul Onayı 76

ÖZGEÇMİŞ 79

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.1. Örneklerin protein derişimleri 44

Çizelge 4.2. Kontrol ve deney gruplarında X-gal boyanma sonuçları..... 49

Çizelge 4.3. Tedavi uygulanan farelerde (n: 4) tedavi sonrası haftalardaki CD68-pozitif boyanma skorları..... 56

Çizelge 4.4. Tedavi uygulanan farelerde (n: 4) tedavi sonrası haftalardaki CD4+ Lenfosit boyanma skorları..... 56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Romatoid artrit sinoviyal doku hücreleri 6

Şekil 2.2. IDO aracılı immün supresyon mekanizması 8

Şekil 2.3. Triptofan metabolizması. 9

Şekil 2.4. IDO' nun fizyopatolojik rolü 12

Şekil 2.5. ELAM-1 promotor sekansı ve NF- κB bağlanma bölgeleri NF- κB bağlanma bölgeleri şekil üzerinde ifade edilmiştir. TATA kutusu ve CAAT sekansı altı çizili olarak gösterilmiştir 15

Şekil 3.1. pCMV/ hygro vektörü ve sekans referans noktaları 26

Şekil 3.2. IDO aktivite ölçüm metodu standart eğrisi 31

Şekil 4.1. HeLa hücre hattına ticari lipozom/polimer ile gen transfer etkinliğinin karşılaştırılması 40

Şekil 4.2. pELAM-1.pro/hIDO ile transfekte Hela hücrelerinde İDO düzeyleri 42

Şekil 4.3. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte HeLa hücrelerinde İDO aktivitesi 43

Şekil 4.4. BSA standart eğri grafiği 44

Şekil 4.5. Blotlama analizi sonucu 45

Şekil 4.6. Kollajen ile indüklenen artritte eklem kalınlığının zamana bağlı değişimi 47

Şekil 4.7. Terapötik Gen Aktarımı yapılan artritli farelerde eklem kalınlıklarındaki değişimler 51

Şekil 4.8. hIDO tedavisi uygulanan farelerde tedavi sonrası haftalara göre histopatolojik skor değişimleri 52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. Kollajen (CIA) ile indüklenen artritli fare modelinin oluşturulması 46

Resim 4.2. Kollajenle indüklenmiş artrit histopatolojik görüntüleri 48

Resim 4.3. Deney (A ve B) ve kontrol (C) gruplarındaki X-gal boyama sonuçları 49

Resim 4.4. Artrit oluşturulmuş farelere intraartiküler lipozom-aracılı gen transferi 50

Resim 4.5. PBS uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler 53

Resim 4.6. pCAT/control uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler 53

Resim 4.7. pELAM.pro/hIDO uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler 54

Resim 4.8. pCMV/hIDO uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler 55

Resim 4.9. Tedavi sonrası 4. haftada CD68+ sinoviyal makrofajların ve CD4+ Lenfositlerin boyanması. Oklar CD4 pozitif reaksiyon veren hücreleri ifade etmektedir. 57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklama**
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ΔCT	Delta Eşik Döngüsü
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
ASH	Antijen Sunan Hücre
Bç	Baz çifti
Bkz	Bakınız
CaCl2	Kalsiyum klorid
CAT	Kloramfenikol asetiltransferaz
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CMV	Sitomegalovirüs
DCs	Dentritik hücre
ddH2O	Duble Distile Su
DEPC	Dietilpirokarbonat
dk	Dakika
DMF	Dimetilformamid
dNTP	Deoksi-nükleotid trifosfat
dsRNA	Çift sarmal RNA
DTT	Dithiothretiol solüsyon
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit

Kısaltmalar	Açıklamalar
ELAM-1	Endotelyal Lökosit Adezyon Molekül 1
ELISA	Enzim Bağlı İmmünsorbent Analizi
EtBr	Etidyum Bromür
h	Saat
H2O2	Hidrojen peroksit
Hpi	İnokülasyon sonrası geçen saat
HRP	Horse Radish Peroksidaz
ICAM	Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1
IDO	Indolamin 2,3-dioksijenaz
İL-1β	İnterlökin 1 beta
LPS	Lipopolisakkarit
mg	Milligram
MHC	Major Doku Uygunluk Kompleksi
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
ng	Nanogram
NK	Natural Killer, Doğal Öldürücü
p	Plazmit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif Eş Zamanlı PZR
RA	Romatoid artrit
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Dakikada devir
SD	Standart sapma
Sn	Saniye
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TBS-T	Tris Tampon Tuzu- Tween20
Th	T yardımcı hücresi

Kısaltmalar	Açıklamalar
THR	T hücre reseptörü
TNF	Tumör Nekrozis Faktör
Treg	T Düzenleyici hücre
Trp	Triptofan
U	Ünite
UV	Mor ötesi
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
βgal	Beta galaktosidaz

1. GİRİŞ

Romatoid artrit (RA), el ve ayak küçük eklemleri başta olmak üzere birçok eklemde sinoviyal dokuları etkileyen kronik yangısal bir hastalıktır. En sık rastlanılan sistemik otoimmün hastalık olup prevalansı %1 oranındadır [1,2]. Romatoid artritte sinoviyal yangı sonucu kemik ve kıkırdak kaybı, eklem hasarı gelişebilir, sakatlığa yol açabilir. Hem adaptif immünite hem de doğal immünite komponentleri RA patogenezine doğal olarak katılır [3]. RA sinoviyal dokusundaki infiltrat fibroblast-benzeri sinoviyositler, makrofajlar, T hücreleri ve B hücreleri, plazma hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücrelerinden meydana gelir.

RA patogenezinde yangısal mediyatörlerin lokal üretimi ve yangı bölgelerindeki adezyon moleküllerinin ifade düzeylerindeki değişiklikler önemli aşamaları oluşturur [8]. İmmün sistem hücrelerinin aktivasyonu, dolaşımı ve yangısal bölgeye göçü E-selektin (ELAM-1), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1) gibi endotelde ifade edilen adezyon molekülleri aracılığıyla sağlanır [7]. Vasküler endotel, dolaşımdaki lökositlerin yangı bölgelerine toplanması için sitokinler ve hücre yüzey reseptörleri arasında etkileşimi sağlayan bir arayüz gibi fonksiyon görür. İnflamatuvar hücre göçünün artmasına endotel büyüme faktörlerinin sinoviyal dokudaki neovaskülarizasyonu uyarmasına da katkıda bulunur [9,10].

Bu moleküllerden E-selektin 115 kDa'luk bir glikoprotein yapıda, TNF ve İL1 gibi proinflamatuvar sitokinlere cevaben erken dönemde eksprese edilen bir adezyon molekülüdür [11,12]. Bu molekül, karmaşık birçok adımlı sürecinin bir parçası olarak, endotel üzerine adezyonda başlangıç bağlanması (tethering) ve takiben yuvarlanma aşamalarında görev alır.

İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıtsız kalması olarak tanımlanmıştır. Spesifik bir antijen lenfositlerle karşılaştığında aktive olarak immün yanıt oluşumuna yol açabilir ya da hücrelerde inaktive edilerek ortadan kaldırılabilir bu da toleransa neden olur. Tolerans ilk olarak CD4+ T hücrelerinde tanımlanmış olup, protein yapılı antijenlerin çoğunda immün yanıt geliştirdiği bilinmektedir. Bu hücreler öz

antijenlere yanıt oluşturmazlarsa, hücresel ve humoral immüniteye karşı oluşturdukları yanıt engellenmiş olacaktır.

İmmün toleransa katkısı olan mekanizmalardan biri de triptofan metabolizmasıdır. Bu amino asitin azalmış derişimi hücre siklusu arrestine [23,24] ve apoptozise [25] öncülük eder. Buna ek olarak kinürenin yolu ile oluşan triptofan degradasyon ürünleri T hücrelerde apoptozisin potent indükleyicileridir [26,27]. IDO1 aracılı triptofan katabolizmasının Th17 ve Treg hücrelerinin biyolojisinde de önemli olduğu ispatlanmıştır [27,28]. Th17 hücreleri yangıyı artırırken, Treg hücreleri potent anti-inflamatuar aktivite sergilerler. RA'da Th17 hücrelerinin aktivitesi, Treg hücrelerinin anti-inflamatuvar etkisinden fazla olduğu için kronik eklem yangıyı sürmektedir [2].

Triptofan vücutta patolojik olmayan durumlarda genel protein sentezine, serotonin sentezi için hidroksilasyon yoluna veya kinürenin sentezinin gerçekleştiği oksidasyon yoluna katılmaktadır. Triptofanın kinürenine dönüşümünde ilk enzimatik ve hız kısıtlayıcı basamak olan triptofanın N-formilkinürenine oksidasyonu olup bu basamağın karaciğerde bulunan triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO, EC.1.13.11.11) tarafından katalizlendiği 1936 yılında keşfedilmiştir. TDO dışında; D-triptofan, L-triptofan, triptamin, 5- hidroksitriptofan ve serotonin gibi indolamin türevlerini substrat olarak kullanan indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO, EC.1.13.11.17) enzimi de tanımlanmıştır [36]. İndolamin 2,3-dioksijenaz enzimi, 45 kD'luk, kofaktör olarak Hem *b* grubu içeren sitozolik, monomerik protein yapıda bir moleküdür. IDO enziminin immünolojik rolü ile ilgili iki ana hipotez mevcuttur. Birincisi; mikroçevredeki triptofan tüketiminin hücre proliferasyonunu suprese etmesi ve immünomodülatör veya antimikrobiyal etkiler meydana getirmesidir. Patolojik koşullarda hızla bölünen hücreler, parazit, bakteri ve virüs gibi patojenlere karşı immün yanıt olarak IDO'nun aşırı düzeyde ekprese edildiği bildirilmiştir [34,47]. İkincisi; IDO'nun kazanılmış immün toleransta görev aldığı, T-hücreleri baskılayıp triptofan düzeylerini azaltarak özellikle tümör hücrelerinin T hücre yanıtından kaçmasını sağladığıdır. IDO enzimi immün tolerans ve atak arasındaki denge üzerine etki ederek uygun immün yanıtın oluşmasını sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında yangı sırasında sentezlenen proinflamatuvar sitokinler ve mediyatörler tarafından uyarılabilen E-selektin promotorun kontrolü altında IDO geninin ifade düzeyini arttırarak otoimmün yanıt baskılanmaya çalışılmıştır. Ayrıca, fare artrit modelinde bu

orijinal gen tedavisi yaklaşımının uygulanabilirliği ile bir gen tedavi protokolü oluşturulması hedeflenmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre insan IDO gen ekspresyonunun pELAM-1pro/hIDO ile transfekte edilen hücre hatlarında İL-1β ile uyarıyı takiben anlamlı derecede arttırılabildiği; hastalıkla indüklenen IDO ekspresyonunu sağlayan bu gen kombinasyonu artrit oluşturulan farelere lipozom aracılı olarak aktarıldığında klinik ve histopatolojik olarak belirgin olarak iyileşme sağladığı gözlenmiştir. Artritin belirgin olarak oluştuğu farelerde 3. haftadan itibaren yapılan izlemlerine bakıldığında özellikle indüklenebilir IDO eksprese eden plazmit transfer edilmiş hem genç hem de yaşlı farelerde belirgin olarak klinik iyileşme (eklem kalınlığında gerileme) belirlenmiştir.

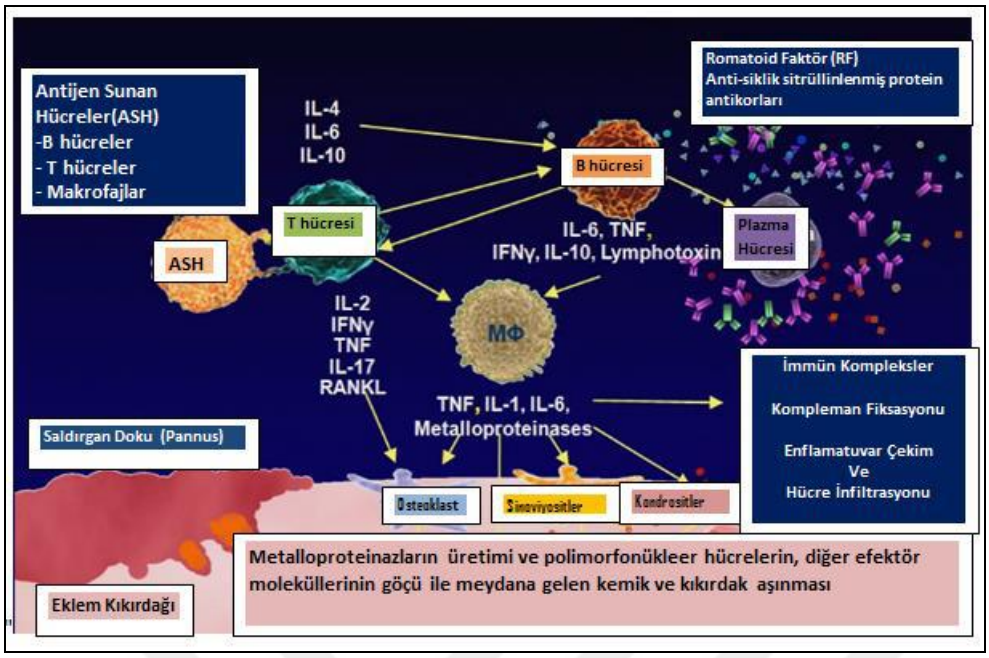
Bu çalışmadaki yaklaşım sadece yangı sırasında lokal olarak üretilecek olan immünoterapötik molekülün sentezlenmesi temeline dayandığı için sistemik yan etki olasılığının çok düşük olması ve ileride geliştirilecek uygun ve kalıcı gen transferi metodlarıyla uygulandığında, tekrarlayan enjeksiyon veya uygulamalar yapmaksızın hayat boyu koruyucu ve/veya tedavi edici bir özelliğe sahip olabilecek görünmektedir. Bu yaklaşımın sadece RA değil diğer otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklarda da uygulanabilir olma potansiyeli mevcut olup çalışmamız bu konuda yapılacak birçok yeni projeye de ışık tutacak nitelik taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit ve İmmünopatogenez

Romatoid artrit (RA), en sık rastlanılan sistemik otoimmün, el ve ayak küçük eklemleri başta olmak üzere simetrik olarak eklemlerde artrite yol açan, kalıcı eklem hasarı ve sakatlığa neden olabilen, kronik yangısal bir hastalıktır [1]. Prevalansı toplumsal farklılık göstermekle beraber dünyada nüfusunun %1'ni etkilemektedir [2].

RA birçok eklemde sinoviyal dokuları etkileyen yangı neticesinde kemik ve kıkırdak kaybıyla eklem hasarına yol açar. Hem doğal hem de adaptif immünite immünitenin bileşenleri RA patogenezine doğal olarak katılır [3]. RA sinoviyal dokusundaki infiltrat fibroblast-benzeri sinoviyositler, makrofajlar, T hücreleri ve B hücreleri, plazma hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (Natural Killer; NK) hücrelerinden meydana gelir (Şekil 2.1) [1]. Makrofajların MHC Sınıf II ekspresyonlarında artış gözlenir. Semptomlar ortaya çıktığı zaman inflame sinoviyada kronik hastalığın histopatolojik özellikleri gelişmiş olduğu için yangısal sürecin ne zaman ve nasıl başladığı bilinmemektedir [4]. Bununla beraber, hastalığın klinik olarak saptandığı evrede yangısal hücrelerin hastalık bölgesinde birikimi, bölgede tutulması ve proliferasyonunun romatoid sinoviyada hücre birikiminin artışına neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, bozulmuş apoptoz da romatoid sinoviyal dokudaki hiperplaziyi arttırabilir. Yani sinoviyadaki artan hücresel yük, hem yangısal hücrelerin bölgeye göçüne hem de alandaki hücrelerin tutulmasını sağlayan immünolojik faktörlere bağlıdır [5].



Şekil 2.1. Romatoid artrit sinoviyal doku hücreleri [6]

İmmün sistem hücrelerinin aktivasyonu, dolaşımı ve yangısal bölgeye göçü E-selektin (ELAM-1), hücrelerarası adezyon molekülü-1 (intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1) gibi endotelde ifade edilen adezyon molekülleri aracılığıyla sağlanır [7]. İnflamatuvar mediyatörlerin lokal üretimi ve yangı bölgelerindeki adezyon moleküllerinin ifade düzeylerindeki değişiklikler daha sonraki RA patogenezinde önemli aşamaları teşkil eder [8]. Vasküler endotel, dolaşımdaki lökositlerin yangı bölgelerine toplanması için sitokinler ve hücre yüzey reseptörleri arasında etkileşimi sağlayan bir arayüz gibi fonksiyon görür. İnflamatuvar hücre göçünün artmasına endotel büyüme faktörlerinin sinoviyal dokudaki neovaskülarizasyonu uyarmasına da katkıda bulunur [9,10]. Bu moleküllerden E-selektin 115 kDa' luk bir glikoprotein olup, TNF ve İL1 gibi proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak erken dönemde eksprese edilen bir adezyon molekülüdür [11,12]. Bu molekül, karmaşık birçok adımlı sürecin bir parçası olarak, endotel üzerine adezyonda başlangıç bağlanması (tethering) ve takiben yuvarlanma aşamalarında görev alır.

2.1.1. RA ve immünolojik tolerans

İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıtsız kalması olarak tanımlanmıştır. Spesifik bir antijen lenfositlerle karşılaştığında aktive olarak immün yanıt oluşumuna yol açabilir ya da hücrelerde inaktive edilerek ortadan kaldırılabilir bu da toleransa neden olur. Bazı durumlarda ise antijene özgül lenfositler bu iki durum dışında kalarak antijeni yok sayarlar ve antijene karşı herhangi bir yanıt geliştirmezler.

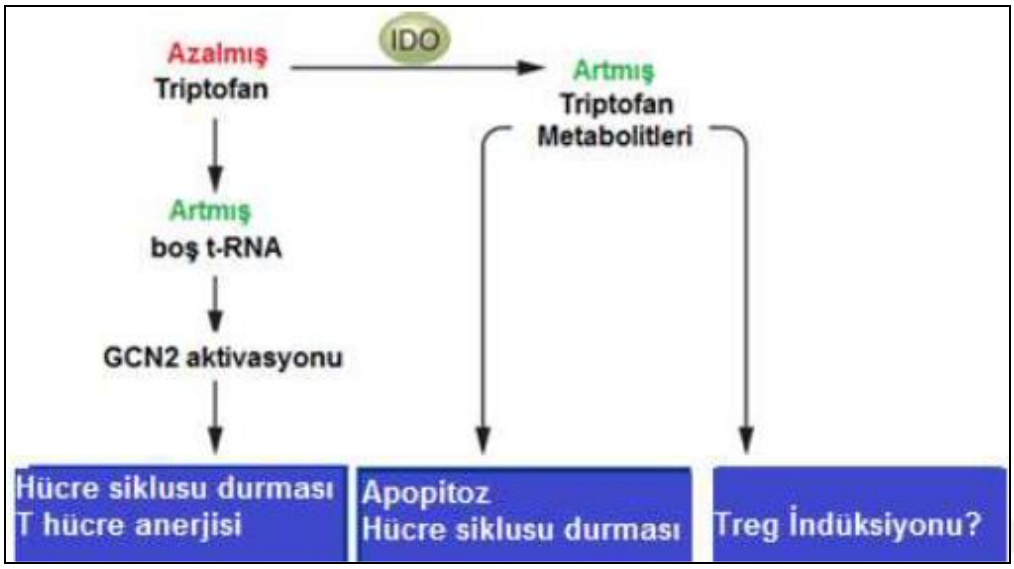
Aynı antijenin farklı formları immün yanıtı indükler ya da tolere edebilir. Antijenler, toleransı tetiklerse tolerojenler olarak tanımlanır. Bu tolerojenik antijenler immünojenlerden ayırt edilerek immüniteyi oluştururlar. Normal bireyler öz antijenlerine karşı tolerans gösterirler çünkü lenfositler, öz antijenlere özgündürler. Tüm bireylerde benzer antijen reseptör gen segmentleri kalıtımsaldır, yeniden şekillendirilir ve lenfositlerde öncü hücrelerden kaynaklanarak eksprese edilirler. Reseptörlerin özgüllüğü, rekombine olmuş genler tarafından rastgele kodlanır. Bireyde neyin yabancı, neyin öz olduğundan etkilenmez [20].

Özgün immün ve otoimmün yanıtlar aynı bileşenleri içerirler. Bu bileşenleri içeren antijenler, etkileştikleri aileler ve hücre alt grupları aracılığıyla antijen sunan hücreler tarafından immün yanıt oluştururlar. T lenfositler, B lenfositler, haberci moleküller, sitokinler, kemokinler ve reseptörleri, sinyaller ve kostimülatör molekülleri, hücre yüzeylerinde yer alır. Fonksiyonel açıdan önemli birçok hücre farklılaşmış kümeler şeklinde hücre yüzeyleri ve reseptörleri ile terminolojik olarak Cluster of Differentiation (CD) adlandırılmıştır [21].

Tolerans ilk olarak CD4+ T hücrelerinde tanımlanmış olup, protein yapılı antijenlerin çoğunda immün yanıt geliştirdiği bilinmektedir. Bu hücreler öz antijenlere yanıt oluşturmazlarsa, hücresel ve humoral immüniteye karşı oluşturdukları yanıt engellenmiş olacaktır. Bunun aksine yardımcı T hücrelerindeki toleransın kaybolması durumunda öz antijene T hücre aracılı saldırı ya da öz proteinlere karşı otoantikor yapımı sonucunda otoimmünite gerçekleşebilir [22].

İmmün toleransa katkısı olan mekanizmalardan biri de triptofan metabolizmasıdır (Şekil 2.2). Bu amino asitin azalmış derişimi hücre siklusu arrestine [23,24] ve apoptozise [25]

öncülük eder. Buna ek olarak kinürenin yolu ile oluşan triptofan degradasyon ürünleri T hücrelerde apoptozisin potent indükleyicileridir [26,27]. IDO1 aracılı triptofan katabolizmasının Th17 ve Treg hücrelerinin biyolojisinde de önemli olduğu ispatlanmıştır [28,29]. Th17 hücreleri yangıyı artırırken, Treg hücreleri potent anti-inflamatuar aktivite sergilerler. RA'da Th17 hücrelerinin aktivitesi, Treg hücrelerinin anti-inflamatuvar etkisinde fazla olduğu için kronik eklem yangısı sürmektedir [2].

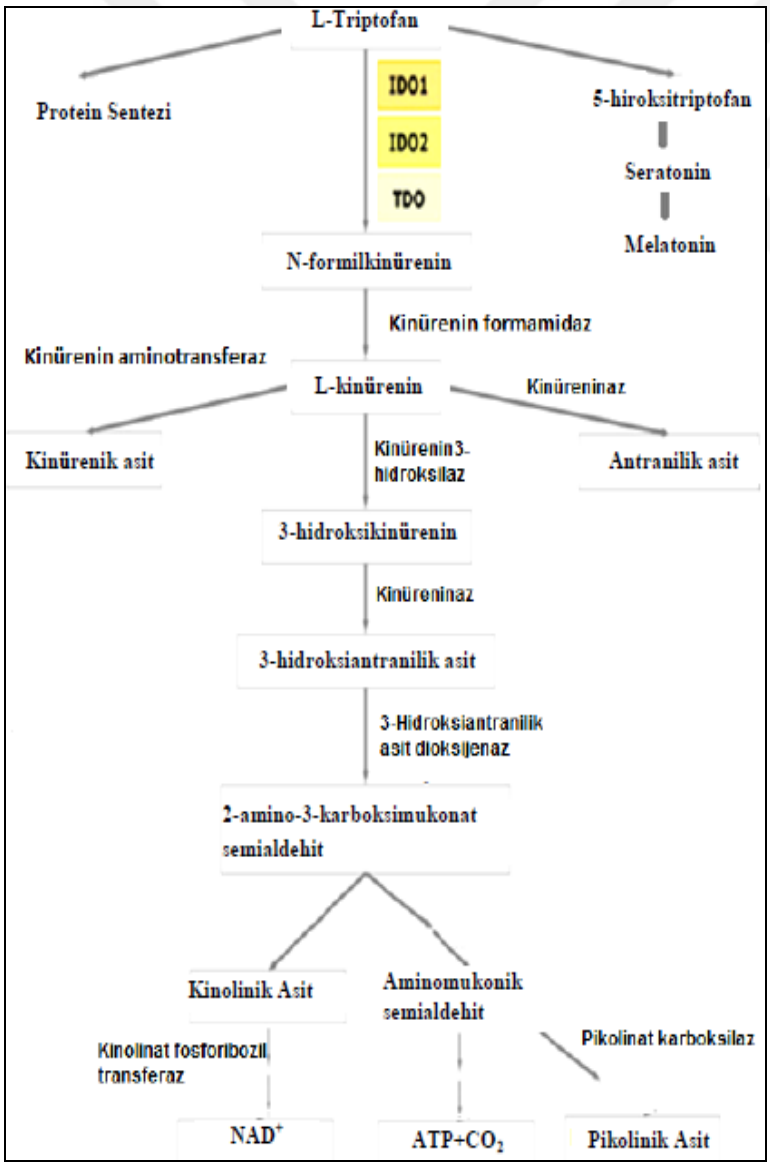


Şekil 2.2. IDO aracılı immün supresyon mekanizması [89]

2.2. Triptofan Metabolizması

Triptofan (Trp) IUPAC sistemine göre; 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoik asit olarak adlandırılan indol halkası içeren esansiyel bir amino asittir. Triptofan için minimum gereksinim günlük ortalama 200 mg'dır. Gelişmiş ülkelerde diyet ile ortalama günlük Trp alımının yetişkinler için önerilen günlük alım miktarı 3.5-6.0 mg/kg/gün olarak belirlenmiştir [29]. Diyetle alınan triptofan hepatik portal sistemle karaciğere taşınır. Protein sentezi için kullanılmayan triptofan karaciğerde yıkılır veya hücrelerde kullanılır. Kan dolaşımında triptofan serbest ve %90 oranında plazma albüminine bağlı olarak bulunmaktadır. Kan beyin bariyerinden öncelikle bağlı olmayan, serbest Trp kompetitif olarak spesifik olmayan L-aminoasit taşıyıcılarıyla geçiş yapmaktadır. Ancak Trp'ın kan beyin bariyerindeki taşıyıcılara afinitesi albümine olan afinitesinden daha yüksek olduğundan, kan beyin bariyerine yakın bulunan ve albümine bağlı Trp'ın albüminden ayrılarak beyine geçişi mümkündür [30,31]. Glia hücreleri tarafından alınan triptofan burada serotoninin yanı sıra 3-hidroksikinürenin, kinolinik asit gibi nöroaktif triptofan

metabolitlerine dönüşmektedir [32,33]. Triptofan vücutta patolojik olmayan durumlarda genel protein sentezine, serotonin sentezi için hidroksilasyon yoluna veya kinürenin sentezinin gerçekleştiği oksidasyon yoluna katılmaktadır. Hem periferal hem de santral sistemde triptofan metabolizması büyük oranda kinürenin yolağı üzerinden olmaktadır (Şekil 2.3). Normal şartlarda triptofanın %1'i serotonin sentezine, %95'i ise kinürenin yolağına girmektedir [33]. Trp, bütün canlı hücrelerde elektron transfer reaksiyonları için gerekli olan nikotinamid adenin dinükleotidlerin (NAD+, NADP+), serotonin ve melatonin gibi biyolojik olarak önemli birçok bileşiğin öncü maddesidir. Serotonin, triptofanın hidroksilaz enzimiyle reaksiyonun sonucunda 5-hidroksitriptofan ve sonrasında aromatik L-amino asit ile dekarboksilasyonundan meydana gelmektedir [35].



Şekil 2.3. Triptofan metabolizması. IDO; İndolamin 2,3-dioksijenaz, TDO; Triptofan 2,3-dioksijenaz

2.2.1. Kinürenin yolağı

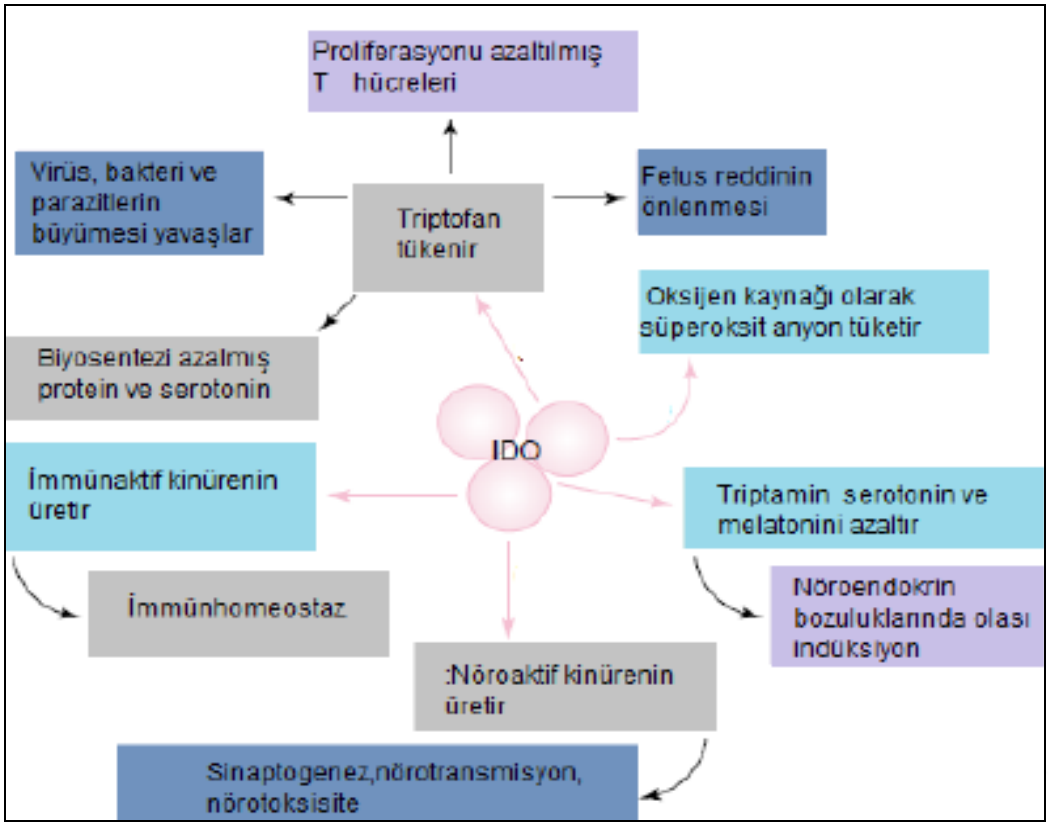
Memelilerde triptofanın major katabolik yolu son ürün olarak NAD^+ biyosentezinin gerçekleştiği kinürenin yolağıdır. Kinürenin 1927 yılında izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Triptofanın kinürenine dönüşümünde ilk enzimatik ve hız kısıtlayıcı basamak olan triptofanın N-formilkinürenine oksidasyonu olup bu basamağın karaciğerde bulunan triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO, EC.1.13.11.11) tarafından katalizlendiği 1936 yılında keşfedilmiştir. Memelilerde keşfedilen ilk indüklenebilen enzim sistemi olan TDO, triptofan ve glukokortikoitlerin yanı sıra histidin, kinürenin ve çok az oranda da tirozin ve fenilalaninle indüklenmektedir. Çeşitli hastalıklarda idrar triptofan metabolitlerinin seviyelerinin farklı bulunması, bu hastaların karaciğerinde TDO aktivitesinin yükselmemesi triptofan katabolizmasında ikinci bir enzimin varlığınından şüphe ettirmiş, ikinci bir enzim olarak karaciğer dışı dokularda triptofanı kinürenine çeviren enzim izole edilmiştir. D-triptofan, L-triptofan, triptamin, 5- hidroksitriptofan ve serotonin gibi indolamin türevlerini substrat olarak kullanması nedeniyle bu enzime indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO, EC.1.13.11.17) adı verilmiştir [36]. Her iki enzim aynı reaksiyonu katalizlemelerine rağmen ekspresyonlarında dokular arası farklılık bulunduğu ve farklı biyolojik roller sergiledikleri gösterilmiştir. Sağlıklı koşullarda hepatik kinürenin yolağı aktif olup dokularda IDO ekspresyonu oldukça düşüktür. Ancak yangı ve immün aktivasyonda IDO ekspresyonunun upregülasyonuna bağlı olarak ekstrahepatik kinürenin yolağı baskın duruma gelmektedir. TDO ve IDO tarafından triptofanın indol halkasına moleküler oksijen katılarak katalizlenen enzimatik reaksiyon sonucu oluşan N-formil kinürenin enzimatik veya non-enzimatik reaksiyonla kinürenine dönüşmektedir. Kinürenin yolağı diğer kinürenin türevlerinin oluşumunun yanı sıra sitrik asit siklusuna girerek tamamen CO_2 ve H_2O'ya dönüşebildiği gibi diyetle alınan niasinin yetersizliğinde, *de novo* NAD+ sentezine yönelmektedir [37]. Triptofan düzeyleriyle doğrudan ilişkili olan kinürenin derişimi diyetsel triptofan alımındaki yetersizliğe bağlı olarak düşme gösterir. TDO ve IDO'nun katalizlediği reaksiyonun ürünü olan kinüreninin bu enzimlerin substratı olan triptofana oranı, triptofan yıkımının ve IDO aktivitesinin uygun bir belirteci olmaktadır [38]. Yapılan çalışmalarda immün aktivasyon belirteçlerinin düzeylerindeki artışa bağlı olarak kinürenin triptofan oranının arttığı bildirilmiştir [39,40].

2.2.2. İndolamin 2,3-dioksijenaz

İndolamin 2,3-dioksijenaz enzimi, 45 kDa'luk, kofaktör olarak Hem *b* grubu içeren sitozolik, monomerik protein yapıda bir moleküdür. IDO enzim aktivitesi için esansiyel olan Hem grubundaki demirin, ferrik formdan ferröz forma redüklenmesi için bir elektron transferi süperoksit radikalinden elde etmek için, enzimin aktif bölgesine triptofanın bağlanması gerekmektedir. IDO, gen ekspresyonu ve enzimatik aktivite düzeyinde sıkı bir şekilde regüle olmaktadır. IDO aktivitesinin sağlık için vazgeçilmez veya zararlı olması arasındaki denge, *in vivo* IDO aktivitesinde düzenleyici etkisi olan spesifik moleküllere bağlıdır. Plasenta, akciğer, bağırsak, kolon, dalak, böbrek, mide ve karaciğer hücrelerinde yer alan IDO, dendritik hücreler, monosit, makrofaj, epitelyal hücreler, fibroblast, endotelyal hücreler ve bazı tümör hücre kültürlerinde İFN-γ ile indüklenme özelliğine sahiptir. IDO, İFN-γ dışında TNF-α, İFN-α/-β, İL-10 gibi sitokinlerle de indüklenme özelliği gösterir [35,41]. Ayrıca IDO, immün hücrelerde üretilen indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) ile meydana gelen nitrik oksit (NO) tarafından indüklenmekte, NO etkisiyle IDO protein düzeyi ve aktivitesi azalma meydana gelir [42]. Kinürenin sentezinde ilk hız sınırlayıcı basamağın doku ve hücre tipine bağlı olarak TDO veya IDO tarafından katalizlendiği bilinmekle birlikte, 2007 Murray ve arkadaşları [43] tarafından triptofanı katabolize eden IDO benzeri ikinci bir enzimin bildirilmiş olup, bu enzime IDO'ya yapısal benzerlik sebebiyle indolamin 2,3-dioksijenaz 2 (IDO2) denilmiştir. Yakın zamanda keşfedilmesi nedeniyle IDO2'nin biyolojik rolü net olarak bilinmemektedir ancak böbrek, üreme sistemi ve dendritik hücrelerde eksprese edilmesi böbrek fonksiyonu, fertilite ve immün modülasyonda rol aldığını düşündürmektedir [44].

IDO enziminin iki önemli görevi gözü UV hasarından koruyan triptofan metabolitlerinin oluşumunu sağlamak ile patojenlerin ve immün hücrelerin proliferasyonunu baskılamaktır [45,46]. IDO enziminin immünolojik rolü ile ilgili iki ana hipotez mevcuttur. Birincisi; mikroçevredeki triptofan tüketiminin hücre proliferasyonunu suprese etmesi ve immünomodülatör veya antimikrobiyal etkiler meydana getirmesidir. Patolojik koşullarda hızla bölünen hücreler, parazit, bakteri ve virüs gibi patojenlere karşı immün yanıt olarak IDO'nun aşırı düzeyde ekprese edildiği bildirilmiştir [34,47]. İkincisi; IDO'nun kazanılmış immün toleransta görev aldığı, T-hücreleri baskılayıp triptofan düzeylerini azaltarak özellikle tümör hücrelerinin T hücre yanıtından kaçmasını sağladığıdır. IDO enzimi immün

tolerans ve atak arasındaki denge üzerine etki ederek uygun immün yanıtın oluşmasını sağlamaktadır [35,41,44].



Şekil 2.4. IDO' nun fizyopatolojik rolü [47]

IDO aktivitesinin, proliferasyonu inhibe eden iki mekanizmaya sahip olduğu tanımlanmıştır:

1) Triptofanın tüketilmesi; yani IDO aktivitesinin sonucunda fizyolojik olarak triptofanın azalması.
2) Triptofanın kullanılması; sitotoksik ve sinyal molekülü olan kinürenin metabolitlerinin meydana gelmesi amacıyla triptofanın kullanılması [35,48,49,50]

IDO aktivitesi genel antiproliferatif etkiye sahip olduğu için, IDO ekprese eden hücrelerin kendi proliferasyonlarını da suprese edebileceği Takikawa ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu nedenle IDO eksprese eden hücrelerin hem kendilerini IDO aktivitesinin etkilerinden koruyan hem de triptofan tüketim ve kullanım mekanizmalarını devam ettiren sıkı bir IDO regülasyonu mevcut görünmektedir [34,45].

Fizyolojik homeostaz için yabancı antijenlere yanıt veren immün sisteme gerek vardır. IDO'nun immün hücre proliferasyonunu kontrol etmesi gebelikte olduğu gibi tolerans indüksiyonunun kritik bir bileşenidir. İmmün sistem stimülasyonunun yüksek olduğu otoimmün patolojilerle yetersiz IDO aktivite ve ekspresyonunun ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar giderek artış göstermektedir [51].

2.3. Selektinler

Selektinler geniş bir veri alanına sahip memeli hücrelerinde bulunan reseptör aileleridir. Lökositlerin vasküler endotelyal hücre adezyonuna yol açan, birbirleri arasında etkileşim içinde olan ve birbirinden bağımsız karbonhidrat bağlayıcı, nötrofil ekstravazyonuna sebep olan trombosit bağlayıcı moleküller olarak tanımlanır [52,53,54,55].

Selektin molekülleri hücre dışı kalsiyum bağlama yeteneğine sahip olup lektin domainleri içeren tek zincirli glikoprotein yapıda moleküllerdir [20]. Selektinler, Lökosit adezyon molekülü (L-selektin), P-selektin (trombositler ve aktive endotelyum üzerinde gösterilen adezyon molekülü) ve Endotelyal lökosit adezyon molekül-1 (E-selektin) (ELAM-1) olarak üç farklı tipte bulunurlar.

2.3.1. L-Selektin

L-selektin, hücre yüzey elemanı olarak, selektin ailesinin ‘’homing’’ reseptörü olarak tanımlanmıştır. Bu molekül çoklu domainler içerir. Birinci domaini lektin ile homoloji gösterir, ikinci domaini epidermal büyüme faktörüne sahiptir ve diğer iki domain ise C3 ve C4 bağlanma proteinlerini barındırır [55].

L-selektin lenfositlerin periferik lenfoid dokulara endotelyel venüller vasıtasıyla girmesini sağlayan bir homing reseptör gibi fonksiyon görür. Mevcut endotelyal hücreler üzerindeki ligandlar L-selektin eksprese eden lenfositlere bağlanarak, kanda lenfosit dolaşımını yavaşlatıp periferik bir lenfoid organa girişi kolaylaştırır [56,57].

2.3.2. P-Selektin

P-selektin, bir hücre adezyon molekülü olup, aktive edilmiş endotelyal hücre yüzeylerinde yer alır [58]. P-selektin, megakaryositler ve endotelyal hücrelerde yapısal olarak ifade

edilen bir moleküldür [59]. P- selektin ekspresyonunu aktive eden iki farklı mekanizma mevcuttur. İlk mekanizmada P- selektin sentezi trombin gibi agonistler ile granüllerden plazma zarına doğru hızlıca hareket eder [60]. İkinci mekanizma ise P-selektin'in mRNA ve protein seviyesini arttırmak için yangıya neden olan TNF-α, LPS ya da İL-4 gibi ajanlar ile uyarılması gereklidir. Yangı esnasında P- selektinin, lökositlerin hasarlı bölgeye doğru toplanmasında büyük bir rolü vardır. Yangı sırasında endotelyal hücreleri histamin ve trombin gibi moleküler tarafından aktive eder ve böylece P- selektin hücre içi bölgeden endotelyal hücre yüzeyine yönelmiş olur [61].

2.3.3. E- Selektin [Endotel Lökosit Adezyon Molekülü- 1 (ELAM-1)]

ELAM-1, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) gibi endotelde ifade edilen adezyon molekülleri ile immün sistem hücrelerinin aktivasyonu, dolaşımı ve yangısal bölgeye göçü gerçekleşir [7,62].

Vasküler endotel, dolaşımdaki lökositlerin enflamasyon bölgelerine toplanması için sitokinler ve hücre yüzey reseptörleri arasında etkileşimi sağlayan bir ara yüz gibi fonksiyon görür. İnflamatuvar hücre göçünün artmasına, endotel büyüme faktörlerinin sinoviyal dokudaki neovaskülarizasyonu uyarmasına da katkısı bulunmaktadır [9,10].

ELAM-1 115 kDa' luk bir glikoprotein yapıda, TNF ve İL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlere cevaben erken dönemde eksprese edilen bir adezyon molekülüdür [11,12].

İnsan ELAM-1 molekülünün promoter bölgesi dört adet düzenleyici domaini mevcuttur (Şekil 2.5). Birincisi bir NF-κB bağlanma bölgesi (pozisyon -94 ile -85 arası), ikincisi aktive edici transkripsiyon faktör-2 (ATF-2) (aynı zamanda NF-ELAM-1 olarak da bilinir; pozisyon -155 ile -147 arası), üçüncü domain yüksek hareketli grup protein I (HMG-I(Y)), NF-κB bağlanma bölgesi (p50/p65 pozisyon -140 ile -137 arası), dördüncü domain ise NF-κB bağlanma bölgesi (p65/p50 pozisyon -129 ile -120 arası) [13,14,15] şeklindedir. NF-κB sitokin ile indüklenen ELAM-1 transkripsiyonunu düzenlemek için gereklidir, ancak tek başına yeterli olmaz [13]. ELAM-1 promotor bölgesinde yer alan diğer bağlanma bölgeleri de önemlidir [14,15].Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda E-selektin'in sitokin ile uyarıyı takip eden 4-6 saatlik süre içersinde eksprese edildiği bildirilmiştir [16,17]. Bu durum, yangının başlangıç döneminde E-selektin promotorun aktive olması ile gerçekleşir.

İnsan ve fare E-selektin promotor bölgelerinin nükleotid dizisi ve fonksiyonel olarak çok yakın olduğu, ancak fare E-selektin promotor bölgesinde güçlü bir NF-kB bağlanma bölgesi bulunmadığı için insan E-selektin promotorun daha güçlü olduğu belirtilmiştir [18].



Şekil 2.5. ELAM-1 promotor sekansı ve NF- κB bağlanma bölgeleri NF- κB bağlanma bölgeleri şekil üzerinde ifade edilmiştir. TATA kutusu ve CAAT sekansı altı çizili olarak gösterilmiştir [19]

2.4. Gen Tedavisi ve Gen Transfer Yöntemleri

Gen tedavisini bir hastalığı tedavi etmek veya hastanın klinik durumunu iyileştirmek için hedef hücrelere terapötik genetik materyal transferi şeklinde tanımlamak mümkündür [83].

Gen tedavisi ilk defa 1970'li yıllarda RNA retrovirüsleriyle çalışan Martine Cline tarafından ileri sürülmüştür [63]. 1980 yılında Cline retroviral tabanlı vektör kullanarak etkin gen transferi gerçekleştirmiştir [64]. İlk gen tedavi uygulaması talasemi hastalığı için 1982 yılında insanlarda yapılmıştır [65].

Gen tedavisi bazı hastalıkların ve bozuklukların engellenmesi veya tedavisi için eksik genlerin yerine konması, hatalı olarak veya fazla çalışan genlerin susturulması ve bazı genlerin işlevlerinin değiştirilmesi amacıyla genetik maddelerin hücrelere aktarılmasını kapsayan bir tedavi şeklidir [65].

Genetik materyallerin hücre içerisine iki şekilde transferi mümkündür. Bunlardan ilki biyolojik yol olan hücreye replikasyon yapamayan rekombinant virüsler yoluyla (viral vektörler) ve ikincisi ise fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle (non-viral vektörler) genetik materyalin hücre içerisine aktarılması yolu ile olur. Gen transferi için ideal bir yöntem henüz mevcut değildir, her yöntem farklı avantaj ve dezavantajlar barındırır. Gen tedavisindeki başarısızlıklar terapötik genlerin yetersizliğinden kaynaklanmamaktadır. Terapötik genlerin yeterli dozda aktarılabilmesi ve pratikte yaygın uygulama alanı bulabilmesi, bu genlerin hastalıklı bölümleri hedefleyebilmesi, hedeflenen etkiye ulaşılması, vücut tarafından kontrol altında tutalabilmesi, biyogüvenlik problemleri avantaj ve dezavantajları meydana getirir [84].

2.4.1. Biyolojik yöntemler

Biyolojik yöntem uygulamaları rekombinant virüs tabanlı vektörlerin kullanılması ile gerçekleştirilir. Gen transferinde en çok kullanılan vektörler insan hücrelerine transdüksiyon etkinliğinin yüksek olması sebebiyle virüslerdir [84]. Genel olarak viral vektörlerin non-viral vektörlere göre etkinlikleri fazladır ve uzun dönem gen ekspresyonu potansiyeline sahip oldukları gözlenir [85].

In vitro, ex vivo ve in vivo gen transferi için insan ve fare DNA ve RNA virüslerinden birçok farklı viral vektör sistemlerinin geliştirildiği bilinmektedir. Lenti virüs, adeno virüs, adeno-assosiye virüs, herpes virüs ve retro virüsler yaygın şekilde kullanılan viral vektörlere örnektir [86].

Seçilecek virüs hedef hücreye ve geçici ya da uzun süreli gen ekspresyonu ihtiyacına göre belirlenir. Bu virüslerin hastalık yapıcı özellikleri yok edilerek klonlanmak istenen tedavi edici rekombinant genler, belirli restriksiyon enzimlerinin yardımıyla istenilen bölgeye klonlanır. Viral vektörleri memeli hücrelerinde eksprese ettirmek için paketleyici hücre hatlarına transfer etmek gerekir. Terapötik geni taşıyan vektörün paketlenmesi

transkripsiyon ünitesi olan ancak viral genomu içermeyen özel bir hücre ile sağlanır. Paketleyici hücre hattında oluşturulan virüslerin kapsitleri tekrardan izole edilerek, istenilen hücre hattına nakledilebilir. Protein bazlı kapsit veya lipid zarf ile çevrili genetik materyal içeren viral vektör spesifik hücre yüzey reseptörü ile etkileşerek bağlanma, internalizasyon ve terapötik genin hedef hücreye geçişine aracılık eder [85]. Kapsit veya zarf proteini terapötik geni nukleusa doğru yönlendirir ve lizozomlardaki degradasyondan korur.

Viral vektörler aracılığıyla gerçekleştirilen gen tedavisinde ekspresyon seviyesi oldukça yüksektir. Fakat genomda gelişi güzel bölgelere entegre olabileceği gibi işlevsel bölgelerde delesyona da sebep olabilir. Bu nedenler viral vektörlerle çalışmayı zorlu hale getirmektedir [68].

2.4.2. Fiziksel ve kimyasal yöntemler

Gen tedavisinde çıplak gen parçasının doğrudan hücreye transfer edildiği yöntemler fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak tanımlanır. Bu yöntemler elektroporasyon, gen tabancası, lipozom ya da polimerler aracılığıyla gerçekleştirilir.

Elektroporasyon yönteminde yüksek elektrik akımına bırakılan hücrelerde, hücre zarlarında geçici porlar oluşturularak istenilen genetik materyalin geçişine imkan tanır.

Gen tabancası aracılığıyla aktarımda ise, altın parçacıklarla örtülen DNA partiküllerine hız kazandırılarak gerçekleştirilir. Hücre zarını hızla delen DNA parçacığı sitoplazma içine girerek oradan çekirdeğe ulaşır [69].

Lipozom

Lipozomlar, hücre zarının yapısını andıran fosfolipit yapılı, amfipatik ve veziküler özellik gösteren yapılardır [70]. Yapılarında bulundurdukları hidrofilik ve hidrofobik özelliklerden dolayı moleküllerin taşınmalarında önemli rol oynarlar. Lipozom yapıları ilk kez 1968 yılında Sessa Wiessman tarafından ileri sürülmüştür. Lipozomların diğer biyolojik ajanlardan daha güvenli olduğu bilinmektedir. Lipozomlar aracılığıyla taşınan hormon, enzim, ilaç ve nükleik asitlerin salınımları daha yavaş gerçekleşmekte fakat salınım

süresinin oldukça uzun olduğu görülmektedir [71]. Lipozomlar başta tıp, biyomühendislik, gıda ve kozmetik sanayide yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir.

Lipozomlar başlıca beş yolla etki gösterirler:

1. Füzyon: Lipozomun en dış tabakasının hücre membranı ile birleşmesidir.
2. Adsorpsiyon: Lipozomun hücre yüzeyine sıkıca tutunmasıdır.
3. Lipit değişimi: Hücre membran yapısında bulunan lipitlerin lipozom yapısında bulunan lipitlerle karşılıklı değişimidir.
4. Endositoz: Hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içine alınmasıdır.
5. Hücre içine lipozom sızıntısı: Hücre ve lipozomun birebir temasının sonucu olarak lipozomların hücre içine girişi söz konusu olur. Bu giriş lipozomların serum albumini ve lipoproteinlerle etkileşimi sonucu meydana gelir.

Lipozomlar bileşim ve ilaç taşıma özelliklerine göre; konvansiyonel lipozomlar, katyonik lipozomlar, dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar ve immünolipozomlar olacak şekilde sınıflandırılabilir [87].

Lipozomları yapısal özelliklerine göre de sınıflandırmak mümkündür: multilameller büyük kesecikler (MLV, >0,5 mm), oligolameller kesecikler (OLV, 0,1-1 μm), tek tabakalı kesecikler (UV, her boyutta olabilir), küçük tek tabakalı kesecikler (SUV, 20-100 mm), orta büyüklükte tek tabakalı kesecikler (MUV), büyük tek tabakalı kesecikler (LUV, >100 mm), çok büyük tek tabakalı kesecikler (GUV, çapları 1 μm'den büyük), çok veziküllü kesecikler (MVV, genellikle 1 μm'den büyük) [88].

Yapılan son çalışmalarda lipozomlar kanser ve benzeri genetik temelli hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Eksik genlerin istenilen bölgeye nakledilmesi, yanlış eksprese olan genlerin susturulması ya da yeniden düzenlemesi gibi gen tedavi yöntemlerinde viral ajanların aksine oldukça güvenli, toksik olmayan ve hedefe yönelik aktarım gerçekleştiren yapılardır [71].

2.5. Artrit Hayvan Modelleri

Farelerde kollajen ile indüklenen artrit modeli (CIA) insan romatoid artriti ile (RA) hem immünolojik hem de patolojik özellikleri açısından benzerlik gösteren bir modeldir [72,73,74,75]. Bu nedenle RA patogenezini incelemek için CIA bir model olarak kullanılabildiği gibi yeni tedavi yollarını test etmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Model son derece tekrarlanabilir olmasına rağmen başarıyla artrit indüklemek için gerekli olan bazı dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Modelde kullanılacak hayvanlar sağlıklı ve genç (6-8 haftalık) olmalı ve hayvanlar spesifik patojen free ortamda bakılmalıdırlar. Genel olarak, viral veya bakteriyel enfeksiyonlar kolajene karşı immün yanıtı ve dolayısıyla artrit gelişimini etkileyebilir. Diyet de artrit sıklığı ve şiddeti üzerinde etkilidir. CIA oluşumu, farklı ticari olarak temin edilen fare yemi ile beslenmiş fareler de değişkenlik gösterir. Yüksek yağ içeriğine sahip diyet ile beslenen farelerde CIA insidansı daha yüksek olarak gözlenmiştir [75]. CIA duyarlılık açısından kullanılan hayvan ırkı da önemlidir. CIA duyarlı oldukları için iki fare ırkı bu modelde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu türler tavuk, sığır, domuz ve insan tip II kollajen yanıt veren DBA / 1 (H-2q) fareler ve sadece sığır ve domuz tip II kollajene güçlü, zayıf olarak da tavuk ve insan tip II kollajene yanıt veren B10.RIII (H-2r) farelerdir. Her iki fare türü de fare tip II kollajene zayıf yanıt verir ve bu fare türlerinin fare tip II kollajene karşı oluşturduğu serum antikor düzeyleri %1 arthritogenic seviyesinden azdır. Bu nedenle, artrit sadece fare tip II kollajen ile yoğun immünizasyondan sonra bazen gelişebilir (yaklaşık% 10) [74,75,76]. Diğer taraftan, CIA dayanıklı C57BL / 6, 129/Sv (H-2b), ve Balb / c (H-2d) farelerin de, İFN-γ veya İL-10 genleri silindiği zaman artritojenik otoantikorları üretme yeteneğine sahip olduklarını göstermektedir. Bu durum artrite duyarlılığın yüksek oranda sitokin çeşitliliğinin düzenlemesine bağlı olduğunu göstermektedir [76]. Bununla birlikte Balb/c fareler her ne kadar kollajen artirit indüklenmesine dirençli hayvanlar olsa da kollajen antikor ile indüklenen artirit modeline (CAIA) son derece duyarlıdır ve modeller de kullanılmaktadır [77,78]. Ayrıca, protokolde zamanlama ve yüksek dozda adjuvan kullanımı ile yanıtsız farelerde CIA oluşturulabildiği gösterilmiştir [80].

2.6. Artrit Modellerinde Gen Tedavisi

Gen tedavisi bazı hastalıkların ve bozuklukların engellenmesi ve/veya tedavisi için eksik genlerin yerine konması, hatalı olarak veya fazla çalışan genlerin susturulması ve bazı

genlerin işlevlerinin değiştirilmesi amacıyla genetik maddelerin hücrelere aktarılmasını kapsar. Genetik maddeler hücreye replikasyon yapamayan rekombinan virüsler (adenovirüs, adeno-assosiye virüs, lentivirüs v.b.) veya fiziksel/kimyasal yöntemler aracılığıyla transfer edilebilir.

Gen tedavi modellerinde en önemli sorun vektörlerin uygun hücreye yeterli düzeyde yönlendirilebilmesidir. Artrit hayvan modellerinde yapılan gen aktarım çalışmalarında sistemik (intravenöz, subkütan veya intraperitoneal) veya lokal (intrartiküler) gen transfer metodları denenmiştir.

Sistemik enjeksiyon ile gen transferi uygulamalarında karşılaşılan başlıca sorunlar şunlardır: 1) Transgenin yayılımının kontrol edilmesindeki eksikliğe bağlı yan etkilerin oluşması; 2) Kullanılan vektörlerin (özellikle viral vektörler ise) sebep oldukları immünojenite ve proinflamatuvar yanıt; 3) Terapötik moleküllerin olayın olduğu bölgeye yeterli derişimlerde ulaştırılabilmesi için yüksek dozda vektör enjeksiyonlarının yapılmasıdır. Bu nedenle, RA hayvan modellerinde intrartiküler olarak gen transferi ilk kez Bandara ve arkadaşları tarafından denenmiştir [80]. Bu çalışmada intrartiküler enjeksiyonun sağladığı avantajlar şu şekilde sıralanmıştır: 1) Olayın asıl meydana geldiği eklem boşluğuna ulaşmada kolaylık; 2) Çok daha düşük miktarda vektör kullanılması; 3) Daha fazla sayıda hedef hücrenin transfekte edilebilmesi; 3) Fibroblast benzeri sinviyositlerin mitotik hızları düşük olması nedeniyle uzun süreli transgen ekspresyonunun sağlanması.

Aslında, intraartiküler yolla yapılan gen transfer uygulamasında hangi hücrelere gen transferinin daha etkin olarak yapılabildiği henüz açık değildir. Bununla beraber, eklem bölgesinde yer alan sinoviyositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve kondrositlerin hepsi ilginç hedef hücrelerdir. Sinoviyositler, proinflamatuvar sitokin üretimine, osteoklastlar kemik destrüksiyonunda, osteoblastlar kemik rejenerasyonunda ve kondrositler eklem kıkırdağının yapımı ve tamirinde rol alırlar.

Bir diğer sorun ise viral veya non-viral vektör kullanımına karar vermede yaşanmaktadır. Gen tedavisinde sıklıkla kullanılan virüslere karşı gelişen immün yanıtlar ve sebep oldukları yangısal reaksiyonlar ve sitopatik etkiler bu vektörlerin kullanımını kısıtlayan başlıca faktörlerdir. Lipozom ve polimerler gibi viral olmayan stratejilerde ise önemli

problem gen ifadelerinin mitotik aktivitesi yüksek olan hücrelerde giderek azalması ve gen transfer etkinliğinin daha düşük olmasıdır. Ayrıca, yukarıda da belirtildiği gibi fibroblast benzeri sinoviyositlerin mitotik aktiviteleri düşük olduğu için uzun süren bir ekspresyon sağlanabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Solüsyon, Reaktif, Kit ve Plazmitler

3.1.1. Kullanılan solüsyonlar

Hücre besiyerleri

Tam RPMI-1640 (cRPMI-1640) besiyeri

Glutamin içermeyen RPMI-1640 (Lonza, Belçika) besiyerine ilave olarak %1 L-glutamin (Lonza, ABD), %1 penisilin/streptomisin (Lonza), %10 Fetal Sığırserumu (Lonza) eklenerek HeLa hücrelerinin kültüründe kullanıldı.

Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu (Euroimmun, Almanya)

L-Glutamin solüsyonu

100 mL'lik şişede ve 100 kat konsantre halde (200 mM) temin edilmiştir. 2 mM olacak şekilde RPMI medyuma eklendi.

Penisilin/streptomisin solüsyonu

100 mL'lik şişede ve 100 kat konsantre halde temin edilmiştir. İçinde 10000 U/mL penisilin sülfat ve 10 mg/mL streptomisin sülfat antibiyotik kokteyli bulunmaktadır. %1 olacak şekilde RPMI-1640 medyuma eklendi.

Fetal sığır serumu, FBS (Lonza, Belçika)

Isı ile inaktive edilmiş olarak temin edildi.

Tripsin/EDTA (Lonza, Belçika)

Dimetil sülfoksit, DMSO (Sigma Aldrich, ABD)

Hücre dondurma çözeltisi

%70 RPMI 1640 + %20 FBS + %10 DMSO

Western-Blot için kullanılan çözeltiler

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, Invitrogen,ABD)

- 30mL Running buffer, 570 mL ultra saf H2O ile tamamlanarak hazırlanmıştır

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X, Invitrogen, ABD)

- Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, Invitrogen, ABD)
- Nu-PAGE Antioksidant (Invitrogen, ABD)
- Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad,ABD)

% 4-12 gradient, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1 mm, 12 kuyucuk (Invitrogen, ABD)

10X pH: 7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base 24,23 g (Scharlau, İspanya) NaCl (Merck, Almanya) 80,06 g ve 5 mL Tween20 (Dako, ABD) 1L ultrasaf H2O eklenerek çözülmüştür.

- Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, İngiltere)
- Phototope®-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, ABD)

Opti-MEM (Gibco, ABD)

- Hazır olarak temin edildi

RIPA buffer (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD)

Proteinaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, ABD)

3.1.2. Hücrelere ve hayvanlara uygulanan reaktifler

- Rekombinan insan Tümör nekrozis alfa (TNF-α) (Biolegend, ABD)
- Rekombinan insan interlökin-1beta (İL-1β) (Biolegend, ABD)
- Lipopolisakkarit (LPS) (Sigma Aldrich ABD)
- Sığır tip II Kollojen (Sigma Aldrich, ABD)
- Freund'un komplet adjuvanı (Sigma Aldrich, ABD)

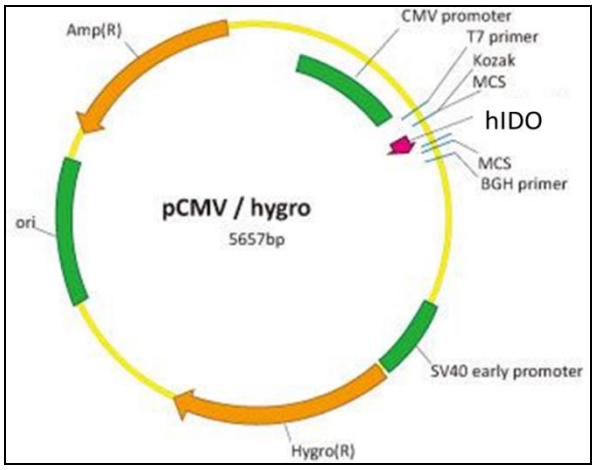
3.1.3. Kullanılan hazır kitler

- İnsan IDO ELISA (Cloud-Clone Corp., ABD)
- CAT ELISA (Roche, ABD)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Almanya)
- HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Almanya)
- Total RNA İzolasyon Kiti (Ez-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit; Bio Basic Inc., ABD)
- Komplemanter DNA (cDNA) Sentez Kiti (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermantas, ABD)
- Syber Green Master Mix (Roche, ABD)
- BCA Protein Ölçüm Kiti (Thermo Scientific BCA Protein Assay, ABD)

3.1.4. Plazmitler

pCMV/hIDO

İnsan İDO geni ticari olarak h*IDO* geni pCMV/hygro vektörü içinde (Sino Biological, Çin) temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. pCMV/ hygro vektörü ve sekans referans noktaları [79]

pELAM-1pro./CAT

H. Barbaros Oral'ın doktorası sırasında kendisi tarafından klonlanmıştır.

pCAT/control (Promega, ABD)

pCAT/Basic(Promega, ABD)

pCMV/β-gal(Invitrogen, ABD)

pCMV/GFP

Prof. Dr. İhsan Gürsel'den (Prof. Dr. İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilkent, Ankara) sağlanmıştır.

3.2. ELAM-1 Promotorun İnsan IDO (*hIDO*) Geninin Ön Kısmına Klonlanması

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında daha önce gerçekleştirilen yüksek lisans tezi kapsamında [81] ticari olarak h*IDO* geni pCMV/hygro vektörü içinde (Sino Biological) temin edilmiş ve bu vektörden CMV promotor bölgesi restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkartılmış, ELAM-1 promoter bölgesi bu bölgeye klonlanmıştır. ELAM-1 promotor bölgesi restriksiyon enzimleri içerecek şekilde tasarlanan primerler ile çoğaltılarak öncelikli olarak pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır. Vektöre klonlanan ve restriksiyon enzim bölgeleri içeren ELAM-1 promoter bölgesi daha sonra bu vektörden kesilerek çıkartılmış ve pCMV/hygro

vektöründen CMV promotor bölgesinin yerine klonlanmıştır. E.Coli takibinde elde edilen ve ticari olarak temin edilen plazmitler E.Coli hücrelere aktarılmıştır. Bu hücreler LB agarda çoğaltılıp kolonilerden hücreler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. -20C°'de saklanan bu plazmitler hücre kültürüne aktarılmak üzere hazırlanmıştır.

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan HeLa (CCL-2) (İnsan servikal kanser) hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiştir. Çalışmalar sadece laboratuvar koşullarında yapılmıştır.

3.3.1. Donmuş hücrelerden kültür yapılması

ATCC'den soğuk zincirle temin edilen dondurulmuş hücreler, hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Hücre süspansiyonunun uygun şekilde erimesi sağlanmış ve 15 mL falkon tüp içerisine 10 mL RPMI 1640 (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) besiyeri eklenerek, üzerine çözülen hücre süspansiyonu eklenip birkaç kez yavaşça pipetleme yapılmıştır.

Hücrelerin bulunduğu falkon tüp 4 °C'de 6 dk 700 rpm'de santrifüj edilmiştir. Biyogüvenlik kabinine alınan falkon tüp içerisindeki hücrelerin besiyeri aspire edilerek 5 mL taze besiyeri eklenip birkaç kez otomatik pipetle karıştırılarak 25 cm^2'lik steril (Orange scientific) flask içerisine alınmıştır. Hücreler 37 °C, %5 CO2 içeren etüvde bekletilerek çoğalmaları sağlanmıştır.

3.3.2. Hücrelerin ayrılması ve pasajlanması

25 cm^2 flask içerisindeki hücreler mikroskopla incelenerek %80 doluluk oranına sahip olduğunda biyogüvenlik kabini içerisine alınıp, eski besiyeri aspire edilir. 2 kez 5 mL HBSS (Lonza) ile yıkanıp aspire edilir. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 500 µL (Gibco) %0,25 Tripsin-EDTA (1X) eklenmiş ve 5 dakika 37°C, %5 CO_2 içeren etüvde bekletilmiştir. Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskobunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla 10 mL cRPMI-1640 besiyeri eklenmiştir. Flask içinde 12 mL olan hücre süspansiyonu, 50 mL hacmindeki falkona alınarak hücreleri birbirinden ayırmak için

birkaç kez pipetaj yapılmıştır. Steril ependorf tüpü alınıp içine 20 µL tripan mavisi (Sigma Aldrich) çözeltisinden ve 20 µL hücre süspansiyonundan alınarak pipetleme yapılmış ve 2 dakika ve 37 °C %5 $C0_2$ içeren etüvde bekletilmiştir. Işık mikroskobunda hemositometri ile sayılarak mL'deki toplam hücre sayısı bulunmuştur. cRPMI-1640 besiyeri ile uygun sulandırma yapıldıktan sonra hücreler 75 cm^2 flasklar içerisine aktarılıp 37°C, %5 CO_2 içeren etüvde çoğalmaları sağlanmıştır.

3.4. pELAM-1pro./hIDO Plazmitinin HeLa Hücrelerine Transfer Edilmesi

Bir gece önceden 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına $2x10^5$ hücre olacak şekilde HeLa hücreleri ekilmiştir. Plazmit transferi Lipofectamine 2000 (Invitrogen) marka lipozom ile üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır. Kuyucuk başına 4 µg plazmit ve 7,5 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılmıştır.

4 kuyu için hesaplanan 48 µL pELAM-1pro./ hIDO plazmiti 1952 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. 30 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) lipozom 1970 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Lipozom ve plazmit karışımları tek bir tüp içerisinde karıştırılarak 15 dk bekletilmiştir.

Pozitif kontrol olarak sürekli ekspresyon sağlayan CMV promotoru bulunduran pCMV/hIDO plazmiti, negatif kontrol olarak ise uygunsuz bir plazmit olan pCMV/βgal plazmiti kullanılmıştır. 2 kuyu için 66 µL pCMV/hIDO plazmiti 934 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Ayrı bir tüpte 15 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) lipozom 985 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Lipozom ve plazmit karışımları tek bir tüp içerisinde karıştırılarak 15 dk bekletilmiştir.

2 kuyu için hesaplanan 23,4 µL pCMV/βgal plazmiti 978 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Ayrı bir tüpte 15 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) lipozom 985 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Lipozom ve plazmit karışımları tek bir tüp içerisinde karıştırılarak 15 dk bekletilmiştir.

Örnekler uygun kuyucuklara 2 mL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri üzerine 1 mL olacak şekilde eklenmiş ve 24 saat 37ºC sıcaklık ve %5 CO_2 içeren etüvde bekletilmiştir.

24 saat sonunda kuyucuk içerisindeki besiyerleri aspire edilmiş ve 2 mL taze RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri eklenmiş ve eklenen besiyerleri üzerine 2 ayrı doz olan 2 ng/mL ve 5 ng/ mL İL-1β ile stimüle edilerek 24 saat 37ºC sıcaklık ve %5 CO_2 içeren etüvde bekletilmiştir.

24 saat sonra kuyucuklar içerisindeki besiyeri aspire edilerek 2 mL PBS (Euroimmun) ile 2 kez yıkanmıştır. 2 kez 500 µL PBS (Euroimmun) eklenerek kazıyıcı ile kazınan hücreler, steril ependorf tüplere alınarak daha sonra analiz edilmek üzere -80ºC dondurucuda saklanmıştır.

3.4.1. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen hela hücrelerindeki IDO ekspresyon seviyesinin belirlenmesi

3.4.2. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen HeLa hücrelerindeki total protein miktarının belirlenmesi

RIPA 10x solusyonu 1x olacak şekilde sulandırılır ve proteinaz eklenir. Hazırlanan RIPA solüsyonu soğuk ortamda buz üzerinde muhafaza edilmiştir. -80°C'den çıkarılan ve soğuk ortamda bekletilen hücreler soğutmalı santrifüjde (4°C) 12000 rpm devirde 5 dakika santrifuj edilmiştir. Hücrelerin süpernatanı atılmıştır. Hücre pelletlerine 300 µL RIPA eklenip buz üzerinde yer alan bir sporda pipet yardımı ile al-ver yapılmıştır. 30 dakika boyunca buz içersindeki hücre örnekleri her 5 dakikada bir insülin iğnesi ile al-ver yapılarak karıştırılmıştır. Önce vortekslenip 30 dakika 13000 rpm devirde soğutmalı santrifüjde (4°C) döndürülmüştür. Süpernatanlar alınıp ependorflarda alikotlanır, hücre pelleti atılmıştır.

Bu şekilde oluşturulan numunelerde Thermo Scientific BCA Protein Assay kiti ile total protein düzeyleri ölçülmüştür. PBS ile standartlar sulandırılmıştır (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/mL ve 0). Numuneler va standartlar oda sıcaklığına getirilmiştir. 96 kuyucuklu plağa sırayla 25 µL olacak şekilde numuneler va standartlar pipetlenmiştir. 200 µL kite ait Working Reagent solüsyonu tüm kuyulara pipetlenip plak üzeri kapatılmıştır. 30 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde plak 562 nm'de spektrofotometre (Flash Scan S12/ Analytikjena, Almanya) okutulmuştur.

HeLa hücre hatlarından elde edilen lizatların total protein derişimlerini standart eğriye göre belirlendikten sonra kuyulara yüklenecek örneklerin protein derişimleri 35 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.4.3. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen HeLa hücrelerindeki IDO ekspresyon seviyesinin ELISA ile belirlenmesi

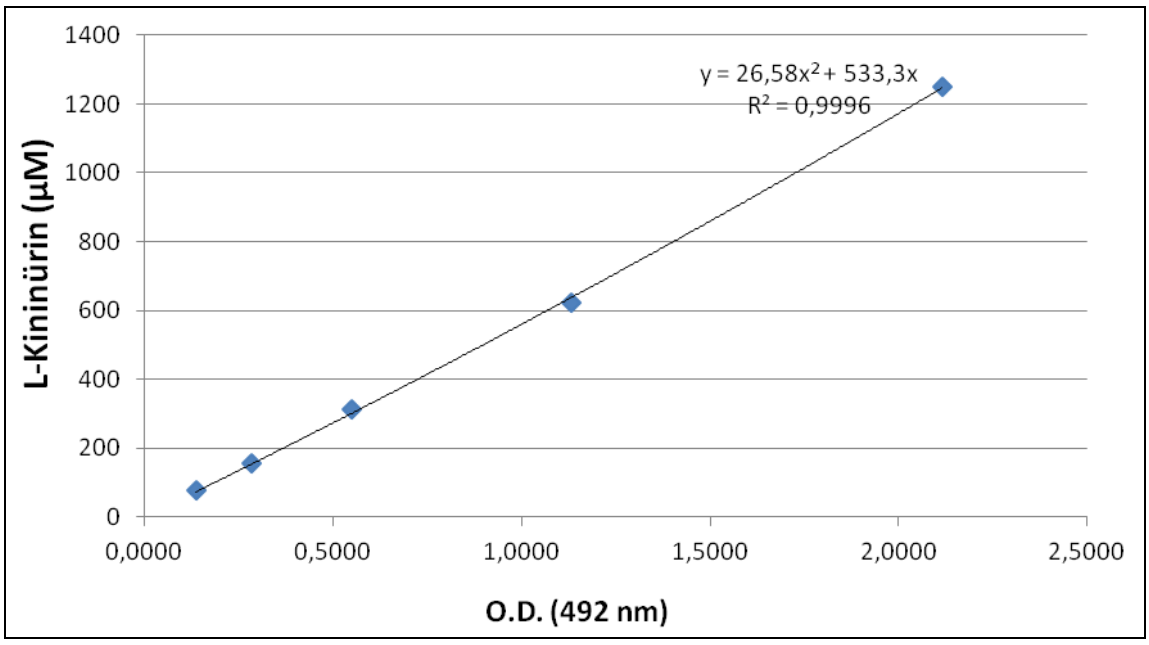
Yöntemde kullanılan Sandviç ELISA IDO (İnsan indolamin-2, 3- dioksijenaz) proteininin kantitatif olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Cloud-Clone Corp. (ABD) markalı kit üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde kullanılmıştır. -80ºC'de saklanan hücre örnekleri 3 kez 1'er saat arayla -80ºC'de dondurulup çözülerek hücre içeriklerinin PBS'e (Euroimmun, Almanya) geçmesi sağlanmıştır. Örnekler +4ºC soğutmalı santrifüjde 10 dk 1500 g'de çöktürülmüştür. Çöken hücreler uzaklaştırılarak steril ependorf içerisine alınan üst faz, testte kullanılmak üzere saklanmıştır. Örnekler, kör örnek (blank) ve testin standart örnekleri için kuyucuk sayısı belirlenir. Testin toplamda yedi farklı derişimde standart dilüsyonları hazırlanmıştır.

Standart solüsyonunun ilk derişimi 40 ng/mL'dir. Standart solüsyon oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve ardından ilk pipetlenecek olan derişime seyreltilmiştir. Kuyucuklara pipetlenecek olan standartlar sırasıyla 20 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,312 ng/mL ve son olarak standart seyreltme solüsyonu 0 ng/mL'dir. Standartlar başta olmak üzere, kör örnek (blank) ve transfekte edilen hücre lizat örnekleri 100 µL olacak şekilde kuyucuklara pipetlenerek kaplama kağıdı ile sarılmış 2 saat 37 ºC'deki etüvde bekletilmiştir. Kuyucuklardaki tüm sıvılar boşaltılmıştır. Bu aşamada yıkama tamponu ile yıkama yapılmamıştır. Kuyucuklar içerisine, Detection Reagent A solüsyonu 100 µL olacak şekilde pipetlenmiş kaplama kağıdı ile sarılarak 1 saat 37 ºC'deki etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki sıvılar boşaltılarak Yıkama Tamponu (1X) ile kuyucuk başına 350 µL olacak şekilde 1-2 dakika bekletilerek 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuklar dikkatli bir şekilde kurutulduktan sonra her kuyucuğa 100 µL Detection Reagent B solüsyonu eklenmiş ve kaplama kağıdı ile sarılarak 1 saat 37 ºC'deki etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki sıvılar boşaltılarak Yıkama Tamponu (1X) ile kuyucuk başına 350 µL olacak şekilde 1-2 dakika bekletilerek 5 kez yıkanmıştır.

Kuyucuklar dikkatli bir şekilde kurutulduktan sonra her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu eklenmiş kuyucuklardaki renklerin maviye dönüştüğü görülmüştür. 37ºC'lik etüvde ışık görmeyecek şekilde 20 dakika bekletilmiştir. 30 dk süreyi geçmeden 50 µL Stop Solüsyonu tüm kuyucuklara pipetlenerek zaman kaybetmeden 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Flash Scan S12/ Analytikjena, Almanya) okutulmuştur.

3.4.4. İDO aktivite testi

IDO enzimatik aktivitesinin ölçümü için yöntem denemesi yapılmıştır. IDO aktivitesi triptofan metaboliti olan L-kininürenin derişiminin kalorimetrik ölçümü ile gerçekleştirilmiştir [80]. Bunun için 2x IDO buffer hazırlanmıştır (100 mM PBS, 40 mM Askorbik asit, 20 µM Metilen mavisi, 200 µg katalaz ve 800 mM triptofan, pH 6,5). Hazırlanan L-kininürenin standartları eşit miktardaki buffer ile muamele edilmiştir. Ardından 30 dk 37ºC de inkübe edilmiştir. Üzerlerine %30 TCA (trikloro asetik asit) (Sigma Aldrich, ABD) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Ardından 30 dk 52ºC'de tekrar inkübe edilmiştir. Kısa bir santrifüjü takiben süpernatan alınarak eşit miktardaki Erlich ayıracı ile renk değişimi gözleninceye (10 dk) kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 492 nm'de okunmuştur. Standart eğri grafiği L-kininürenin µM cinsinden absorbsiyonu çizilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. IDO aktivite ölçüm metodu standart eğrisi

3.4.5. Western Blot analizi

Sample Buffer ve Reducing agent 1X olacak şekilde 0,5 mL'lik tüplere pipetlenmiştir. Tüpler 95 ºC'lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek proteinlerin lineer hale gelmesi sağlanmıştır. Bu sırada jel, elektroforez tankına yerleştirilmiş ve SDS Running buffer tankın üst sınırına kadar doldurulmuştur. Kullanılan hazır jel üzerindeki koruyucu sıvı dikkatli bir şekilde dökülmüş ve kuyucukların içerisindeki hava pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. SDS Running buffer içerisine 500 µL antioksidant eklenmiştir. Prestained Markörden (Cell Signaling Technology, Hollanda) 5 µL ve örnekler hesaplanan miktardaki hacimlerde dikkatli bir şekilde kuyulara yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra protein degredasyonunu önlemek için tank +4 ºC'de 150V'de 60 dakika yürütülmüştür.

Transfer işleminde I-Blot jel transfer cihazı (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Anot (+) bakır en üste gelecek şekilde, jel, ddH_2O ile ıslatılmış filtre kağıdı, katot (-) bakır ve sünger olacak şekilde sırasıyla yerleştirilmiştir. Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde 7 dk boyunca jelden membrana transfer işlemi gerçekleştirilmiştir.

GAPDH için öncelikli olarak %5'lik süt (Cell Signaling Technology) çözeltisi hazırlanarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edilmiştir. Bir saatin sonunda membran TBS-T ile 3'er kez 5 dakika yıkanmıştır. Birincil antikor olan GAPDH antikoru (Cell Signalling Technology) 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA çözeltisinde hazırlanmıştır. +4 ºC'de 18 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve süre sonunda TBS-T ile 3'er kez 5 dakika yıkanmıştır. İkincil antikor olarak GAPDH için Anti-Rabbit (Cell Signalling Technology) 1:2000 oranında %5'lik süt çözeltisinde hazırlanmış ve 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda TBS-T ile 3'er kez 5 dakika yıkanmıştır.

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak için Stripping Tamponu (Cell Signalling, ABD) üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde kullanılmıştır. TBS-T ile yıkanan membranın üstünü kaplayacak şekilde stripping tamponu eklenir, alüminyum folyo ile üzeri kapatılarak 50 ºC'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran 6 kez 5'er dakika bekletilerek TBS-T ile yıkanmıştır. IDO antikorunu uygulamadan önce TBS-T içerisinde %5'lik yağsız süt tozu (Cell Signaling, USA) çözeltisi hazırlanarak membranı kaplayacak şekilde eklenmiş

ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır. Birincil antikor olan IDO antikoru (Cell Signaling Technology), 1:1000 oranında %5 BSA çözeltisi içerisinde hazırlanarak +4 ºC'de 18 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır. IDO için Anti-Rabbit (Cell Signaling Technology) 1:2000 oranında %5 BSA çözeltisinde hazırlanarak çalkalayıcıda 60 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır.

Görüntüleme işleminde membranın üzerini kaplayacak kadar Luminita Forte (Fisher Scientific) HRP substuratı içeren solüsyon eklenmiş ve 30 saniye oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kemiluminesans sinyalini görüntülemek için Fusion FX-7 (VilberLourmat, Torcy, Fransa) cihazı kullanılmıştır. Membran üzerindeki proteinlere özgü antikorların bağlanmasıyla görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.5. Hayvan Modeli Çalışmaları

3.5.1. Balb/c farelerde lokal artrit oluşturulması

CIA modelinin oluşturulması için Collagen bovine nasal septum (Sigma C7806 10mg) ve Freund's Adjuvant Complete (CFA) (Sigma F5881 10mL) kullanılmıştır. Balb/c farelerde başarılı ve en uygun CIA modeli oluşturabilmek amacıyla, cinsiyet farkını görebilmek için dişi ve erkek farelerde intraperitoneal (i.p), intraartiküler (i.a.) ve subkutan (s.c.) enjeksiyon denemeleri yapılmış ve karşılaştırılmıştır.

Kollajen derişimi 2mg/mL olacak şekilde 0,1 M asetik asit içerisinde çözülmüştür. Balb/c farelerde (DBA/1'dekilere benzer olarak) RA-benzeri artiritin indüksiyonu için uygulanan yöntemler içerisinde diğerleri ile karşılaştırıldığında intraartiküler enjeksiyon belirgin şekilde hem klinik olarak hem de histopatolojik olarak artrit oluşturmuştur [95].

Bu deneyler sonucunda Balb/c farelerde lokal artrit oluşturmak için en etkin protokol aşağıdaki gibidir:

- 0. gün: Hayvan başına 0,01 mL 2mg/mL kollajen i.a. + 0,1 mL CFA s.c.
- 14. gün: Hayvan başına 0,01 mL 2mg/mL kollajen ia + 0.1 mL CFA s.c.

- 21. güne kadar artrit gelişimi takibi.

Artritin klinik değerlendirilmesi Pençe yangısının şiddetini değerlendirmek için kullanılan nitel puanlama sistemi;

Normal- 0 PUAN;

- Ayak bileğinde ve bazı pençelerde hafif kızarıklık şişlik-1 PUAN;
- Ayak bileğinde ve bazı pençelerde orta kızarıklık şişlik-2 PUAN;
- Ayak bileğinde ve tüm pençelerde şidetli kızarıklık şişlik-3 PUAN;
- Çoklu eklem tutulumu ile maksimum iltihaplı uzuv-4 PUAN.

Ayrıca, eklem kalınlıkları kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülerek değişimler kaydedilmiştir.

Artrit oluşturulan farelere intrartiküler lipozom aracılı gen transferi, optimizasyon çalışmalarının ardından en yüksek gen transferi etkinliğini sağlayan koşulda sağlanmıştır.

3.5.2. Histopatolojik inceleme

Deneyler sonrası %10'luk formalin solüsyonu içerisine örneklenen dokular histopatolojik muayene için rutin olarak işlenmiştir. Örnekler tespit işlemi için formalin solüsyonunda 48 saat boyunca 37°C'lik inkübatörde bekletilmiştir. Tespit sonrası eklemleri de içerecek kesitlerin alınması için dokular dekalsifikasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu amaçla Kemik dokunun dekalsifikasyonu için dokular 13 gün boyunca %10'luk etilen di-amin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonunda bekletilmiştir. Dokular 3 gün ara ile kontrol edilmiştir ve %10'luk EDTA solüsyonu her kontrol sonrasında değiştirilmiştir. Dekalsifiye olan dokular (14. gün) PBS ile oda ısısında 2 kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası uygulanan post-fiksasyon basamağını takiben dokular rutin olarak işlenmiştir. Dereceli alkol ve ksilol solüsyonundan geçirilen dokular parafine gömülmüştür ve doku bloklarından 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin ile boyanmıştır ve ışık mikroskobunda incelenmiştir. Hazırlanan kesitlerde deri, deri altı dokular, eklem kapsülası, sinoviyal membran, eklem yüzeyleri ve kemik doku muayene edilmiştir.

3.5.3. Dokuda X-Gal boyanması

Artritin geliştiği yangı bölgesinden dokular alınmıştır. Bu dokular numaralandırılmış kasetler içerisinde PBS içinde hazırlanan %2'lik paraformaldehit (PFA) solüsyonuna alınarak 1 saat oda ısısında tespit edilmiştir.

Kemik dokunun dekalsifikasyonu için dokular 13 gün boyunca %10'luk etilen di-amin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonunda bekletilmiştir. Dokular 3 gün ara ile kontrol edilmiş ve %10'luk EDTA solüsyonu her kontrol sonrasında değiştirilmiştir. Dekalsifiye olan dokular PBS ile oda ısısında 2 kez yıkanmıştır.

Dokular önceden hazırlanan X-gal boya solüsyonuna alınarak 30 ^{o}C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Boyama işleminin ardından dokular PBS ile oda ısısında yıkanmıştır. Post fiksasyon amacı ile dokular PBS içerisinde hazırlanan %4 PFA solüsyonunda +4 ^{o}C'de 1 gece bekletilmiştir.

Ertesi gün dokular PBS içerisinde 1 saat yıkandı ve rutin histolojik prosedür uygulanmıştır. Dokular değişik derecelerde [70, 96, 100] alkol, ksilol ve parafin serisinden 1'er saat süreyle geçirilerek, granüllü, 58-60^{o}C'de eriyen parafinle bloklanmıştır. Parafin bloklardan yarı otomatik mikrotomla 5 µm kalınlığında alınan kesitler % 20'lik lizinle hazırlanmış lamlara çekilmiş ve 37 ^{o}C'de 1 gece kurutulmuştur. Kesitler deparafinizasyon işleminin ardından distile suda yıkandı ve karşıt boyamasının yapılması amacı ile % 0,1 nükleer fast red boyası ile 5 dakika oda ısısında boyanmıştır. Boyanın fazlasının alınması amacıyla çeşme suyunda ardından da distile suda yıkanmıştır. Kesitler gliserin jel kullanılarak lamelle kapatıldı ve oda ısısında kurutulmaya bırakılmıştır.

Balb/c fare eklem boşluğuna GFP raportör geni taşıyan pCMV/GFP, Lipofectamin 2000 ile kompleks oluşturularak insülin enjektörü ile eklem içine uygulanmıştır (C) ve (D). Kontrol olarak uygunsuz plazmit pCAT/control kullanıldı (A) ve (B). 24 saat sonra sakrifiye edilen farenin ekleminden alınan kesitler Fluoresan mikroskop altında değerlendirilmiştir.

3.5.4. Dokularda CD4 ve CD68 immünohistokimyasal boyanması ve değerlendirilmesi

Ötenazisi gerçekleştirilen hayvanlardan alınan dokular, numaralandırılmış kasetler içerisinde PBS içinde hazırlanan %2'lik paraformaldehit (PFA) solüsyonuna alınarak 2 gün +4ºC' de tespit edilmiştir. Kemik dokunun dekalsifikasyonu için dokular 1 ay boyunca %10'luk etilen di-amin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonunda +4 ºC'de bekletilmiştir. Dokular 3 gün ara ile kontrol edildi ve %10'luk EDTA solüsyonu değiştirilmiştir. Dekalsifiye olan dokular distile su ve ardından PBS ile yıkandı ve rutin histolojik prosedür uygulanmıştır. Dokular değişik derecelerde (%50, %70, %96, %100) alkol, ksilol ve parafin serisinden 1'er saat süreyle geçirilerek, 58-60ºC'de eriyen parafinle bloklanmıştır. Parafin bloklardan yarı otomatik mikrotomla 5 µm kalınlığında alınan kesitler hazır lizinli lamlara çekilmiş ve 37 ºC'de 1 gece kurutulmuştur. Kesitlerde CD4'ün varlığı immunohistokimyasal yöntemlerden indirekt strepteavidin-biotin-kompleks yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

Kesitler, her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere değiştirilerek ksilolde deparafinizasyon yapılmıştır. Ardından her biri 5'er dakika olmak üzere 2 kere absolu alkol ve bir kere %96'lık, %80'lik ve %70'lik alkollerden geçirilmiştir. Daha sonra preparatlar önce distile suda daha sonra PBS içerisinde 5 dakika yıkanmıştır. Antijen retrieval için preparatlar sitrat solüsyonu (pH 6,0) içinde mikrodalga fırında 5 dakika kaynatılmış ve oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan kesitler PBS ile her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kere yıkanmıştır. Preparatlardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutulmuştur. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra kesitlerin kurumasını önlemek amacı ile kesitler nemli bir ortam içerisine konulmuştur. Kesitler spesifik olmayan boyanmayı önlemek üzere bloklama solüsyonu ile oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Boyama sırasında her kesitten bir normal bir de negatif kontrol preparatı hazırlanmıştır. Her boyamada pozitif kontrol kesitleri de boyanmıştır. CD4 antikoru için dalak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Normal preparatlar ve pozitif kontrol preparatları 1:200 oranında sulandırılmış, CD4 antikoru ile negatif kontrol preparatları ise antikor sulandırma solüsyonu ile oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. CD68 antikoru için kemik iliği pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Normal preparatlar ve pozitif kontrol preparatları 1:2000 oranında sulandırılmış CD68 antikoru ile negatif kontrol preparatları ise antikor sulandırma solüsyonu ile oda ısısında 1 saat

inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kesitler PBS ile yıkanmıştır. Preparatlar sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş, PBS ile yıkanmıştır. HRP-Strepteavidin ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır, PBS ile yıkanmıştır. Bütün preparatlar hazırlanan DAB kromojeni ile 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Distile su içinde 5 dakika yıkanmıştır. Karşıt boyama için Harris hematoksileninde 45 saniye tutulmuştur. Akarsuda ve ardından distile su da yıkanmıştır. Hızlı bir şekilde seri alkollerden geçirilerek ksilolde parlatılmıştır. Entellan ile kapatılmıştır.

İmmunohistokimyasal değerlendirme; hedef hücrelerin boyanıp boyanmamasına ve boyanan hedef hücrelerdeki boyanma yoğunluğuna bakılarak yapılmıştır. Değerlendirme iki bağımsız gözlemci tarafından boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++), şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için GraphPad Software'in (San Diego, CA) Prism 5 Programı kullanılmıştır. Verilerin ortalama ± standart sapma değerlerinin analizi, tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics testi ile yapılmıştır. Bağımsız olarak en az 3 adet yapılan deney tekrarlarından elde edilen gruplar arası farklılıkları saptamada Kruskal-Wallis varyans analizi yapılmıştır. $p<0.05$ olarak tespit edilen değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. E-selektin Promotor Kontrolünde İnsan IDO (hIDO) Genini Eksprese Eden Plazmitin Klonlanması

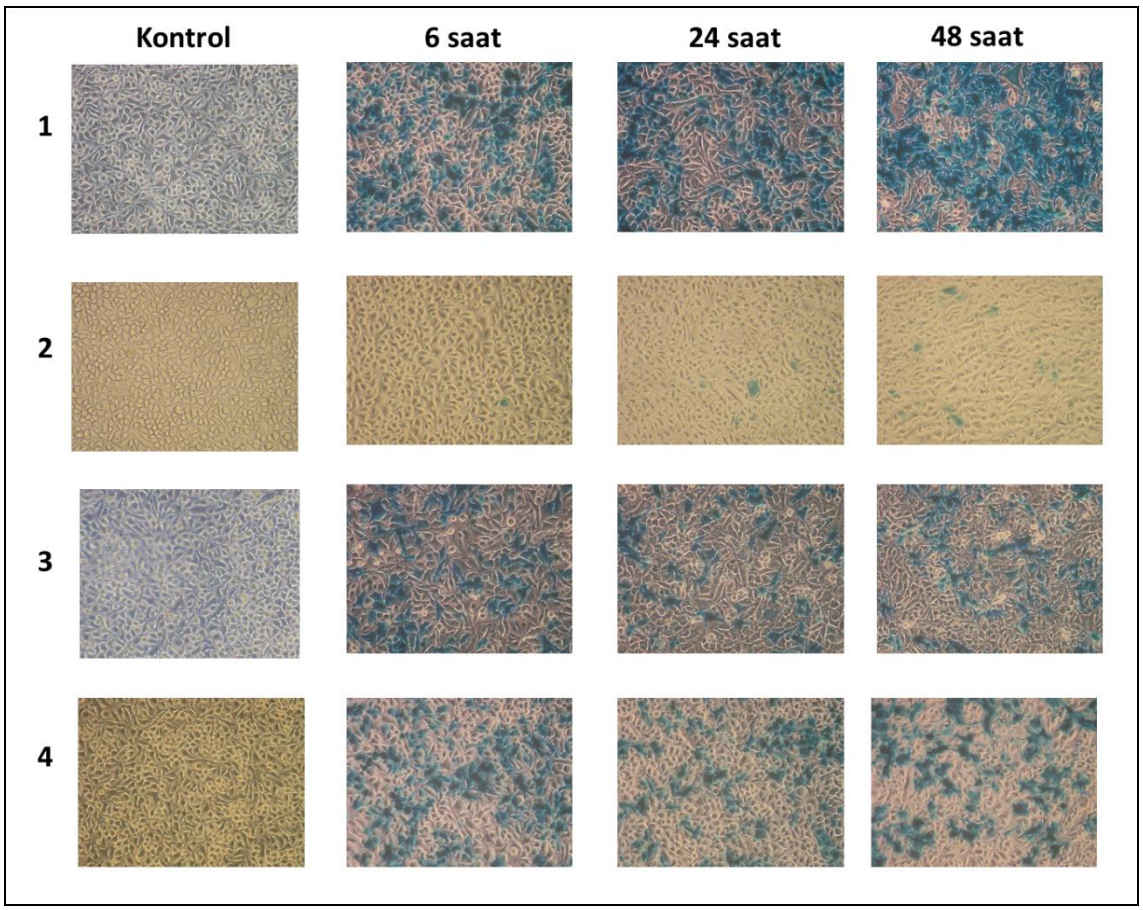
E-selektin promotor kontrolünde insan IDO (hIDO) genini eksprese eden plazmit Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Anabilimdalı laboratuvarında daha önce gerçekleştirilen yüksek lisans tezi kapsamında klonlanmıştır [79]. ELAM-1 promotor bölgesinin çoğaltılması için hazırlanmış olan primerler kullanılarak PZR gerçekleştirilmiş ve genler ticari olarak satın alınan plazmitten kısmi olarak çoğaltılmıştır. Kesilen bantlar 3' ucuna A takılan ELAM-1 promotor bölgesi pGEM-T Easy (Promega) vektörüne DNA ligaz kullanılarak klonlanmıştır. Klonlama sonrasında ligasyon ürünü kompetan *E. coli* hücrelerine aktarılarak, transforme olmuş hücreler ampisilin içeren ortamda çoğaltılarak ve rekombinant vektör ise β Galaktosidaz aktivitesi kullanılarak seçilmiştir. β Galaktosidaz aktivitesi göstermeyen beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu için kullanılmıştır.

Plazmitler miniprep yapılarak izole edildikten sonra ELAM-1promotor bölgesinin plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *SacI* ve *MLuI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesilen bantlar pCMV/hIDO vektörüne aktarılmaları sağlanmıştır. Klonlama yapılması için aynı enzimler ile pCMV/hIDO vektöründen CMV promotor bölgesi çıkartılmıştır. Enzimlerle kesim sonrası ekspresyon promotoru (590 bç) çıkartılarak yerine ELAM-1 promotor bölgesi (483 bç) klonlanmıştır. Bu şekilde *hIDO* geni ELAM-1 promotor aktivitesi altında seçici olarak eksprese olacak şekilde hazırlanmıştır.

4.2. Hücre Hattına Uygun Gen Transferi Yöntemlerinin Optimizasyonu

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji A.D. Laboratuvarında daha önce gerçekleştirilen yüksek lisans tezi kapsamında HeLa hücre hattına en uygun gen transfer yöntemi belirlenmiştir [81]. Çalışmada kolay transfekte edilebilmesi nedeniyle HeLa hücreleri kullanılmıştır. HeLa hücrelerin kültürü için %10 fetal sığır serumu, L-glutamin, penisilin ve streptomisin içeren RPMI1640 kullanılmıştır. Öncelikle farklı lipozom preparatlarının (4 farklı ticari marka: Lipofectamin 2000 (Invitrogen), Attractene (Qiagen), X-tremeGENE 9 (Roche); ve FuGENE HD (Promega)) pCMV/β-gal ile transfekte edilen

hücrelerin transfeksiyonu takip eden 24 saat içerisinde X-gal boyanması yapılmıştır ve % transfekte hücre oranları saptanmıştır. Transfeksiyon etkinliğini ve toksisitesini değerlendirme deneyleri sonucunda mikroskobik incelemede, en fazla etkinlik ve en düşük toksisite gösteren transfeksiyon ajanı Lipofectamine 2000^{TM}'in tüm deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. HeLa hücre hattına ticari lipozom/polimer ile gen transfer etkinliğinin karşılaştırılması

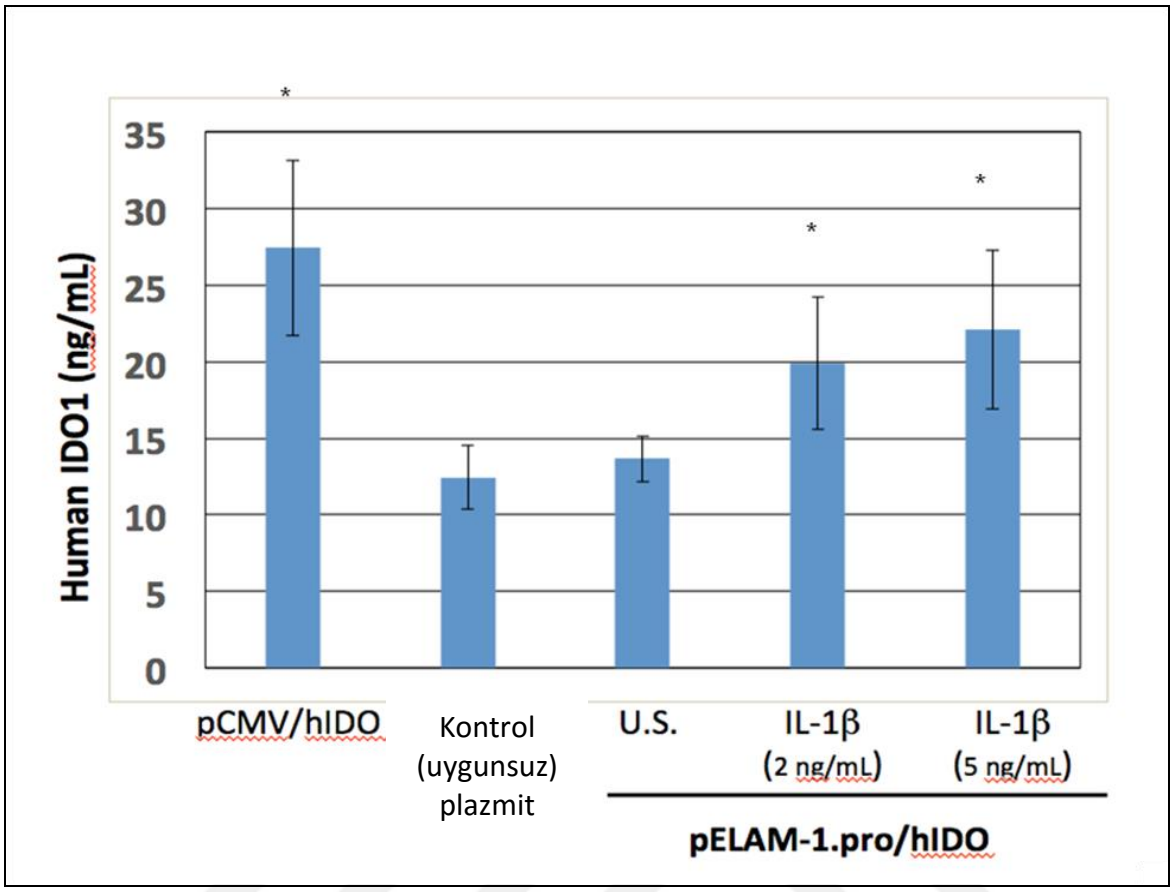
Farklı firmalardan alınan lipozomların transfeksiyon etkinliklerinin saptanması için HeLa hücreleri firmaların bu hücreler için önerdikleri lipozom:DNA oranları ve farklı inkibasyon süreleri (6, 24 ve 48 saatler) transfekte edildi. İnkübasyon sonunda X-gal boyama ile ışık mikroskopunda 20X büyütmeli objektif ile incelenerek fotoğraflandı. (1) Lipofectamin 2000, (2) Fugene HD, (3) Attractene (Qiagen), (4) X-tremeGENE 9 (Roche) [81].

4.3. pELAM-1pro./hIDO ile Transfekte HeLa Hücrelerde İDO İndüklenebilirliğinin Gösterilmesi

pELAM-1.pro/hIDO ile transfekte edilen HeLa hücreler farklı dozlarda İL-1β (2 ng/ml ve 5 ng/ml) ile 24 saat süre ile uyarılmıştır. Kontrol olarak hIDO geninin yapısal olarak transkripsiyonuna neden olan CMV promotora sahip pCMV/hIDO, negatif kontrol olarak hIDO geni yerine başka bir raportör gene sahip olan pCMV/βgal (uygunsuz plazmit) kullanılmıştır. Uyarıyı takiben hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak hücre kazıyıcı (cell scraper) ile kazınıp 3 kez dondurma ve çözme yapılarak lize edilmiştir. hIDO düzeyleri saptanana kadar porsiyonlanarak -80^{o}C derin dondurucuda saklanmıştır.

4.3.1. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte HeLa hücrelerde ELISA yöntemi ile hIDO düzeylerinin ölçümü

Hücre lizatlarındaki hIDO düzeylerinin ölçümü için ticari ELISA testi uygulanmıştır. İndüklenebilir hIDO düzeylerinin İL-1β ile uyarılmayı takiben 24 saat içinde arttırıldığı, ancak 5 ng/mL İL-1β ile daha belirgin olarak yükseldiği gösterilirken, uyarılmamış hücrelerde hIDO düzeylerinin uygunsuz plazmit ile transfekte hücrelerdekine benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).

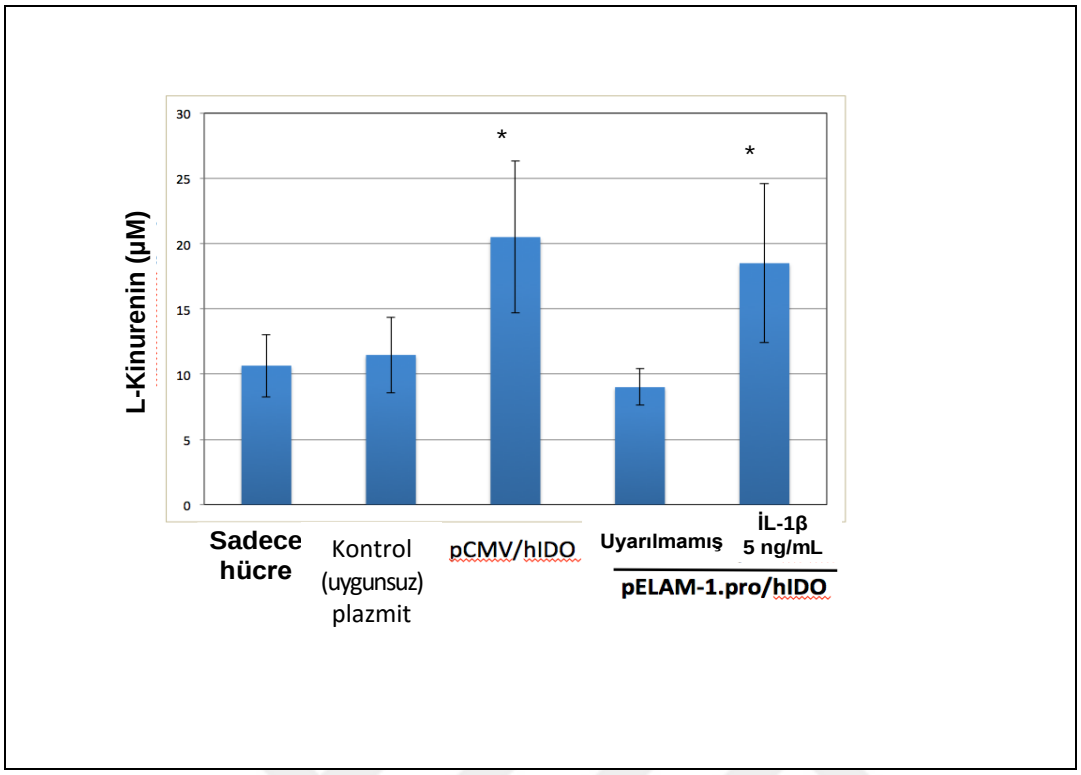


Şekil 4.2. pELAM-1.pro/hIDO ile transfekte Hela hücrelerinde İDO düzeyleri

HeLa hücreleri 6 kuyulu kültür plaklarına 2,5 x 105/kuyu olarak dağıtılarak bir gece (yaklaşık 18 saat) kültüre edilmiştir. Bir kısım kuyudaki hücreler pELAM1.pro/hIDO ile transfekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak, bir kısım kuyudaki pCMV/hIDO ile, negatif kontrol olarak ise pCMV/βgal (uygunsuz plazmit) ile transfekte edilmiştir. Hücreler 24 saat süreyle İL-1β (2 ng/mL veya 5 ng/mL) ile uyarılmıştır. IDO düzeyleri ELISA ile hücre lizatlarında ölçülmüştür.

4.3.2. IDO aktivite testi

HeLa hücresi kültür lizatlarındaki hIDO aktivitesinin ölçümü ise spektrofotometrik aktivite testi uygulanmıştır. İndüklenebilir hIDO aktivitesinin İL-1β ile uyarılmayı takiben 24 saat içinde arttırıldığı gösterilirken, uyarılmamış hücrelerde hIDO düzeylerinin uygunsuz plazmit ile transfekte hücrelerdekine benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).



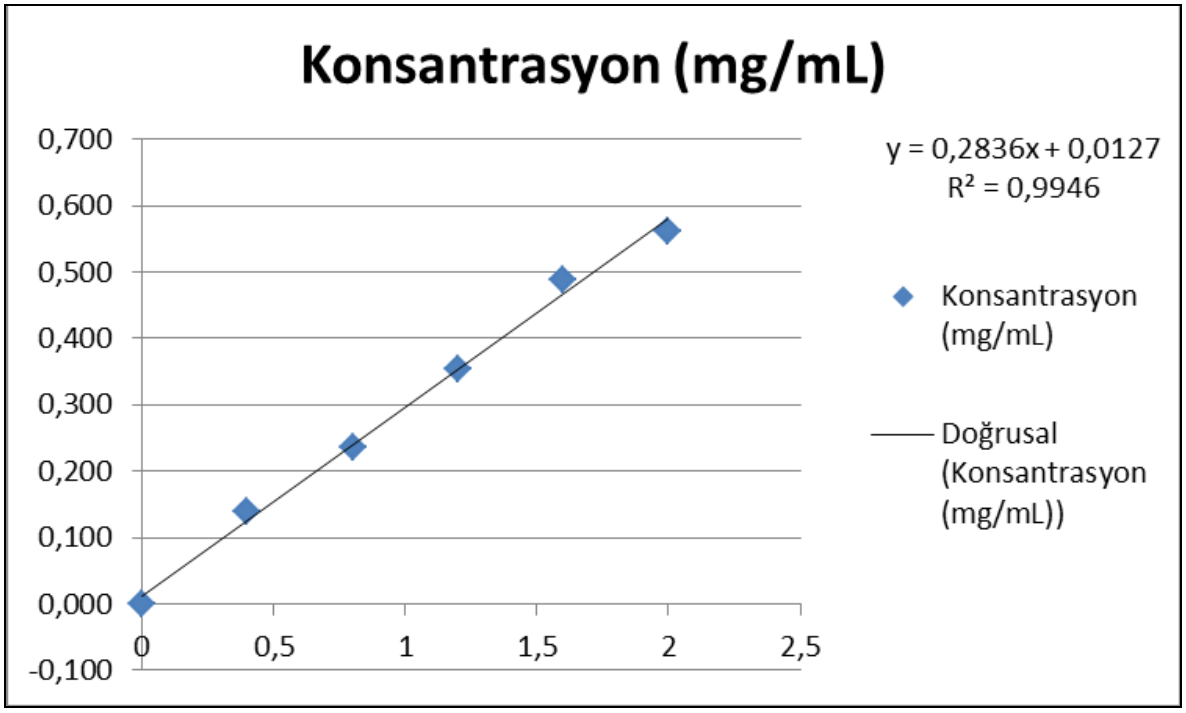
Şekil 4.3. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte HeLa hücrelerinde İDO aktivitesi

HeLa hücreleri 6 kuyulu kültür plaklarına 2,5 x 10^5/kuyu olarak dağıtılarak bir gece (yaklaşık 18 saat) kültüre edilmiştir. Bir kısım kuyudaki hücreler pELAM1.pro/hIDO ile transfekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak, bir kısım kuyudaki pCMV/hIDO ile, negatif kontrol olarak ise pCMV/βgal (uygunsuz plazmit) ile transfekte edilmiştir. Hücreler 24 saat süreyle İL-1β (5 ng/mL) ile uyarılmıştır. Hücre lizatlarındaki IDO aktivitesi spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür.

pCMV/hIDO transfekte edilen hücreler, pCMV/βgal negatif kontrol (uygunsuz plazmit) transfekte edilen hücrelerdeki IDO transkriptleriyle karşılaştırılmış, pELAM-1pro./hIDO transfekte edilen hücreler de İL-1β ile uyarılmamış hücrelerle karşılaştırılarak ekspresyon değerleri belirlenmiştir. pELAM-1pro/hIDO plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 24 saatlik uyarılma sonundaki transkript seviyesinde meydana gelebilecek azalmayı göz önünde bulundurarak hücreler 1/2, 1, 2, 3 ve 4 saat İL-1β ile uyarılmıştır. Böylece transkripsiyonun hangi zaman aralığında en üst seviyeye geldiği belirlenmiştir. ELAM-1 promotoru yangının ilk 30 dakikasından sonra belirgin bir artış göstermiş ve 1 saatte maksimum seviyeye gelmiştir. 4 saat sonunda transkripsiyon seviyesi azalmaya başlamıştır.

4.3.3. Western blot protein analiz sonuçları

HeLa hücre hatlarından elde edilen lizatların total protein derişimlerini belirlemek için bir standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. BSA standart eğri grafiği

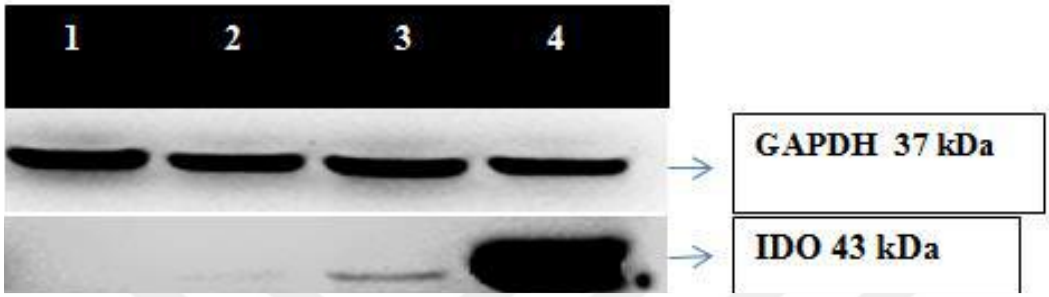
Kuyulara yüklenecek örneklerin protein derişimleri 35 µg olacak şekilde sabitlenmiş ve grafik formülünün yardımıyla derişimler hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Örneklerin protein derişimleri (mg/mL)

Örnekler	Konsantrasyon (mg/mL)
pELAM-1pro./hIDO stimüle edilmeyen	4,13
pELAM-1pro./hIDO IL-1β 2 ng/mL	5,28
pELAM-1pro./IDO IL-1β 5 ng/mL	4,69
pCMV/hIDO (pozitif kontrol)	3,44

Bu deney hücrelere transfer edilen pELAM-1pro./hIDO plazmitindeki ELAM-1 promotor bölgesinin IDO gen ekspresyonu üzerinde ne kadar etkili olduğunu saptamak amacıyla yapılmıştır. Uyarılmayan ve 2 farklı dozda İL-1β ile uyarılan hücrelerdeki protein seviyeleri kıyaslanmıştır. Uyarılmayan hücrelerde IDO geninin aktive olmadığını, 2

ng/mL'lik dozda ise protein ekspresyonun bağladığı, 5 ng/mL' lik uyarıda ise 2 ng/mL'lik doz ile karşılaştırıldığında daha belirgin bir protein ekspresyonu görülmektedir. Pozitif kontrol olarak kullandığımız pCMV/hIDO aktarılmış hücrede ise CMV yapısal promotor bölgesi herhangi bir uyarım olmadan gerçekleşen IDO protein ekspresyonu bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Blotlama analizi sonucu

1 numaralı kuyuda ELAM-1-pro/hIDO stimüle edilmeyen, 2 numaralı kuyu ELAM-1-pro/hIDO İL-1β 2ng/mL, 3 numaralı kuyuda ELAM-1-pro/hIDO İL-1β 5ng/mL ve 4 numaralı kuyuda pCMV/hIDO transfekte edilen hücrelerin protein izolasyonu sonrası WB bant profilleri.

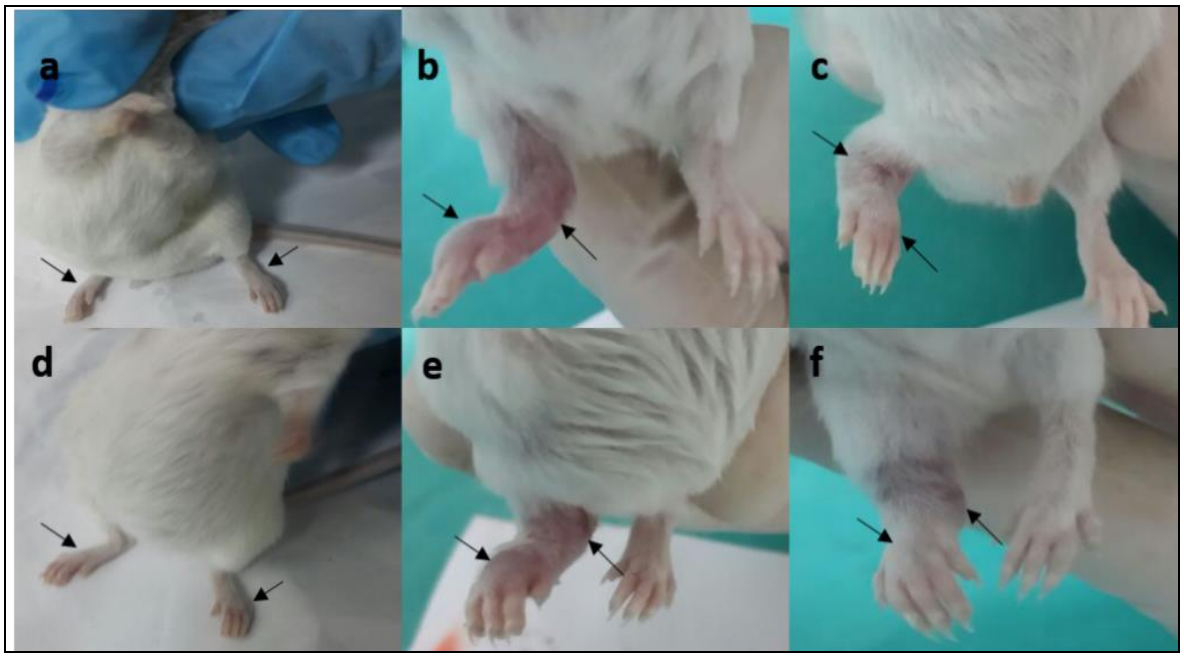
4.4. Kollajen (CIA) ile İndüklenen Artritli Fare Modelinin Oluşturulması

Farelerde Romatoid artrit (RA)-benzeri modeli oluşturarak optimize etmek için öncelikle daha ucuz olan ve kurumumuzdan kolaylıkla tedarik edilebilen Balb/c fareler deneylerde kullanılmıştır. CIA modelinin oluşturulması için Collagen bovine nasal septum ve Freund's Adjuvant Complete (CFA) kullanılmıştır. Başarılı ve en uygun CIA modeli oluşturabilmek amacıyla, cinsiyet farkını görebilmek için dişi ve erkek farelerde intraperitoneal (i.p), intraartiküler (i.a.) ve subkutan (s.c.) enjeksiyon denemeleri yapılmış ve karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kollajen derişimi 2 mg/mL olacak şekilde 0,1 M asetik asit içerisinde çözülmüştür. Deney prosedürüne göre her deney grubunda 10 hayvan (5 dişi, 5 erkek) olacak şekilde enjeksiyonların 0. gününden itibaren hayvanların takibi yapılmıştır. Balb/c farelerde (DBA/1'dekilere benzer olarak) RA-benzeri artiritin indüksiyonu için uygulanan yöntemler içerisinde diğerleri ile karşılaştırıldığında intraartiküler enjeksiyon belirgin şekilde hem klinik olarak hem de histopatolojik olarak artrit oluşturmuştur. Ayrıca hem klinik olarak hem de histopatolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucunda lokal

artirit oluşturmak için kullanılan yöntemler için cinsiyetin önemli bir faktör olmadığı kanısına varılmıştır.

Bu deneyler sonucunda en etkin protokol şu şekilde elde edildi:

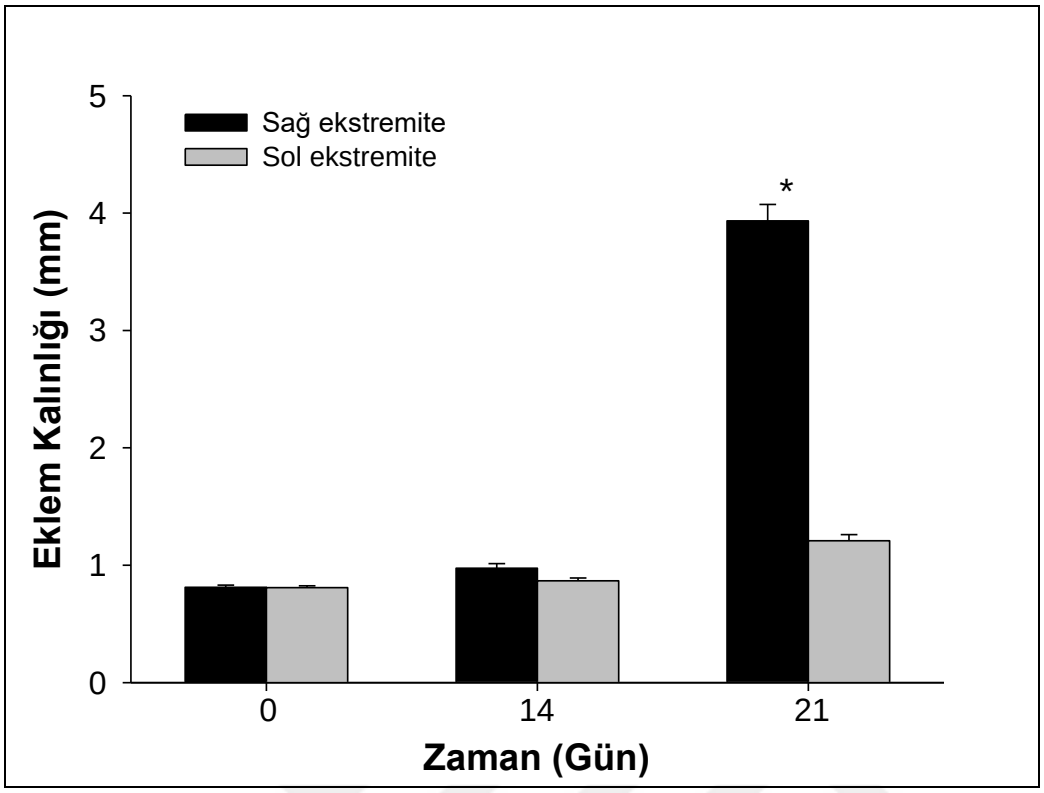
- 0. gün: Hayvan başına 0,01 mL 2mg/mL kollajen i.a. + 0,1 mL CFA s.c.
- 14. gün: Hayvan başına 0,01 mL 2mg/mL kollajen ia + 0,1 mL CFA s.c.
- 21. güne kadar artrit gelişimi takibi.



Resim 4.1. Kollajen (CIA) ile indüklenen artritli fare modelinin oluşturulması

Artrit indükleme öncesi eklem görüntüsü (a ve d); Artrit indükleme sonrası 21. gündeki eklem görüntüsü (b, c, e ve f)

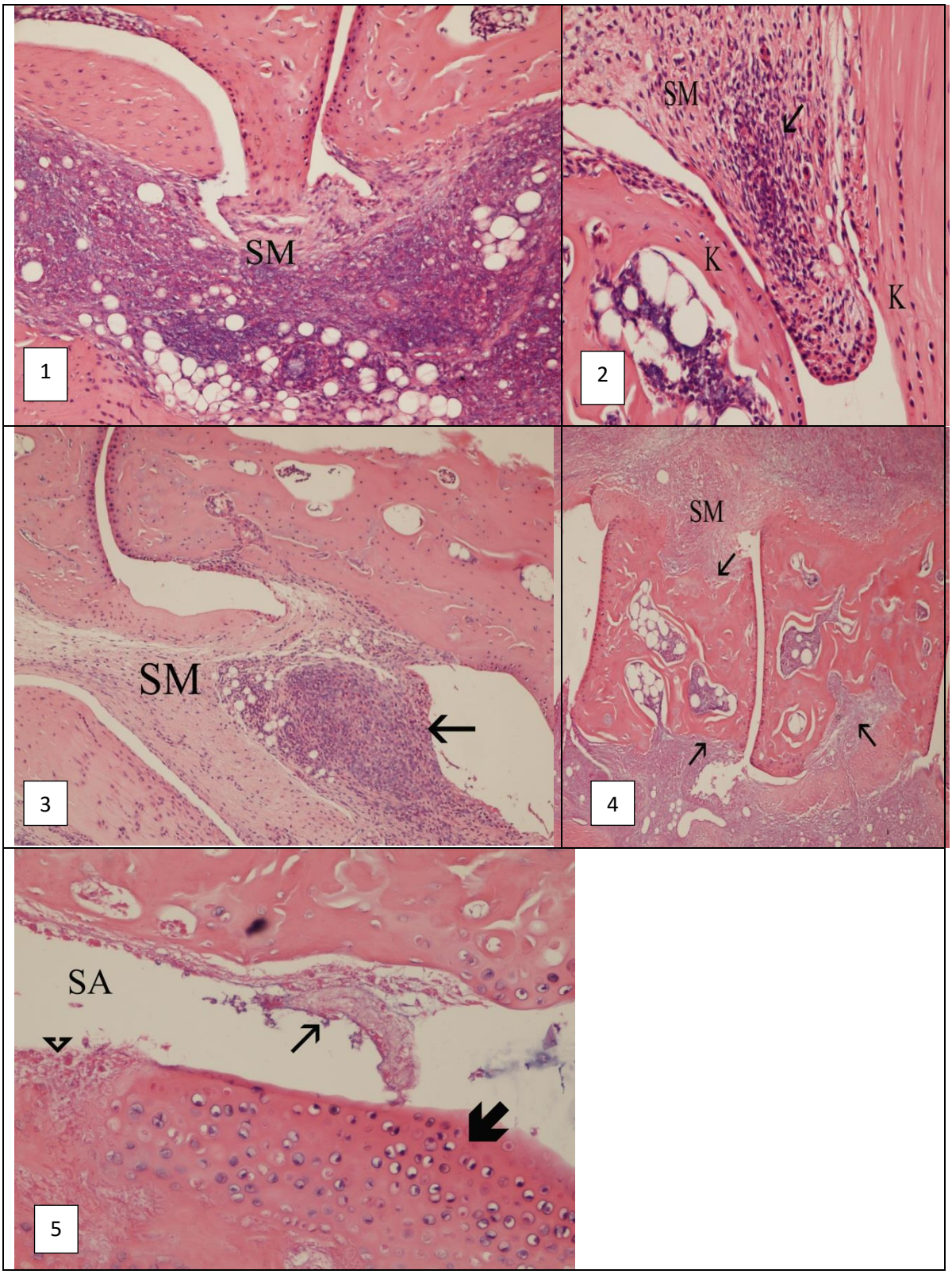
0, 14 ve 21. günlerde kumpas yardımıyla eklem kalınlıkları ölçülmüş ve değerler mm cinsinden Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Kollajen ile indüklenen artritte eklem kalınlığının zamana bağlı değişimi

0. gün; Artrit indükleme öncesi (0,01 mL/2 mg/mL kollajen i.a + 0,1 mL CFA s.c.). 14. gün; ikinci kez indükleme (0,01 mL/2 mg/mL kollajen i.a + 0,1 mL CFA s.c.). 21. gün; Kollajen ile indüklenen artrit oluşturulmuş fare eklemlerine plazmid enjeksiyonları ve deneyin sonlandırılması. * $p < 0,001$

Kollajen ile indüklenmiş tüm artrit gruplarında RA ile uyumlu şekilde şiddetli artrit şekillenmiştir. Histopatolojik incelemede sinovyal membranlarda, şiddetli yangısal infiltrasyonlar ile birlikte bağ doku reaksiyonuna bağlı kalınlaşma dikkati çekmiştir. Sinovyal membranı döşeyen hücrelerde belirgin hiperplazi görülmüştür. Bazı kesitlerde eklem boşluğuna doğru prolifere olan sinovyal membranın oluşturduğu doku üremeleri gözlemlenmiştir. Yer yer pannus benzeri bu dokusunun kıkırdak ve kemik yüzeyine yapıştığı hatta tahribata sebep olduğu tespit edilmiştir. Eklem plaklarında düzensiz kondrosit hiperplazisi ve synoviyal membrana komşuluk eden kıkırdak dokuda yeni kapiller damar oluşumları görülmüştür. İncelenen bazı kesitlerde kıkırdak ve kemik dokuda hafif-orta şiddette doku kaybı ile karakterize lezyonlar görülmüştür. Kesitlerin bir kısmında sinoviyal aralıkta pembe renkte boyanmış, iplik şeklinde fibrin çıkışları gözlenmiştir. İncelenen bazı doku kesitlerinde epidermisin hemen altından başlayan ve dermisi işgal eden şiddetli yangısal reaksiyona rastlanmıştır (Resim 4.2).



1. Sinovyal membranda (SM) yangısal hücre infiltrasyonu ve kalınlaşma. 2)Eklem boşluğuna doğru üreme gösteren sinovyal membran (SM), yangısal hücre infiltrasyonu (ok), kıkırdak hücreleri (K). 3.Sinovyal membranda (SM) bağ doku artışına bağlı kalınlaşma ve yangısal hücre infiltrasyonları (ok). 4. Şiddetle yangılı sinovyal membran (SM) ve kemik dokuya yapışmalar (oklar). 5. Sinovyal aralıkta fibrin çıkışı (ince ok), kondrositlerde düzensiz hiperplazi(kalın ok) ve kıkırdak dokuda nekroz (ok başı).Tüm kesitler hematoksilen-eosin boyalıdır.

Resim 4.2. Kollajenle indüklenmiş artrit histopatolojik görüntüleri

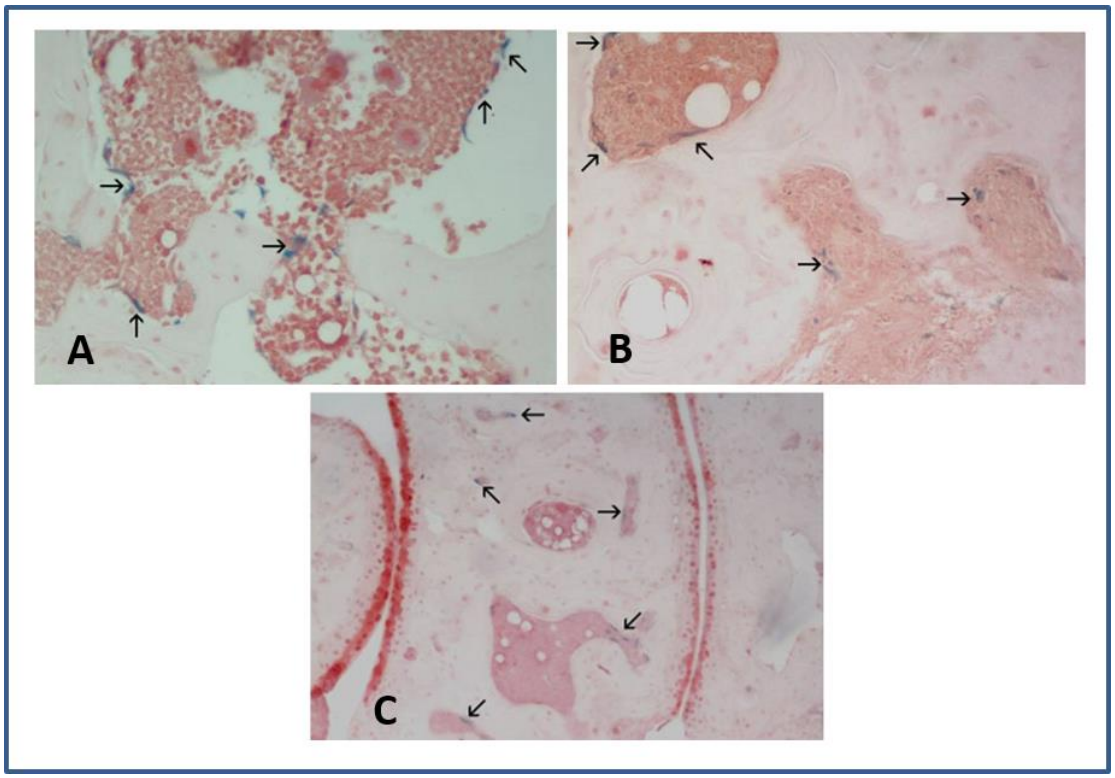
4.5. Artrit Oluşturulmuş Farelere İntraartiküler Lipozom-Aracılı Gen Transferi

Artrit oluşturulmuş farelere gen transferinin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Işık mikroskobunda incelenen kesitlerde X-gal ile boyanan hücrelerin sitoplazması mavi renkte gözlenmiştir. Değerlendirme hücre sitoplâzmasında boyanma görülüp görülmemesine göre yapılmıştır. Boyanmama (-), boyanma (+) olarak değerlendirilmiştir. Boyanma 1., 2., 4. deney ve 5. kontrol gruplarında pozitif olarak gözlemlenirken, 3. deney grubu, 1-4. kontrol gruplarında gözlenmemiştir (Çizelge 4.2, Resim 4.3).

Çizelge 4.2. Kontrol ve deney gruplarında X-gal boyanma sonuçları

	1.grup deney	2. grup deney	3. grup deney	4. grup deney	5. grup kontrol	1. grup kontrol	2. grup kontrol	3. grup kontrol	4.grup Kontrol
1.hayvan	+	-	-	-	S	-	-	-	-
2.hayvan	-	-	-	-	S	***	-	***	***
3.hayvan	+	-	-	+	**	***	**	***	***
4.hayvan	*	+	*	*	**	***	**	***	***

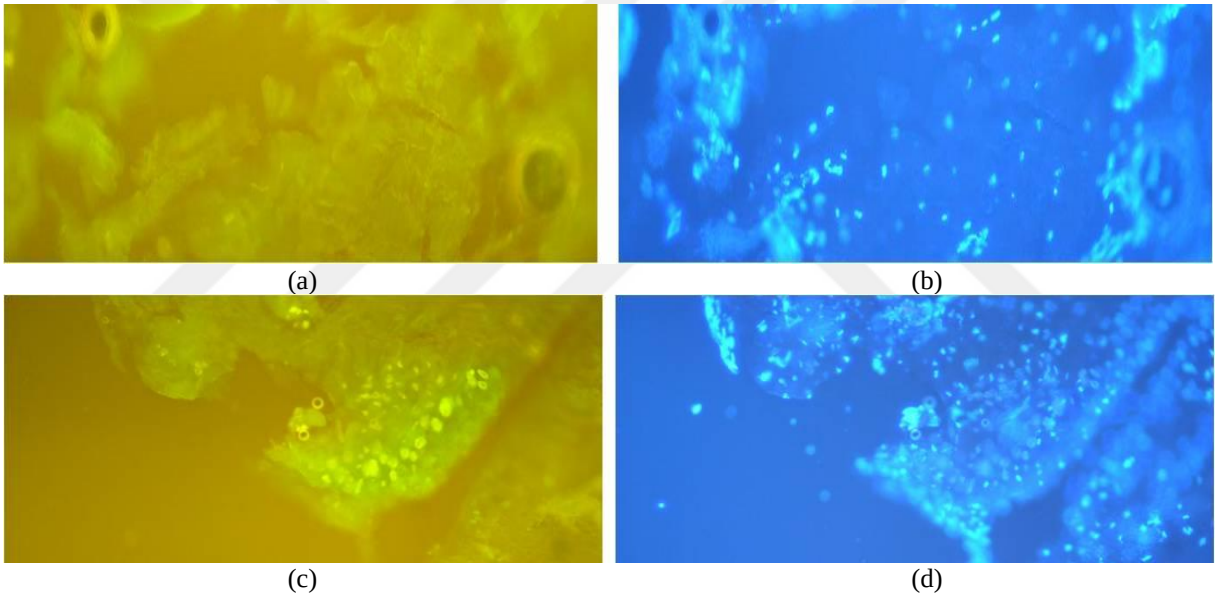
Boyanmama (-), sitoplazmik boyanma (S), çekirdek boyanması (+) olarak değerlendirilmiştir. *Bu gruplar sadece 3 hayvandan oluşmaktadır. **Bu gruplar sadece 2 hayvandan oluşmaktadır. ***Bu gruplar sadece 1 hayvandan oluşmaktadır.



Resim 4.3. Deney (A ve B) ve kontrol (C) gruplarındaki X-gal boyama sonuçları

Deney grubunda X-gal çekirdek boyanması gözlenirken, kontrol fare dokusunda bazı hücrelerde soluk sitoplazmik X-gal boyanması görünmektedir. Oklar: X-gal pozitif reaksiyon veren hücreler.

Balb/c fare eklem boşluğuna GFP raportör geni taşıyan pCMV/GFP, Lipofectamin 2000 ile kompleks oluşturularak insülin enjektörü ile eklem içine uygulanmıştır (C) ve (D). Kontrol olarak uygunsuz plazmit pCAT/control kullanıldı (A) ve (B). 24 saat sonra sakrifiye edilen farenin ekleminden alınan kesitler Fluoresan mikroskop altında değerlendirilmiştir. Kontrol plazmit ile gen aktarımı yapılan dokuda herhangi bir boyanma görünmezken, raportör plazmit ile transfekte dokuda yaklaşık %20-%30 civarında gen transferi etkinliği sağlanabildiği gösterilmiştir (Resim 4.4).



Resim 4.4. Artrit oluşturulmuş farelere intraartiküler lipozom-aracılı gen transferi

Balb/c fare eklem boşluğuna GFP raportör geni taşıyan pCMV/GFP Lipofectamin 2000 ile kompleks oluşturularak enjekte edilmiştir (C) ve (D). Kontrol olarak uygunsuz plazmit pCAT/control kullanılmıştır (A) ve (B). 24 saat sonra sakrifiye edilen farenin ekleminden alınan kesitler Fluoresan mikroskop altında değerlendirilmiştir.

En yüksek gen transfer etkinliğini sağlayan koşul:

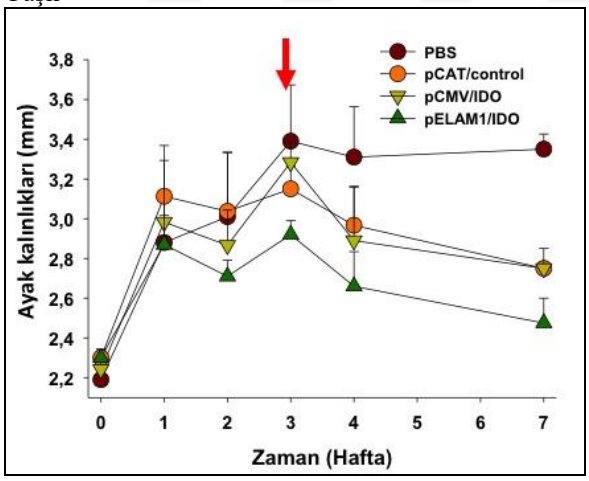
Plazmit DNA (0,5 µg /5µL OptiMEM) + Lipofectamine2000 (1,5 µL/5µL OptiMEM) kombine edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmesi olarak belirlenmiştir.

4.6. Terapötik Gen Aktarımı Yapılan Artritli Farelerde Gözlenen Klinik Yanıtlar

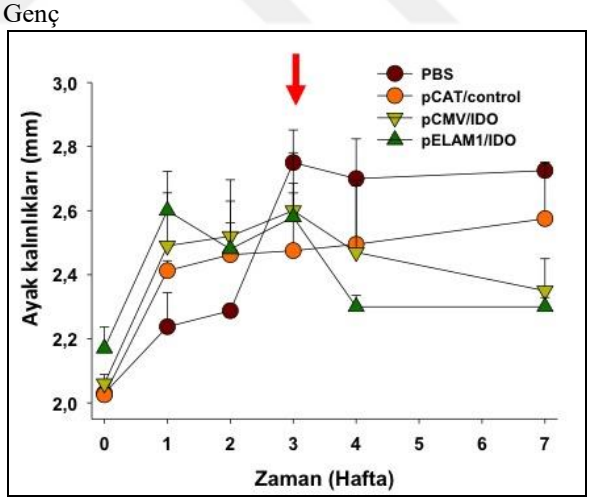
Daha önce belirttiğimiz protokol ile artrit oluşturulan Balb/c farelere (6-8 haftalık genç veya 6-8 aylık yaşlı) 3. haftada yapısal olarak IDO eksprese edilmesini sağlayan pCMV/IDO veya hastalıkla IDO ekspresyonunun indüklenmesini sağlayan pELAM1/IDO plazmiti lipozom aracılı olarak aktarılmıştır. Kontrol gruplarına ise PBS uygulanmış veya pCAT/control (uygunsuz plazmit) lipozom aracılı olarak aktarılmıştır.

Farelerin (her grupta 2 olmak üzere toplam 4 fare) ayak kalınlıkları haftalık olarak ölçülmüştür. Artritin belirgin olarak oluştuğu farelerde 3. haftadan itibaren yapılan izlemlerine bakıldığında özellikle indüklenebilir IDO eksprese eden plazmit transfer edilmiş hem genç hem de yaşlı farelerde belirgin olarak klinik iyileşme (eklem kalınlığında gerileme) gözlenmiştir. pCMV/IDO ile transfekte edilen farelerde ise genç farelerde kontrol gruplarına göre daha belirgin bir iyileşme sağlanabildiği görülmüştür (Şekil 4.7). Daha sonraki tekrar deney setlerinde genç farelerle (6-8 haftalık) çalışmalara devam edilmiştir.

Yaşlı



Genç

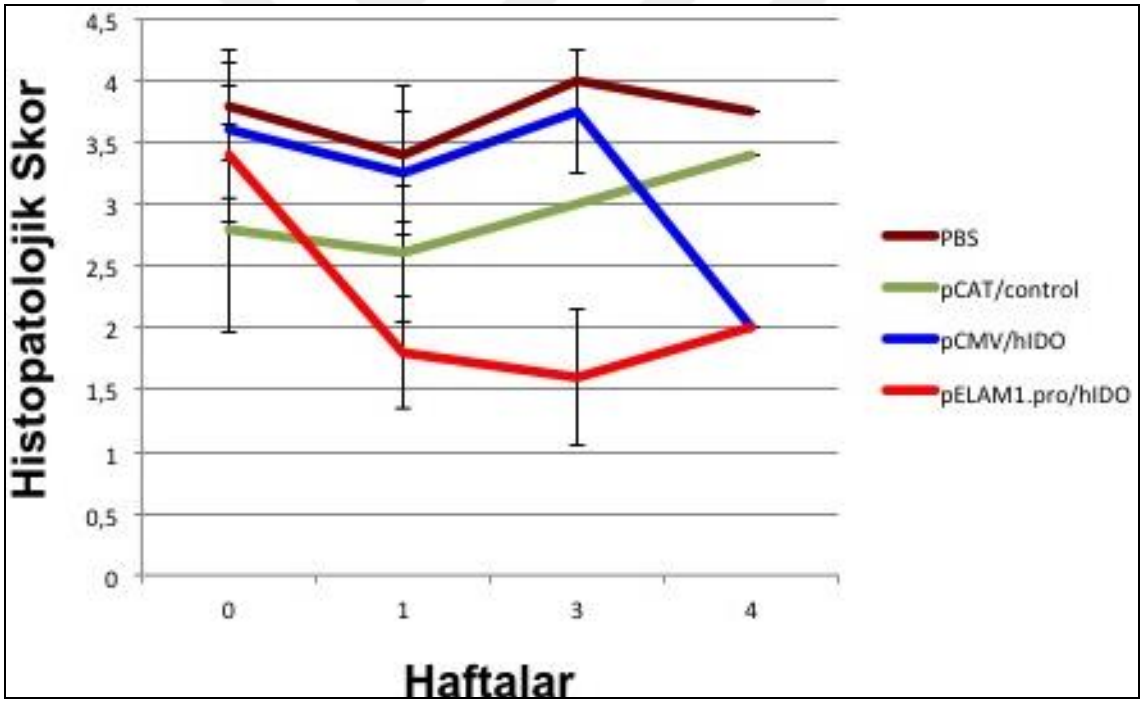


Şekil 4.7. Terapötik Gen Aktarımı yapılan artritli farelerde eklem kalınlıklarındaki değişimler

4.7. Terapötik Gen Aktarımı Yapılan Artritli Farelerde Gözlenen Histopatolojik Yanıtlar

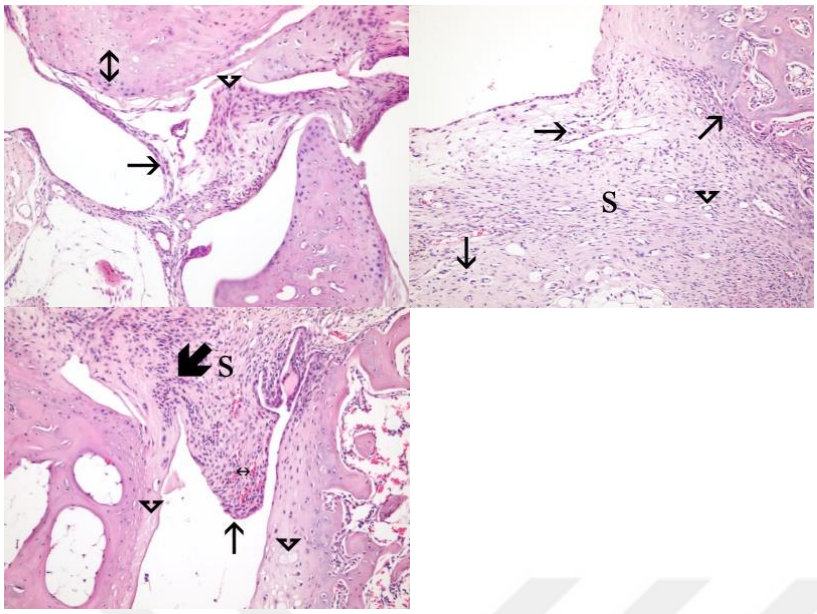
Yukarıda belirtilen fareler 7. Haftada sakrifiye edilerek yapılan histopatolojik değerlendirmelerin sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Aşağıda belirtilen parametreler değerlendirilerek gruplar karşılaştırılmış ve 0 ile 4 arasında değişen derecelerde yangısal reaksiyonları skorlanmıştır. Sinovyal membranda yangısal infiltrasyon, bağ doku reaksiyonuna bağlı kalınlaşma sinovyal membranı döşeyen hücrelerde hiperplazi, sinovyal membranda palizat görüntüsü oluşumu, pannus varlığı, anjiojenezis, kondrosit hiperplazisi ve synovial membrana komşuluk eden kıkırdak dokuda yeni kapiller damar oluşumları, kıkırdak doku hasarı, sinovyal aralıkta fibrin varlığı gibi parametreler göz önüne alınarak histopatolojik kesitler değerlendirilmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi pELAM1pro./hIDO uygulanan farelerde tedavinin 1. haftasından itibaren belirgin bir iyileşme olduğu, tedavinin 4. haftasında histopatolojik skorun 2'ye kadar indiği; pCMV/hIDO uygulanan farelerde ise iyileşmenin geç gerçekleştiği ve ancak 4. haftada histopatolojik skorun 2'ye indiği gözlenmiştir. PBS veya pCAT/control uygulanan farelerde (negatif kontrol) ise anlamlı bir iyileşme görülmemiştir (Şekil 4.8).



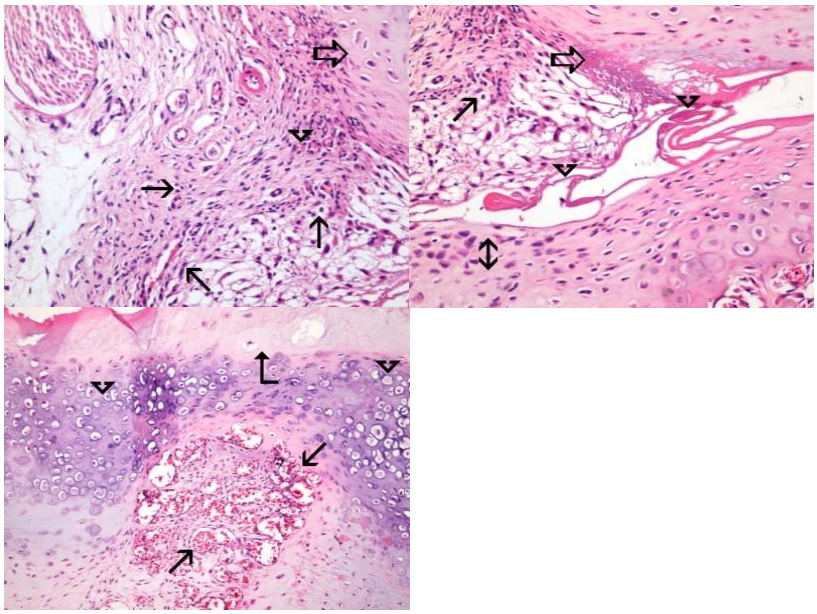
Şekil 4.8. hIDO tedavisi uygulanan farelerde tedavi sonrası haftalara göre histopatolojik skor değişimleri

Histopatolojik değişimlerle ilgili temsili fotoğraflar aşağıda sunulmuştur (Resim 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).



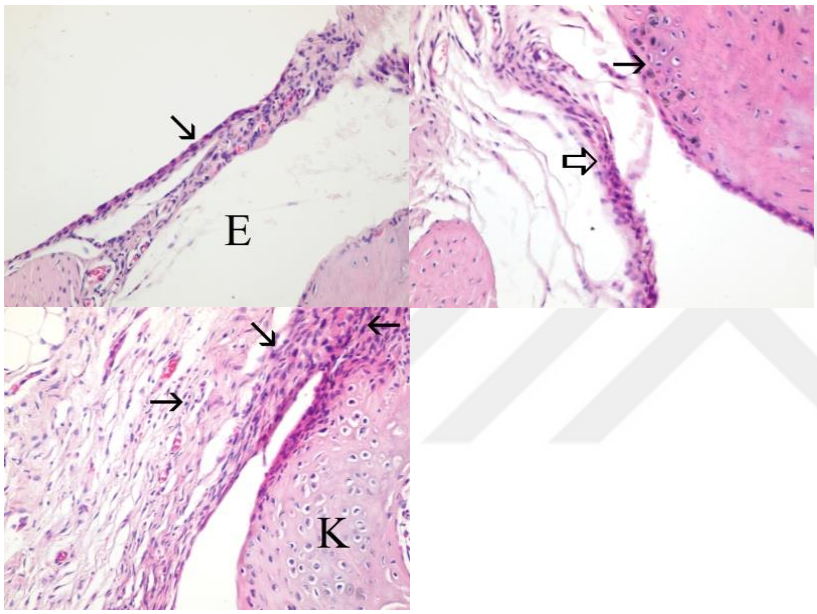
Resim 4.5. PBS uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler

Eklem kıkırdağında hafif –orta şiddette kondrosit hiperplazisi (çift yönlü ok), sinovyal membranda yangı hücresi infiltrasyonları (ok başı) ve sinovyal membranda hafif şiddette kalınlaşma (ok) (1. hafta skor 3); Sinovyal membranda (S) şiddetli yangı hücresi infiltrasyonları ve bağ doku artışına bağlı kalınlaşma (oklar), sinovyal membranda yeni kan damarı oluşumları (ok başı) (3. hafta skor 4); Kondrositlerde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler (ok başları), pannus oluşumu (ince ok), sinovyal membran (S) ve pannus dokusunda yeni kan damarı oluşumları (çift yönlü ok), sinovyal membranda yangı hücresi infiltrasyonları (kalın ok) (4. hafta skor 4).



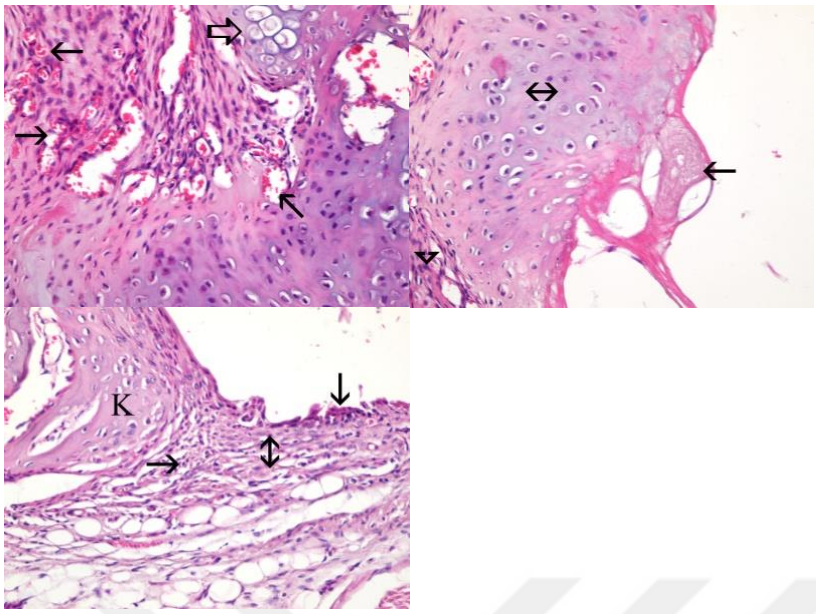
Resim 4.6. pCAT/kontrol uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler

Eklem kıkırdağında hafif –orta şiddette kondrosit hiperplazisi (açık ok), sinovyal membranda yangı hücresi infiltrasyonları (oklar) ve sinovyal membranda yeni kan damarı oluşumları (ok başı) (1. hafta skor 3); Sinoviyal membranda şiddetli yangı hücresi infiltrasyonları (ok), eklem plağında kondrositlerde şiddetli nekroz (açık ok) ve fibrin eksüdasyonu (ok başı), yer yer düzensiz kondrosit hiperplazisi (çift yönlü ok). (3. hafta skor 4); Kondrositlerde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler (eğik ok), şiddetli ve düzensiz kondrosit hiperplazisi (ok başları), kıkırdak dokuda yeni kapiller damar oluşumları (oklar) (4. hafta skor 4).



Resim 4.7. pELAM.pro/hIDO uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler

Sinovyal membranda hafif şiddette kalınlaşma ve yangı hücrelerinin infiltrasyonu (ok) (1. hafta, skor 3); Kıkırdak yüzeyde hafif şiddette kondrosit hiperplazisi (ince ok), sinovyal membranda yangı hücrelerinin infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma (3. hafta skor 2); Kondrositlerde hafif şiddette hiperplazi (K) ve sinovyal membranda kalınlaşma ve yangı hücrelerinin infiltrasyonu (oklar) (4. hafta skor 2);



Resim 4.8. pCMV/hIDO uygulanmış farelerde tedavi sonrası histopatolojik değişimler

Sinovyal membranda yangı hücresi infiltrasyonları (ok başı), eklem plağında kondrositlerde şiddetli nekroz (ok), yer yer düzensiz kondrosit hiperplazisi (çift yönlü ok). (1. hafta, skor 3); Kondrositlerde şiddetli dejeneratif ve nekrotik değişiklikler (açık ok), şiddetli ve düzensiz kondrosit hiperplazisi ile birlikte kıkırdak dokuda yeni damar oluşumları (oklar). (3. hafta, skor 4); Eklem kıkırdağında hafif –orta şiddette kondrosit hiperplazisi (K), sinovyal membranda yangı hücresi infiltrasyonları (oklar) ve sinovyal membranda kalınlaşma (çift yönlü ok) (4. hafta, skor 2).

4.8. Dokularda CD68+ sinoviyal makrofajların ve CD4+ Lenfositlerin İmmunohistokimyasal Boyanması ve Değerlendirilmesi

RA hastalarında ve artrit hayvan modellerinde tedaviye iyi bir yanıtın göstergesi olarak biyopsi materyallerinde sinviyal membranı infiltre eden CD68 pozitif (+) makrofajların azalması beklenmektedir. Bu amaçla, tedavi uygulanan artritli hayvanların eklem dokularında sinoviyal makrofaj hücrelerindeki değişim immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. İmmün reaksiyon sinoviyal membranda gözlenmiştir. Ayrıca, artrit patogenezinde yer alan yardımcı T lenfositlerin tedavi sonrası değişimleri de CD4+ hücrelerin immünohistokimyasal boyaması ile gerçekleştirilmiştir.

Artritin belirgin olarak oluştuğu farelerde tedavi uygulamasından sonra yapılan izlemlerde özellikle tedavi sonrası 3. haftadan itibaren indüklenebilir veya yapısal IDO eksprese eden

plazmitler (sırasıyla pELAM1.pro/hIDO ve pCMV/hIDO) transfer edilmiş farelerin eklem kesitlerinde hem CD68+ sinoviyal makrofaj hem de CD4+ Lenfosit sayılarının azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3, Resim 4.9).

Çizelge 4.3. Tedavi uygulanan farelerde (n: 4) tedavi sonrası haftalardaki CD68-pozitif boyanma skorları

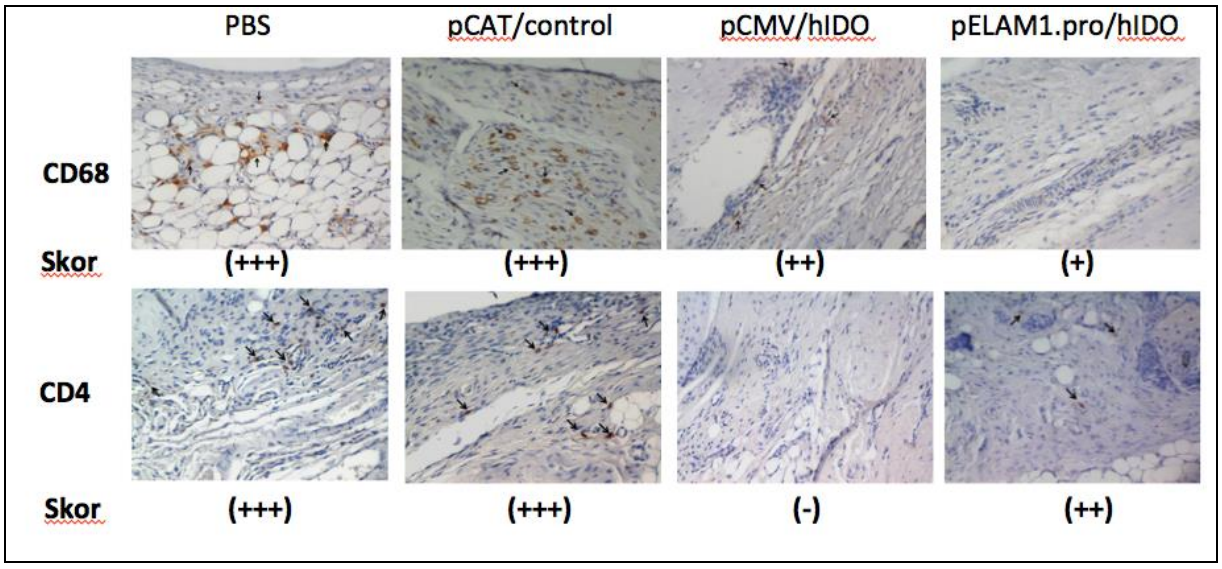
İnfiltre eden CD68+ Makrofaj Skoru			
	Hafta 1	Hafta 3	Hafta 4
PBS	3/3/3/3	3/3/3/3	3/3/3/3
PCAT/ Kontrol	3/3/3/2	3/3/3/2	3/3/3/3
pCMV/hIDO	3/3/3/3	3/3/2/2	3/2/1/1
pELAM1.pro/hIDO	3/3/3/3	3/3/3/2	3/3/2/1

CD4+ hücreler için immunohistokimyasal bulgular

- Negatif kontrol preparatlarında boyanma görülmezken pozitif kontrol preparatlarında immün boyanma görülmüştür.
- CD4 immunohistokimyasal boyamalara ait resimler (Resim 4.9) ve skor tablosu (Çizelge 4.4) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tedavi uygulanan farelerde (n: 4) tedavi sonrası haftalardaki CD4+ Lenfosit boyanma skorları

İnfiltre eden CD4+ Lenfosit Skoru			
	Hafta 1	Hafta 3	Hafta 4
PBS	3/3/2/3	3/3/3/3	3/3/3/3
PCAT/ Kontrol	3/2/2/3	3/3/3/2	3/3/3/3
pCMV/hIDO	0/2/1/2	0/0/0/0	0/1/0/1
pELAM1.pro/hIDO	2/3/2/2	2/2/2/2	2/2/2/2



Resim 4.9. Tedavi sonrası 4. haftada CD68+ sinoviyal makrofajların ve CD4+ Lenfositlerin boyanması. Oklar CD4 veya CD68 pozitif reaksiyon veren hücreleri ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

Sistemik otoimmün bir hastalık olan Romatoid artrit, birçok eklemde sinoviyal dokuları hedef alan kronik yangısal bir hastalıktır [1]. Bu hastalıkta kollajen v.b. antijenik yapılara karşı toleransın bozulması ve buna bağlı otoimmün yanıtların ortaya çıkması söz konusudur. Birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi Romatoid artrit hastalarında da triptofan katabolizmasından sorumlu olan Indolamin 2,3-dioksijenaz'ın (IDO) (triptofanın kinürinine yıkımını başlatan hücre içi bir enzim) immün patogenezde rolü olduğu ortaya konulmuştur [89].

Diğer yandan birçok yangısal hastalıkta olduğu gibi bu hastalıkta da endotel hücre aktivasyonu esastır. Endoteldeki bu değişiklikler aslında enflamasyonda rol oynayan lökositlerin olay bölgesine göçünü sağlamak amacıyla gerçekleştirilir. Burada aktivasyon en gözlenebilir belirteçleri endotel adezyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki artıştır. Bu adezyon moleküllerinden başlıcası E-selektin diğer ismiyle Endotel Lökosit Adezyon Molekülü-1'dir (ELAM-1) [6]. 115 kDa'luk bir glikoprotein olan ELAM1 pro-enflamatuvar sitokinler olan TNF ve İL-1 ile uyarıldıklarında erken dönemde (2-6 saat) endotel hücreleri yüzeyinde ifade edilir [11]. IDO geni ise, insan ve farede 8. Kromozom üzerinde yaklaşık 15 kb'lik bölgede lokalize olup oradan kodlanır. İnsan IDO cDNA'sı 403 aminoasit kodlar ve yaklaşık 45 kDa'luk moleküler ağırlığa sahiptir [90].

İmmünoterapide biyolojik kökenli ajanların sistemik kullanımı hali hazırda uygulanmakta olan ilaçların istenmeyen yan etkilerini en aza indirebilmek amacıyla klinik kullanıma sokulmuş olmasına rağmen ilaç tedavi maliyetlerinde daha fazla artışa yol açmış ve bir takım immünolojik yan etki problemlerinin (Reaktivasyon tüberkülozu gibi) gündeme gelmesine yol açmıştır. Ayrıca, bu yeni proteinlerin kısa yarı ömürleri nedeniyle sık sık enjeksiyonlarının uygulanması gerekmektedir. Bu durumda alternatif yaklaşım gen transferi ile terapötik genlerin lokal olarak yangı alanına aktarılması ya da yangı durumunda üretilen terapötik gen ürünlerinin sistemik ve/veya lokal uygulanması olabilir [97,98].

Bu çalışmadaki amaç tolerans indükleyici terapötik genlerden biri olan IDO' nun sadece yangı durumunda kısa sürede aktive olan E-selektin promoter'in (ELAM-1) kontrolü

altında ifade edilerek yangının başlangıç döneminde baskılanmasının araştırmada geliştirilen CIA lokal artrit modelindeki tedavi edici etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada yangıyla regüle edilebilen bir promotor olan ELAM-1'in kontrolünde IDO'nun oluşturduğumuz deneysel artritte synoviya ve kartilaj hasarını açıkça azaltabildiğini hem klinik (eklem kalınlığı ve klinik skorlama) hem de histopatolojik değerlendirmelerle belirgin bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca, lipozom aracılı bu gen tedavisi yaklaşımı ile eklem bölgesinde CD4+ T hücre sayısında azalma ve CD68+ sinviyal makrofaj infiltrasyonunda baskılanma olduğu gözlemlenmiştir.

Öncelikle hücre hatlarına ardında da artritli hayvanlara gen transferi için en uygun metot saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla çalışmalarımız lipozom -aracılı gen transferi (lipofeksiyon) üzerinde yoğunlaşmıştır. Lipofeksiyon ile yaklaşık %20-30 oranında transfeksiyon oranı sağlanması üzerine deneylerde lipozom aracılı gen transferi yöntemi uygulanmıştır. Benzer etkinlikte intraartikülar lipozom aracılı gen transferleri başka çalışmalarda da gösterilmiştir [91].

Çalışmanın ileri aşamalarında ise ucuz ve tekrarlanabilir fare artrit modelini geliştirmek amaçlanmıştır. Aslında, artrit ile ilgili deneysel çalışmalarda en çok duyarlılığı olan H-2q haplotipe sahip DBA/1 fareler kullanılmaktadır. H-2b haplotipe sahip C57BL/6 ve Balb/c fareler kollajen ve adjuvan ile immünizasyona en düşük yanıt veren modeller olarak bilinmektedir. Bununla beraber modelleme protokollerinde zamanlama ve yüksek dozda adjuvan kullanımı ile yanıtsız farelerde CIA oluşturulabildiği gösterilmiştir [80,92]. Bizim sonuçlarımız Balb/c fareler kollajen ile intraartiküler ve CFA ile s.c. olarak 2 hafta arayla muamele edildiğinde 1 hafta içinde kollajen uygulanan eklemde lokal artrit geliştirdiklerini göstermiştir. Bu modelde gelişen artritin derecesi farklılık gösterebildiği için uygulanan yaklaşımın koruyucu özelliğinden ziyade tedavi edici özelliğinin araştırılmasına daha uygun bir modeldir. Nitekim çalışmamızda klinik skoru 3 ve üzerinde olan hayvanlara tedavi uygulanmıştır. Ancak, koruyucu ve preklinik tedavi amaçlı yaklaşımlar için bu modelin geliştirilmesi ya da DBA/1 fare modeli gibi yaygın kullanılan modellerin kullanılması gerekmektedir [95].

RA'lı hastalarda yapılan eski bir çalışmada güçlü bir IDO indükleyici ajan olan İFN-γ'nın klinik olarak tedavi edici etkinliği gösterilmiştir. Bu etki triptofanın yıkılımı sonucu

düzeyinin azalması ve T hücre aktivasyonunun baskılanmasına bağlanmıştır [93]. Daha sonradan, triptofan düzeyinin düşürülmesinin RA hastalarını tedavisi için yeni bir T hücre baskılama stratejisi olabileceği iddia edilmiştir [40]. Daha sonraları bir çalışmada artrit oluşturulan farelere ekzojen olarak IDO kullanımının artriti gerilettiği; buna karşın IDO eksik (knocked-out) farelerde veya 1-MT verilerek IDO aracılı katabolizmanın baskılandığı farelerde artritin daha şiddetli seyrettiği gösterilmiştir [40].

Romatoid artrit ve/veya kollajen ile indüklenen artrit modellerinde IDO gen tedavisi ile ilgili ilk çalışmada kollajen ile artrit oluşturulan sıçanlara konstitutif (devamlı) CMV promotor kontrolündeki IDO geninin adenovirus aracılı olarak tutulan eklem bölgesine transdüksiyonu ile belirgin bir klinik ve histolojik düzelme yanında sinoviyal İL-17 düzeylerinde azalma olduğu ve sinoviyayı infiltre eden CD4+ T hücrelerinin apoptozla ortadan kaldırıldığı ve CD68+ sinviyal makrofajların sayıca baskılandığı gösterilmiştir [94].

Yine bizim çalışmamızda yangı durumunda aktive olan bir promotor kullanarak sadece hastalığın başladığı veya aktive olduğu dönemde terapötik maddeyi devreye sokarak henüz daha doku hasarı (örneğin kartilaj hasarı) olmadan erken dönemde otoimmüniteyi baskılamak ve immün sistemi uyarmadığı bilinen lipozomlar kullanılmıştır. Bu hastalıkla indüklenen promotor kontrolündeki IDO ekspresyonu, konstitutif (devamlı) CMV promotor kontrolündeki IDO geninin uygulandığı farelerdeki kadar etkili bir terapötik yanıt sağlamıştır.

Hastalıkla indüklenen (regüle edilen) promotor kontrolünde terapötik genler artritin tedavisine yönelik olarak çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Bir çalışmada yangıyla indüklenen İL-1/İL-6 hibrit promotorün kontrolü altında İL-10 gen eksprese eden lentiviral vektör ile hematopoetik kök hücrelerine gen transferi yapılmış ve ardından bu genetik olarak modifiye hücreler farelerde artrit (DBA/1 CIA fareler) oluşturmadan 12 hafta önce intravenöz olarak uygulanmıştır. Bu tedavi sonucunda gen tedavisi uygulanan farelerde kontrol farelerle karşılaştırıldığında belirgin iyileşme gözlenmiştir [95]. Benzer sonuçlar yangıyla uyarılan Saa3 ve Mmp13 promotoru kontrolünde İL-10 geninin lentiviral vektörle intraartiküler uygulanması sonucunda da elde edilmiştir [96]. Bizim çalışmamızda gerek İL-1/İL-6 promotora gerekse Saa3 ve Mmp13 promotorlara göre daha kısa sürede aktive olan ve böylece hızla terapötik genin devreye

girmesini sağlayabileceği düşünülen E-selektin (ELAM-1) promotoru kullanılmıştır. Diğer tarafından terapötik gen olarak İL-10'dan farklı olarak özellikle tercihen T hücreleri regüle eden IDO kullanılmıştır. İL-10'un özellikle monosit/makrofajlarda FcγRI ve FcγRIIa ekspresyonunu arttırıp immün komplekslere yanıt olarak TNF-α yapımını arttırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir [96]. Bu durum uzun dönemde artritin şiddetlenmesine yol açabilir. Bu nedenle İL-10 yerine IDO gibi santral role sahip terapötik bir genin kullanımı daha yararlı olabilir. Ancak, IDO'nun da immün sistem hücreleri üzerine etkilerini detaylı inceleyen çalışmalara halen gereksinim bulunmaktadır.

Yaklaşımların tümündeki önemli sorunlardan biri de uygulamaların antijen spesifik immün baskılama (tolerans) oluşturmamasıdır. Antijen sunan hücrelerin yanı sıra diğer hücrelerinde transdüksiyonu söz konusudur. Bu ve benzeri yaklaşımlar sistemik olarak uygulandığında sorun yaratabilecek enfeksiyonlar vb. diğer nedenlerle de terapötik genin devreye girmesine sebep olabilecektir. Ancak, bu çalışmada olduğu gibi lokal uygulamalarda bu strateji önemli bir avantaj sağlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Romatoid artrit (RA), en sık rastlanılan sistemik otoimmün, el ve ayak küçük eklemleri başta olmak üzere simetrik olarak eklemlerde artrite yol açan, kalıcı eklem hasarı ve sakatlığa neden olabilen, kronik yangısal bir hastalıktır. İnflamatuvar mediyatörlerin lokal üretimi ve yangı bölgelerindeki adezyon moleküllerinin ifade düzeylerindeki değişiklikler daha sonraki RA patogenezinde önemli aşamaları teşkil eder [1,2].

İmmün toleransa katkısı olan mekanizmalardan biri de triptofan metabolizmasıdır. Bu amino asitin azalmış derişimi hücre siklusu arrestine [23,24] ve apoptozise [24] öncülük eder. Buna ek olarak kinürenin yolu ile oluşan triptofan degradasyon ürünleri T hücrelerde apoptozisin potent indükleyicileridir [26,27]. D-triptofan, L-triptofan, triptamin, 5-hidroksitriptofan ve serotonin gibi indolamin türevlerini substrat olarak kullanan enzime indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO, EC.1.13.11.17) adı verilmiştir. İndolamin 2,3-dioksijenaz enzimi, 45 kDa'luk, kofaktör olarak Hem b grubu içeren sitozolik, monomerik protein yapıda bir moleküdür [36].

IDO aracılı triptofan katabolizmasının Th17 ve Treg hücrelerinin biyolojisinde de önemli olduğu ispatlanmıştır [28,29]. Th17 hücreleri yangıyı artırırken, Treg hücreleri potent anti-inflamatuar aktivite sergilerler. RA'da Th17 hücrelerinin aktivitesi, Treg hücrelerinin anti-inflamatuvar etkisinde fazla olduğu için kronik eklem yangısı sürmektedir [2]. Yapılan çalışmalarda immün aktivasyon belirteçlerinin düzeylerindeki artışa bağlı olarak kinürenin triptofan oranının arttığı bildirilmiştir [30,34].

E-selektin 115 kDa' luk bir glikoprotein olup, TNF ve İL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak erken dönemde eksprese edilen bir adezyon molekülüdür. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda E-selektin'in sitokin ile uyarıyı takip eden 4-6 saatlik süre içersinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu durum, yangının başlangıç döneminde E-selektin promotorun aktive olması ile gerçekleşir [16,17].

Bu çalışmada yangı sırasında sentezlenen proinflamatuvar sitokinler ve mediyatörler tarafından uyarılabilen E-selektin promotorun kontrolü altında IDO geninin ifade düzeyini arttırarak otoimmün yanıt baskılanmaya çalışılmıştır. Ayrıca, fare artrit modelinde bu orijinal gen tedavisi yaklaşımının uygulanabilirliği gösterilmeye çalışılmıştır.

pELAM-1pro./hIDO ile transfekte HeLa hücrelerde İDO indüklenebilirliğinin gösterilmesi için hIDO ELISA ve IDO aktivite testi çalışılmıştır. Hücre lizatlarındaki hIDO düzeylerinin ölçümü için ticari ELISA testi uygulanmıştır. İndüklenebilir hIDO düzeylerinin İL-1β ile uyarılmayı takiben 24 saat içinde arttırıldığı, ancak 5 ng/mL İL-1β ile daha belirgin olarak yükseldiği gösterilirken, uyarılmamış hücrelerde hIDO düzeylerinin uygunsuz plazmit ile transfekte hücrelerdekine benzer olduğu saptanmıştır.

HeLa hücresi kültür lizatlarındaki hIDO aktivitesinin ölçümü ise spektrofotometrik aktivite testi uygulanmıştır. İndüklenebilir hIDO aktivitesinin İL-1β ile uyarılmayı takiben 24 saat içinde arttırıldığı gösterilirken, uyarılmamış hücrelerde hIDO düzeylerinin uygunsuz plazmit ile transfekte hücrelerdekine benzer olduğu saptanmıştır.

Balb/c farelerde Romatoid artrit (RA)-benzeri model CIA modelinin oluşturulması için Collagen bovine nasal septum ve Freund's Adjuvant Complete (CFA) kullanılmıştır. Başarılı ve en uygun CIA modeli oluşturabilmek amacıyla, cinsiyet farkını görebilmek için dişi ve erkek farelerde intraperitoneal (i.p), intraartiküler (i.a.) ve subkutan (s.c.) enjeksiyon denemeleri yapılıp ve karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kollajen derişimi 2 mg/mL olacak şekilde 0,1 M asetik asit içerisinde çözülmüştür. Deney prosedürüne göre her deney grubunda 10 hayvan (5 dişi, 5 erkek) olacak şekilde enjeksiyonların 0. gününden itibaren hayvanların takibi yapılmıştır. 0, 14 ve 21. günlerde kumpas yardımıyla eklem kalınlıkları ölçülmüş ve değerler mm cinsinden gösterilmiştir. Kollajen ile indüklenmiş tüm artrit gruplarında RA ile uyumlu şekilde şiddetli artrit şekillenmiştir. Histopatolojik incelemede sinovyal membranlarda, şiddetli yangısal infiltrasyonlar ile birlikte bağ doku reaksiyonuna bağlı kalınlaşma dikkati çekmiştir.

Artrit oluşturulmuş farelere gen transferinin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Işık mikroskobunda incelenen kesitlerde X-gal ile boyanan hücrelerin sitoplazması mavi renkte gözlenmiştir. Değerlendirme hücre sitoplâzmasında boyanma görülüp görülmemesine göre yapılmıştır. Boyanmama (-), boyanma (+) olarak değerlendirilmiştir. Artrit oluşturulan Balb/c farelere (6-8 haftalık genç veya 6-8 aylık yaşlı) 3. haftada yapısal olarak IDO eksprese edilmesini sağlayan pCMV/IDO veya hastalıkla IDO ekspresyonunun indüklenmesini sağlayan pELAM1/IDO plazmiti lipozom aracılı olarak aktarılmıştır. Kontrol gruplarına ise PBS uygulanmış veya pCAT/control (uygunsuz plazmit) lipozom aracılı olarak aktarılmıştır. Farelerin (her grupta 2 fare) ayak kalınlıkları haftalık olarak

ölçülmüştür. Artritin belirgin olarak oluştuğu farelerde 3. haftadan itibaren yapılan izlemlerine bakıldığında özellikle indüklenebilir IDO eksprese eden plazmit transfer edilmiş hem genç hem de yaşlı farelerde belirgin olarak klinik iyileşme (eklem kalınlığında gerileme) gözlenmiştir. pCMV/IDO ile transfekte edilen farelerde ise genç farelerde kontrol gruplarına göre daha belirgin bir iyileşme sağlanabildiği görülmüştür.

Bu fareler 7. Haftada sakrifiye edilerek yapılan histopatolojik değerlendirmelerin sonuçlandırılmıştır. Aşağıda belirtilen parametreler değerlendirilerek gruplar karşılaştırılmış ve 0 ile 4 arasında değişen derecelerde yangısal reaksiyonları skorlanmıştır. Sinovyal membranda yangısal infiltrasyon, bağ doku reaksiyonuna bağlı kalınlaşma sinovyal membranı döşeyen hücrelerde hiperplazi, sinovyal membranda palizat görüntüsü oluşumu, pannus varlığı, anjiojenezis, kondrosit hiperplazisi ve synovial membrana komşuluk eden kıkırdak dokuda yeni kapiller damar oluşumları, kıkırdak doku hasarı, sinovyal aralıkta fibrin varlığı gibi parametreler göz önüne alınarak histopatolojik kesitler değerlendirilmiştir. pELAM1pro./hIDO uygulanan farelerde tedavinin 1. haftasından itibaren belirgin bir iyileşme olduğu, tedavinin 4. haftasında histopatolojik skorun 2'ye kadar indiği; pCMV/hIDO uygulanan farelerde ise iyileşmenin geç gerçekleştiği ve ancak 4. haftada histopatolojik skorun 2'ye indiği gözlenmiştir. PBS veya pCAT/control uygulanan farelerde (negatif kontrol) ise anlamlı bir iyileşme görülmemiştir. Ayrıca CD4+ T hücre ve CD68+ sinoviyal makrofaj oranlarının azaldığı, IDO düzeylerinin artığı gösterilmiştir.

Bu çalışmamızın takibinde yapılması gerekenler:

- Çalışmamız sadece yangı sırasında lokal olarak üretilecek olan immünoterapötik molekülün sentezlenmesi temeline dayandığı için sistemik yan etki olasılığının çok düşük olması ve ileride kullanılmak üzere uygun ve kalıcı gen transferi metodları geliştirilebilir.
- IDO'nun immün sistem hücreleri üzerine etkilerini detaylı inceleyen çalışmalara halen gereksinim bulunmaktadır.
- İmmüntolerans sağlamak amacıyla triptofan metabolizmasını düzenlemeye yönelik genetik olarak modifiye edilmiş immün hücrelerle (dendritik hücreler gibi) tedavi uygulamaları söz konusu olabilir. Bu aynı zamanda sistemik uygulanabilme yanında ve antijene spesifik immün tolerans geliştirilmesini sağlayabilecektir.

- Bu yaklaşımın sadece RA değil diğer otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklarda da uygulanabilir olma potansiyeli mevcut olması, yeni birçok proje için umut yaratmaktadır.

Bu tez çalışmasında, yangı sırasında sentezlenen proinflamatuvar sitokinler ve mediyatörler tarafından uyarılabilen E-selektin promotorun kontrolü altında IDO geninin ifade düzeyini arttırarak otoimmün yanıtın baskılanması ve takibinde fare artrit modelinde bu orijinal gen aktarımının uygulanabilirliği gösterilerek RA gibi otoimmün hastalıklar için potansiyel bir gen tedavi protokolü oluşturulması hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Tak, P.P. and Bresnihan, B. (2000). The pathogenesis and prevention of joint damage on rheumatoid arthritis: Advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheumatology*, 43(12), 2619-33.

2. Kolodziej, L. (2013). Investigation of the kynurenine pathway in indoleamine 2,3 dioxygenase deficient mice with inflammatory arthritis. *Transgenic Research*, 22(5), 1049-54.

3. Pamuk, Ö.N. ve Dönmez, S. (2012). Romatoid artrit patogenezi. *Türkiye Klinikleri Journal ofRheumatology Special Topics*, 5(2), 1-7.

4. Tak, P.P. (2001). Is early rheumatoid arthritis the same disease process as lte rheumatoid arthritis?.*Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 15(1), 17-26.

5. Bradfield, P.F., Amft, N., Vernon-Wilson, E., Exley, A.E., Parsonage, G., Rainger, G.E., Nash, G.B., Thomas, A.M., Simmons, D.L., Salmon, M. and Buckley, C.D. (2003). Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration wthin synovial tissue. *Arthritis & Rheumatology*, 48(9), 2472-82.

6. Fox DA. Rheumatoid Artritis: How TNF Antagonists Have Optimized RA Treatment and Outcomes. *Medscape.org*/viewarticle/464118_3.

7. Mcmurray, R.W. (1996). Adhesion molecules in autoimmune disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 25(4), 215-33.

8. Tak, P.P., Taylor, P.C., Beedveld, F.C., Smeets, T.J., Daha, M.R., Kluin, P.M., Meinders, A.E. and Maini, R.N. (1996). Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factoralpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 39(7), 1077-81.

9. Paleolog, E.M. (1996). Angiogenesis: a critical process in the pathogenesis of RA—a role for VEGF?.*British Journal of Rheumatology,* 35(10), 917-19.

10. Brenchley, P.E. (2001). Antagonising angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(3), 71-4.

11. Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Jr., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R. and Springer, T.A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and ımmune ınterferon. *The Journal of Immunology*, 137(6), 1893-96.

12. Wellicome, S.M., Thornhill, M.H., Pitzalis, C., Thomas, D.S., Lanchbury, J.S., Panayi, G.S. and Haskard, D.O. (1990). A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 144(7), 2558-65.

13. Whelan, J., Ghersa, P., Hooft Van Huijsduijnen, R., Gray, J., Chandra, G., Talabot, F. and Delamarter, J.F. (1991). An Nf kappa B-like factor is Essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (Elam-1) gene transcription. *Nucleic Acids Research,* 19(10), 2645-53.

14. Hooft van Huijsduijnen, R., Pescini, R. and Delamarter, J.F. (1993). Two distinct Nf-kappa B complexes differing in their larger subunit bind the E-selectin promoter kappa B element. *Nucleic Acids Research,* 21(16), 3711-7.

15. Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D. and Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: Nf-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *The Jaseb Journal*,9(10), 899-909.

16. Kluger, M.S., Johnson D.R. and Pober J.S. (1997). Mechanism of sustained E-selectin expression in cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Journal of Immunology*, 158(2), 887-96.

17. Gompells, L.L., Madden L., Lim N.H., Inglis J.J., Mcconnell E., Vincent T.L., Haskard D.O. and Paleolog E.M. (2011).In vivo fluorescence imaging of E-selectin: Quantitative detection of endothelial activation in amouse model of arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 63(1), 107-17.

18. Becker-Andre, M., Hooft van Huijsduijnen, R., Losberger, C., Whealen, J., Shenck, A.M. and DeLamarter, J.F. (1992). A T-cell enhancer cooperates with NF-kappa B to yield cytokine induction of E-selectin gene transcription in endotelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(31), 22385-91.

19. Oral, H.B., Larkin, D.F., Fehervari, Z., Byrnes, A.P., Rankin, A.M., Haskard, D.O., Wood, M.J., Dallman, M.J. and George A.J. (1997). Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer and immunomodulatory protein production in human cornea. *Gene Therapy*, 4, 639-47.

20. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2015). *Chapter 15: Immunologic tolerance and autoimmunity: Basic immunology functions and disorders of the immune system*. Philadelphia, USA:Saunders. 325-50

21. Van Parijs, L., Perez, V.L. and Abbas, A.K. (1998). Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Foundation Symposium*, 215(5), 33-40.

22. Abbas, A.K. and Lichtman, A.H. (2007). *İmmünolojik tolerans ve otoimmünite immün sistem fonksiyonları ve bozuklukları: Temel immünoloji*.(Edt: Camcıoğlu, Y. ve Deniz, G.). İstanbul:İstanbul Medikal Yayıncılık.

23. Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U. and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Experimental Medicine,*196(4), 459-68.

24. Munn, D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A. and Mellor A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of Experimental Medicine,* 189, 1363-72.

25. Fallarino, F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C. and Puccetti P. (2002). T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death and Differentiation*, 9, 1069-77.

26. Kolodziej, L.R., Paleolog, E.M. and Williams, R.O. (2011). Kynurenine metabolism in health and disease. *Journal of Amino Acids*, 41(5), 1173-83.

27. Terness, P., Bauer, T.M., Röse, L., Duffer, C., Watzlik, A., Simon, H. and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of supression by triptophan metabolites. *The Journal of Experimental Medicine,*196(4), 447-57.

28. Baban, B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn, D.H. and Mellor, A.L. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their convertion into Th17-like cells. *Journal of Immunology*, 183(4), 2475-83.

29. Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L. and Munn, D.H. (2007). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 2570-82.

30. Richard, D.M., Dawes, M.A., Mathias, C.W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N. and Dougherty, D.M. (2009). L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research,* 2, 45-60.

31. McMenamy, R.H. and Oncley, J.L. (1958). The specific binding of L- tryptophan to serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry,*233, 1436-47.

32. Schwarcz, R. and Pellicciari, R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 1-10.

33. Pucak, M.L., Carroll, K.A.L., Kerr, D.A. and Kaplin, A.L. (2003). The role of indoleamine 2,3- dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha induced depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience,*29, 11-17.

34. Takikawa, O. (2005). Biochemical and medical aspects of indolamine 2,3-dioxygenase-initiated L-triptophan metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 12-19.

35. Moffett, J.R. and Namboodiri, M.A. (2003). Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology,* 81, 247-65.

36. Taylor, M.W. and Feng, G.S. (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal*, 5, 2516-22.

37. Bender, D.A. (1983). Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine,* 6, 101-97.

38. Schrocksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C. and Fuchs, D. (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clinica Chimica Acta*, 364, 82-90.

39. Fuchs, D., Möller, A.A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Dierich, M.P. and Wachter, H. (1991). Increased endogenous interferon-gamma and neopterin correlate with increased degradation of tryptophan in human innumodeficiency virüs type 1 infection. *Immunology Letters*, 28, 207-12.

40. Schroecksnadel, K., Kaser, S., Ledochowski, M., Neurauter, G., Mur, E., Herold, M. and Fuchs, D. (2003). Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 30, 1935-39.

41. King, N.J. and Thomas, S.R. (2007). Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 2167–72.

42. Alberati-Giani, D. and Malherbe, P. (1997). Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells. *Journal of Immunology*, 159, 419-26.

43. Murray, M.F. (2007). The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human gene. *Current Drug Metabolism*, 8, 197-200.

44. Ball, H.J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C.J.D., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillian, J.A., Stocker, R., Jermiin, L.S. and Hunt, N.H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, 396, 203–13.

45. Takikawa, O., Littlejohn, T.K., Roger, J. and Truscott, W. (2001). Indoleamine 2,3-dioxygenase in the human lens, the first enzyme in the synthesis of UV filters. *Experimental Eye Research*, 72, 271-77.

46. Korlimbinis, A. and Truscott, R.J. (2006). Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens: A possible role in age-related nuclear cataract. *Biochemistry*, 45, 1950-60.

47. Mellor, A. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulation of T-cell immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 20-24.

48. Mellor, A.L. and Munn, D.H. (2003). Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *Journal of Immunology*, 170, 5809-13.

49. Kolodziej, L. (2012). An exploratory study of the interplay between decreased concentration of tryptophan, accumulation of kynurenines, and inflammatory arthritis. *Life*, 64(12), 983–87.

50. Gurtner, G.J., Newberyy, R.D., Schloemann, R., McDonald, G. and Stenson, W. (2003). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology*, 125, 1762-73.

51. Merlo LMF, Grabler S, DuHadaway JB, Pigott E, Manley K, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD, Mandik-Nayak L. (2017). Therapeutic antibody targeting of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO2) inhibits autoimmune arthritis. *Clinical Immunology* 179:8-16.

52. Lawrence, M.B. and Springer, T.A. (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, (65), 859-73.

53. Luscinskas, F.W., Brock, A.F., Arnoaout, M.A. and Gimbrone, M.A. (1989). Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 depent and leukocyte (CD11/CD18)dependent mechanisms contribue to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine-activated human vascular endothelium. *The Journal of Immunology*, (142), 2257-63.

54. Watson, S.R., Fennie, C. and Lasky, L.A. (1991). Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluable homing receptor-IgG chimeaera. *Nature*, (349), 164-67.

55. Jutila, M.A. (1994). Function and regulation of leukocyte homing receptors. *Journal Leukoc Biol*, 55(1), 133-40.

56. Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V. and Collins, T. (1998). Robbins pathologic basis of disease. *W.B Saunders*, 97, 2307–15.

57. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985 Sep;101(3):880-6.

58. McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L. and Bainton, D.F. (1989). GMP-140 a platelet a-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of Clinical Investigation*, (84), 92.

59. Pan, J., Xia, L. and McEver, R.P. (1998). Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 10058–67.

60. Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P. and Sims, P.J. (1989). Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(14), 7768–71.

61. Cleator, J.H., Zhu, W.Q., Vaughan, D.E. and Hamm, H.E. (2006). Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*, 107(7), 2736–44.

62. Mojcik, C.F. and Shevach, E.M. (1997). Adhesion molecules: A rheumatologic perspective. *Arthrits and Rheumatology*, (40), 991-1004.

63. Jutila MA, Berg EL, Kishimoto TK, Picker LJ, Bargatze RF, Bishop DK, Orosz CG, Wu NW, Butcher EC. (1989). Inflammation-induced endothelial cell adhesion to lymphocytes, neutrophils, and monocytes. Role of homing receptors and other adhesion molecules. *Transplantation*. 48(5):727-31.

64. Watson, J.D. (1981). Gene therapy: How ripe the time?.*Lancet*, 317(8213), 196-97.

65. Wade, N. (1981). Gene therapy caught in more entanglements. *Science*, 212(4490), 21-24.

66. Haritha, P.N., Devi, S.K.U., Nagaratna, D.P., Chaitanya, P.S.K. and Gunasekharan, V. (2012). Gene therapy-a review. *International Journal of Biopharmaceutics*, 3(1), 55-64.

67. Clark, D.P. and Pazdernik, N.J. (2012). Biotechnology. (1st Edition). *Academic Cell Update*, (2), 477-97.

68. Sheridan, C. (2011). Gene therapy finds its niche. *Nature Biotechnology*, 29, 121-8.

69. Patil, P.M., Chaudhari, P.D., Megha, S. and Duragkar, N.J. (2012). Review article on gene therapy. *International Journal of Genetics*, 4(1), 74-9.

70. Duve, C., Trouet, A. and Campeneere, D.D. (1998). Liposomes as lysosomotropic carriers. *Annals of the New York Academy Sciences*, (53), 266-334.

71. Bangham, A.D., Standish , M.M. and Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent lons across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, (13), 238-62.

72. Nicolau, C. and Cudd, A. (1989). Liposomes as carriers of DNA. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, (6), 239–71.

73. Trentham, D.E., Townes, A.S. and Kang, A.H. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*, 146, 857-68.

74. Wooley, P.H., Luthra, H.S., Griffiths, M.M., Stuart, J.M., Huse, A. and David, C.S. (1985). Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule. *Journal of Immunology*, 135, 2443-2451.

75. Wooley, P.H. (1988). Collagen-induced arthritis in the mouse.*Methods in Enzymology*, 162, 361-73.

76. Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K. and Klareskog, L. (1986). Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatology*, 29, 106-13.

77. Ortmann, R.A. and Shevach, E.M. (2001). Susceptibility to collagen-induced arthritis: Cytokine-mediated regulation.*Clinical Immunology*, 98, 109-18.

78. Oestergaard, S., Rasmussen, K.E., Doyle, N., Varela, A., Chouinard, L., Smith, S.Y., Qvist, P. and Karsdal, M.A. (2008). Evaluation of cartilage and bone degradation in amurine collagen antibody-induced arthritis model. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67, 304-12.

79. Inglis, J.J., Simelyte, E., McCann, F.E., Criado, G. and Williams, R.O. (2008). Protocol for the induction arthritis in C57BL/6 mice. *Nature Protocols*, 3(4), 612-18.

80. *http://www.sinobiological.com/BRCA1-cDNA-Clone-g-18849.html*

81. Bandara, G., Mueller, G.M., Galea Lauri, J., Tindal, M.H., Georgescu, H.I., Suchanek, M.K., Hung, G.L., Glorioso, J.C., Robbins, P.D. and Evans, C.H. (1993). Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90(22), 10764-68.

82. Karaçay, M. (2017). *İnsan İndolamin-2,3-Dioksijenaz Geninin ELAM-1 promoter kontrolünde klonlanması ve ekspresyonu*. Yüksek Lisans Tezi Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

83. Samikkannu, T., Saiyed, Z.M., Rao, K.V., Babu, D.K., Rodriquez, J.W., Papuashvili, M.N. and Nair, M.P. (2009). Differential regulation of indolamine-2,3-dioxigenase (IDO) by HIV type 1 clade B and C Tat protein. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 25(3), 329-35.

84. Rashnonejad, A., Durmaz, B. ve Özkınay, F. Gen tedavisinin temel ilkeleri ve son gelişmeler. *Ege Tıp Dergisi*, 53(4), 231-40.

85. Özcan, A.G. (2007). Gen tedavisi ve biyogüvenlik. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1), 35-50.

86. Rincon, M.Y., VandenDriessche, T. and Chuah, M.K. (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovascular Research*, 108,4-20.

87. Walter, W. and Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer. *Drugs*, 60(2), 249-71.

88. Sharma, A. and Sharma, U.S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154, 123-40.

89. Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 25-31.

90. Munn, D.H. and Mellor, A.L. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 1147-54.

91. Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A. and Mellor, A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 280-90.

92. Oligino, T.J., Yao, Q., Ghivizzani, S.C. and Robbins, P. (2000). Vector systems for gene transfer to joints. *Clinical Orthopaedics*, 379, 17–30.

93. Campbell, I.K., Hamilton, J.A. and Wicks, I.P. (2000). Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 30, 1568–75.

94. Lemmel, E.M., Franke, M., Gaus, W., Hartl, P.W., Hofschneider, P.H., Miehlke, K., Machalke, K. and Obert, H.J. (1987). Results of a phase-II clinical trial on treatment of rheumatoid arthritis with recombinant interferon-gamma.*Rheumatology International*, 7(3), 127-32.

95. Criado, G., Simelyte, E., Inglis, J.J., Essex, D. and Williams, R.O. (2009). Indoleamine 2,3 dioxygenase-mediated tryptophan catabolism regulates accumulation of Th1/Th17 cells in the joint in collagen-induced arthritis.*Arthritis & Rheumatology*, 60(5), 1342-51.

96. Chen, S.Y., Wu, C.L., Lai, M.D., Lin, C.C., Yo, Y.T., Jou, I.M., Lee, C.H., Weng, C.T., Shiau, A.L. and Wang, C.R. (2011). Amelioration of rat collagen-induced arthritis through CD4+ T cells apoptosis and synovial interleukin-17 reduction by indoleamine 2,3-dioxygenase gene therapy. *Human Gene Therapy*, 22, 145-54.

97. Henningsson, L., Eneljung, T., Jirholt, P., Tengwall, S., Lidberg, U., van den Berg, W.B., van de Loo, F.A. and Gjertsson, I. (2012). Disease-dependent local IL-10 production ameliorates collagen induced arthritis in mice. *PLoS ONE*, 7, 49731.

98. Vermeij, E.A., Broeren, M.G., Bennink, M.B., Arntz, O.J., Gjertsson, I., van Lent, P.L., van den Berg, W.B., Koenders, M.I. and van de Loo, F.A. (2015).Disease-regulated local IL-10 gene therapy diminishes synovitis and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis.*Annals of the Rheumatic Diseases*,74(11), 2084-91.

99. Van Roon, J., Wijngaarden, S., Lafeber, F.P., Damen, C., van de Winkel, J. and Bijlsma, J.W. (2003). Interleukin 10 treatment of patients with rheumatoid arthritis enhances Fc gamma receptor expression on monocytes and responsiveness to immune complex stimulation. *Journal of Rheumatology*, 30, 648-51.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/ 37 06.03.2013

Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

Yürütücüsü olduğunuz "*Kollajen ile indüklenen artrit modelinde inflamatuvar durumlarda ifade edilen tolerans indükleyici potansiyel terapötik genle artrit tedavisi: Romatoid artrit tedavisi için yeni bir strateji*" isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05.03.2013 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK
HADYEK Başkanı

Ek-1. (devam) Etik Kurul Onayı

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Kollajen ile indüklenen artrit modelinde inflamatuvar durumlarda ifade edilen tolerans indükleyici potansiyel terapötik genle artrit tedavisi: Romatoid artrit tedavisi için yeni bir strateji*
	ARAŞTIRMA SORUMLUSU	**Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL**
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doç. Dr. Murat YALÇIN Doç. Dr. Musa Özgür ÖZYİĞİT
	KURUMU	UÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD
	ARAŞTIRMANIN TAHMİNİ SÜRESİ	3 Yıl
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	200 Adet Erkek Fare
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	TÜBİTAK'a Başvurulacak

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	01.03.2013

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2013 - 06 / 02 Tarih : 05.03.2013

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi.

1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması,
2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması,
3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi,
4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması,
5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK Başkan	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAL Başkan Yardımcısı	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. M. Müfit KAHRAMAN Üye	Vet- Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Nevzat KAHVECİ Üye	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Türel ÖZKUL Üye	Veteriner - Deontoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Sibel TAŞ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Serdal DİKMEN Üye	Vet- Zootekni	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Yrd. Doç. Dr. Bülent EDİZ Üye	Tıp - Biyoistatistik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
İbrahim YAŞAR Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Avukat	☐ E ■ H			

* Araştırma ile İlişkisi

Ek-1. (devam) Etik Kurul Onayı

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

Taner GÜLER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ziraat Yüksek Mühendisi	☐ E ■ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	UÜ-DEHYUAM	☐ E ■ H			



* Araştırma ile İlişkisi

ÖZGEÇMİŞ



KişiselBilgiler

Soyadı, adı : SOYDAŞ, Ayşe Özden
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 1977-İskenderun
Medenihali : Evli
Telefon : 5052749083
e-mail : aobarazi@gmail.com

Eğitim

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Doktora	Gazi Üniversitesi	Devam ediyor
Uzmanlık	Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi III.Biyokimya Kliniği	2009
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2002
Lise	İskenderun İstiklal Makzume Anadolu Lisesi	1995

İşDeneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
2011-Devam ediyor	Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nilüfer Ek Bina Biyokimya Lab.	Uzman Hekim
2009-2011	Ankara Etlik İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Kliniği	Uzman Hekim
2004-2009	Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi III.Biyokimya Kliniği	As.Dr.
2003-2004	Yozgat Çekerek Merkez Sağlık Ocağı	Pratisyen Hekim
2002-2003	Yozgat Çekerek Bazlambaç Sağlık Ocağı	Pratisyen Hekim

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Acar, F.S., Inal, E.E., Soydas, A.O., Ozoran, K., Bodur, H. ve Yildirimkaya, M.M. (2009). Frequency of mutated allele CYP2D6*4 in the Turkish ankylosing spondylitis patients and healthy controls. *Erden G Rheumatol Int*, 29(12), 1431-4.

Erden, G., Barazi, A.O., Tezcan, G. ve Yildirimkaya, M.M. (2008). Biological variation and reference change values of CA 19-9, CEA, AFP in serum of healthy individuals. *Scand Journal Clin Lab Invest*, 68(3), 212-318.

Erden, G., Barazi, A.O., Tezcan, G. ve Yildirimkaya, M.M. (2008). Biological Variation and Reference Change Value (RCV) of TSH, Free T3, and Free T4 Levels in Serum of HealthyTurkish Indıvıduals. *Turk Journal Med Sci*, 38(2), 153-158.

Gul, K., Celebi, A.S., Kacmaz, F., Ozcan, O.C., Ustun, I., Berker, D., Aydin, Y., Delibasi, T., Guler, S. ve Barazi, A.O. (2009). Tissue Doppler imaging must be performed to detect early left ventricular dysfunction in patients with type 1 diabetes mellitus. *Eur Journal Echocardiogr*, 10(7), 841-6.

Gül, K., Ustün, I., Aydin, Y., Berker, D., Erol, H.K., Unal, M., Barazi, A.O., Delibaşi, T. ve Güler, S. (2010). Carotid intima-media thickness and its relations with the complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *Anadolu Kardiyol Dergisi*, 10(1), 52-58.

Gül, K., Ustün, I., Aydin, Y., Berker, D., Erol, H.K., Unal, M., Barazi, A.O., Delibaşi, T. ve Güler, S. (2009). Autoimmune thyroid disease in patients with anti-GAD positive type 1 diabetes mellitus. *Cent Eur Journal Med*, 4(4), 415-422.

Ustundag, Y., Akdogan, M., Demirci, H., Gunay, L., Huysal, K.,Cevik, S.G. ve Barazi, A. (2017). High density lipoprotein-3 in diabetic retinopathy patients: relationship to total antioxident capacity and nitric oxide level. *Int Eye Sci*, 17(12), 2197-2022.

B. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Erden, G., Tezcan, G.. Soydaş, A.O. ve Yildirimkaya, M.M. (2009). Biological Variation and Reference Change Value (RCV) of Prostat Spesific Antigen (PSA) Levels in Serum of Healthy Young Indıvıduals. *Gazi Tıp Dergisi*. 20, 152-156

Erden, G., Yürkölmez, Ş., Korkmaz, M., Aydoğan, F., Soydaş, A.Ö., Koca, G., Demirel, K. ve Yıldırımkaya, M.M. (2006). Evaluation of The Plasma B-Type Natriuretic Peptide (BNP) Levels Before And After Administration of Pharmacological Stress Agent Dipyridamole During Myocard Perfusion Scintigraphy. *Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi,* 10, 2.

Uçar, F., Yavuz-Taşlıpınar, M., Soydaş, A.Ö. ve Özcan, N. (2012). Ankara Etlik İhtisas Hastanesine Başvuran Hastalarda 25-OH Vitamin D Düzeyleri. *Eur Journal Basic Med Sci*, 2(1), 12-15.

Katıldığı kurs ve kongreler

1. Uluslar arası Katılımlı Yeni Nesil İmmünoloji Testleri Çalıştayı, Gazi Üniversitesi Ankara, 24-25 Ekim 2017.

2. IFCC World Lab Istanbul 2014, Istanbul, 22-26 Haziran 2014.

3. Turk İmmunoloji Derneği Bölgesel Sempozyumları VIII, Kahramanmaraş, 10-12 Mayıs 2012.

4. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, 29 Kasım- 2 Aralık 2011.

5. XVII. Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi, İstanbul Üniversitesi DETAE İmmunoloji ABD, İstanbul, 20-24 Haziran 2011.

6. T.C. Sağlık Bakanlığı Aile Hekimliği 1. Aşama Uyum Eğitimi Sertifikası, Ankara, 21-27 Ocak 2010.

7. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 3. Ankara Tıp Biyokimya Günü, Ankara, 13 Nisan 2010.

8. X. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Türk Klinik Biyokimya Derneği, Fethiye, 15-18 Nisan 2010.

9. Türk Biyokimya Derneği, Laboratuvar Verilerinin Karar Verme Sürecinde ve Bilimsel Araştırmalarda Kullanım: Veri Madenciliği Kursu, Ankara, 6 Mayıs 2010.

10. Türk Biyokimya Derneği, Tıbbi Laboratuvarlarda Bilişim Teknolojileri Sempozyumu, Ankara, 7-8 Mayıs 2010.

11. Türk Klinik Biyokimya Derneği, Sürekli Mesleki Gelişim Okulu, Eskişehir, 28-30 Mayıs 2010.

12. Arteriyel Kan Gazı ve Prohormonlar Sempozyumu, Türk Klinik Biyokimya Derneği Ankara Şubesi, Ankara, 12 Haziran 2010.

13. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2. Ankara Tıp Biyokimya Günü, Ankara, 30 Nisan 2009.

14. Türk Biyokimya Derneği, XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, 28-31 Ekim 2009.

15. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara Tıp Biyokimya Günü, Ankara, 25 Nisan 2008.

16. Avrupa birliği Meda Programı 'Yeterlilik Testleri ve Laboratuvarlar Arası Karşılaştırmalar; Belirlenmesi, Denetlenmesi ve Değerlendirilmesi' Projesi YT/LAK sağlayıcılarının Akreditasyonu ve Kalite Yönetimi Eğitimi, TÜRKAK Ankara, 9-10 Ocak 2007.

17. Biyokimya ve Moleküler Biyolojide Modern Teknikler Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü ve GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD, Didim, 18-28 Haziran 2007.

18. XV. Congress of Balkan Clinical Laboratory Federation, Antalya-Turkey, 04-07 September 2007.

19. Günümüzde Elektroforez Uygulamaları ve Klinik Önemi Sempozyumu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 6-7 Nisan 2006.

20. Light Cycler 1.5 Real Time PCR Eğitim Sertifikası, Roche Diagnostik Sis., Ankara, 13-14 Şubat 2006.

21. Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar Sempozyumu, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 13-15 Nisan 2005.

22. Hacettepe Üniversitesi Tıp fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi Cerrahi Araştırma Ünitesi Laboratuvar Hayvanları Kullanım Kursu, Ankara, 6 Nisan 2005.

23. Türk Biyokimya Derneği 19. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 22-25 Nisan 2005.

24. GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD Moleküler Yaşlanma Çalıştayı, Ankara 21-22 Kasım 2005.

25. GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya ABD ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD II. Ulusal HPLC ve Diğer Seperasyon Teknikleri Sempozyumu, Ankara, 07-09 Ekim 2004.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

