



T.C.  
Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**İNSAN İNDOLAMİN -2, 3-DİOKSİJENAZ (İDO)  
GENİNİN ELAM-1 PROMOTORU  
KONTROLÜNDE KLONLANMASI VE  
EKSPRESYONU**

**MEHMET KARAÇAY**

**Yüksek Lisans Tezi**



**İNSAN İNDOLAMİN -2, 3-DİOKSİJENAZ (İDO)  
GENİNİN ELAM-1 PROMOTORU KONTROLÜNDE  
KLONLANMASI VE EKSPRESYONU**

**MEHMET KARAÇAY**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN İNDOLAMİN -2, 3-DİOKSİJENAZ (İDO) GENİNİN ELAM-1  
PROMOTORU KONTROLÜNDE KLONLANMASI VE EKSPRESYONU**

**MEHMET KARAÇAY**

Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY  
(Danışman)

Prof. Dr. H. Barbaros ORAL  
(İkinci Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2017

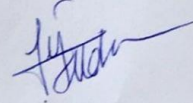
## TEZ ONAYI

Mehmet Karaçay tarafından hazırlanan "İNSAN İNDOLAMİN -2, 3-DİOKSİJENAZ (IDO) GENİNİN ELAM-1 PROMOTORU KONTROLÜNDE KLONLANMASI VE EKSPRESYONU" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY

**İkinci Danışman** : Prof. Dr. H. Barbaros ORAL (Uludağ Üniversitesi)

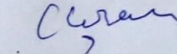
**Başkan:** Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

  
İmza

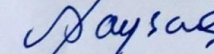
**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Elif UZ  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

  
İmza

**Üye:** Doç. Dr. Ceren ÇIRACI  
İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

  
İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Ali BAYRAM  
Enstitü Müdürü  
28.4.2012

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - görsel, iÇitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - baÇkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
  - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya baÇka bir üniversitede baÇka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

.././....

**Mehmet KARAÇAY**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN İNDOLAMİN -2, 3- DİOKSİJENAZ (İDO) GENİNİN ELAM-1  
PROMOTORU KONTROLÜNDE KLONLANMASI VE EKSPRESYONU

**Mehmet KARAÇAY**

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY

**İkinci Danışman:** Prof. Dr. H. Barbaros ORAL (Uludağ Üniversitesi)

İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıtsız kalması olarak tanımlanmıştır. İmmün sistem bazı patolojik durumlarda ve immün toleransın kırılması sonucunda, öz antijenlerine karşı duyarlı hale gelerek, kendi doku antijenlerine karşı reaksiyona geçmektedir. Böylece immün tolerans bozularak otoimmün hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Otoimmün hastalıkların görülme sıklığı toplum genelinde %1-2 oranındadır. Birçok otoimmün hastalıkta triptofan aminoasit katabolizmasıyla ilgili teoriler ortaya atılmıştır. Triptofan aminoasit katabolizmasının bağılangıç ve hız sınırlayıcı adımını gerçekleştiren İndolamin 2, 3-dioksijenaz (IDO), hücre içi bir enzimdir. IDO kullanımı sonucunda T hücre aktivasyonu baskılanırken, triptofanın katabolik ürünü olan kinürinin ve türevleri, serbest oksijen radikalleri gibi moleküller T hücre proliferasyonunu ve yaşımlarını düzenlerler. Endotel Lökosit Adezyon Molekülü-1 (ELAM-1) lökositlerin enflamasyonlu dokulara göçünde yer alan bir moleküldür. Normal koşullar altında endotel hücrelerde düşük düzeylerde eksprese edilir. Ayrıca endotel hücre kültürlerinde IL-1 (İnterlökin-1) ve TNF (Tümör Nekroz Faktör) gibi sitokinler tarafından 4-6 saat gibi kısa bir sürede uyarılabilir. Bu tez çalışmasının amacı ELAM-1 promotor kontrolünde klonlanan *IDO* geninin sadece enflamasyon koşulları altında ekspresyonunu sağlamaktır. Bu amaçla hazırlanan plazmit memeli hücre hattı olan HeLa hücrelerine aktarılmış ve sitokinler aracılığı ile uyarılarak IDO aktivasyonu gözlemlenmiştir. IDO ekspresyonu ELISA, qRT-PZR ve Western blot analizleriyle gösterilmiştir. Bu çalışmanın devamında yapılması planlanan hayvan modelleme çalışmalarıyla birçok otoimmün hastalığa yeni bir gen tedavisi yaklaşımı olarak kullanılıp kullanılmayacağı belirlenecektir.

**Anahtar Kelimeler:** İndolamin 2, 3-dioksijenaz (IDO), ELAM-1 promotor, Gen tedavisi, Klonlama, ELISA, qRT-PZR, Western blot analizi

2017, x + 91 sayfa.

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### CLONNING AND EXPRESSION OF HUMAN INDOLAMINE -2, 3 - DIOXYGENASE GENE UNDER THE CONTROL OF THE ELAM-1 PROMOTOR

**Mehmet KARAÇAY**

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetic

**Supervisor:** Asst. Prof. Dr. Figen ERSOY

**Second Supervisor:** Prof. Dr. H. Barbaros ORAL (Uludag University)

Immunological tolerance is defined as the unresponsiveness of lymphocytes facing with antigen. In some pathological conditions and as a result of breaking of the immunological tolerance, the immune system becomes susceptible to its own antigens and undergoes a reaction against its own tissue antigens. Thus, immunological tolerance is impaired and autoimmune diseases arise. The prevalence of autoimmune diseases is 1-2% in the general population. In many autoimmune diseases there are theories about the tryptophan amino acid catabolism. Indolamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is an intracellular enzyme that initiates and rate-limits the catabolism of tryptophan amino acid. As a result of IDO usage T cell activation is repressed while catabolic products of tryptophan such as kynurenine, kynurenine derivatives and free oxygen radicals, regulate T cell proliferation and survival. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 (ELAM-1) is a molecule which is involved in the migration of leukocytes to inflammatory tissues. Under normal conditions it is expressed at low levels in endothelial cells. It can also be stimulated with cytokines such as IL-1 (Interleukin-I beta) and TNF (Tumor Necrosis Factor) in endothelial cell cultures in a short time as 4-6 hours. The aim of this thesis is to provide expression of the IDO gene, which is cloned under ELAM-1 promoter control, during only inflammatory conditions. The plasmid that is prepared for this purpose was transferred to mammalian cell line HeLa and IDO activation was observed by stimulation with cytokines. Expression of IDO was shown by ELISA, qRT-PCR and Western blot analysis. The animal modeling studies that will be carried out in the future, will determine if we can use it as a new gene therapy approach to many autoimmune diseases or not.

**Key Words:** Indolamine 2, 3-dioxygenase (IDO), ELAM-1 promotor, Gene therapy, Clonning, ELISA, qRT-PCR, Western blotting

**2017, x + 91 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım süresince bana rehber olan, çalışmamı bilimsel temeller ıçığında Çekillendiren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY'a,

Engin immünoloji bilgisi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmanın temellerini güçlendiren, tez çalışmamda maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen eÇ danışman hocam Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a,

Bizleri danışmanı olduğu öğrencilerden kayırmayan ve her zaman öncülük edip yol gösteren Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sezai TÜRKEL hocama,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek tez çalışmam ve gerekse diğer proje çalışmalarında manevi desteğini esirmeyen ve bana her zaman vakit ayıran hocam Yrd. Doç. Dr. Elif UZ'a,

Beni hayatımın her döneminde destekleyen, kararlarımın her zaman saygı duyan ve uzakta olsalar bile bunu hissettirmeyen sevgili annem, babam ve kardeşime,

Desteklerini esirgemeyen ve beni yüreklendiren sevgili arkadaşlarıma,

Çalışmamıza maddi katkıda bulunan TÜBİTAK'a (113S354 nolu "Kollajen ile indüklenen artrit modelinde inflamatuvar durumlarda ifade edilen tolerans indükleyici potansiyel terapötik genle artrit tedavisi: Romatoid artrit tedavisi için yeni bir strateji" isimli proje),

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Mehmet KARAÇAY**

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



# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZETLER.....	iv
SÖZLEŞMELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGE DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmünolojik Tolerans.....	3
2.1.1. T Hücre Toleransı.....	4
2.1.1.1. T Hücrelerinde Santral Tolerans.....	4
2.1.1.2. T Hücrelerinde Periferik Tolerans.....	5
2.1.2. B Hücre Toleransı.....	8
2.1.2.1. Santral B Hücre Toleransı.....	8
2.1.2.2. Periferik B Hücre Toleransı.....	9
2.2. Otoimmünite.....	9
2.3. Otoimmüniteyi Etkileyen Faktörler.....	10
2.3.1. Genetik Faktörler.....	10
2.3.2. Çevresel Faktörler.....	10
2.4. Otoimmün Hastalıklar.....	12
2.4.1. Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar.....	12
2.4.2. Sistemik Otoimmün Hastalıklar.....	13
2.5. Model Otoimmün Hastalık Olarak Romatoid Artrit.....	14
2.6. Triptofan Metabolizması ve İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO).....	15
2.7. L-Triptofan'ın Kinürinin Metabolik Yolu.....	16
2.8. Selektinler.....	17
2.8.1. L-Selektin (SELL).....	17
2.8.2. P-Selektin (SELP).....	17
2.8.3. Endotel Lökosit Adezyon Molekülü-1 (ELAM-1).....	18
2.9. Gen Tedavisi ve Gen Transfer Yöntemleri.....	19
2.9.1. Biyolojik Yöntemler.....	20
2.9.2. Fiziksel ve Kimyasal Yöntemler.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. İnsan IDO ( <i>hIDO</i> ) geninin ticari olarak elde edilerek ELAM-1 promotor downstream kısmına klonlanması.....	22
3.1.1. ELAM-1 promotor bölgesinin çoğaltılması.....	24
3.1.2. ELAM-1 promotor bölgesi amplifikasyonunun 3' ucuna A takılması.....	25
3.1.3. pGEM-T Easy vektörüne bantların klonlanması.....	25
3.1.4. <i>E. coli</i> kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması.....	26
3.1.5. Plazmit izolasyonu.....	26
3.1.6. İzole edilen plazmitlerin görüntülenmesi.....	27
3.1.7. ELAM-1 promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektöründen kesilerek çıkartılması.....	27
3.1.8. CMV promotor bölgesinin pCMV/ <i>hIDO</i> vektöründen kesilerek çıkartılması.....	28

3.1.9. ELAM-1 promotor bölgesinin pCMV/hIDO hygro plazmitine klonlaması .....	28
3.1.10. <i>E. coli</i> kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması .....	28
3.1.11. Plazmit izolasyonu .....	29
3.1.12. Özole edilen plazmitlerin görüntülenmesi .....	29
3.1.13. <i>E. coli</i> kompetan hücrelere ticari ve klonlanmış plazmitlerin aktarılması .....	29
3.1.14. Hücre kültürüne aktarılmak üzere Midi-Prep plazmitlerin hazırlanması.....	30
3.2. Hücre Kültürü.....	31
3.2.1. Hücre Materyali .....	31
3.2.2. Donmuş hücrelerden kültür yapılması.....	31
3.2.3. Hücrelerin pasajlanması .....	31
3.2.4. Hücrelerin sayılması.....	32
3.3. HeLa hücre hattına pCMV/βgal plazmitinin transfer edilmesi .....	33
3.3.1. HeLa hücrelerin fikse edilmesi .....	35
3.3.2. HeLa hücrelerin X-gal boyaması .....	36
3.4. ELAM-1 promotor aktivitesinin belirlenmesi.....	36
3.4.1. pCAT/ELAM-1pro, pCAT/kontrol ve pCMV/βgal plazmitlerinin hücre hattına transfer edilmesi .....	36
3.4.2. ELAM-1 promotor aktivasyonunun CAT ELISA yöntemi ile belirlenmesi.....	38
3.5. HeLa hücrelerinin pCAT/ELAM-1pro. ve pCMV/hIDO plazmitleriyle eğ transfeksiyonu .....	39
3.6. EĞ transfeksiyon sonra CAT ekspresyonu ELISA yöntemi ile analiz edilmesi.....	42
3.7. Klonlanan pELAM-1pro./hIDO plazmitinin HeLa hücrelerine transfer edilmesi ...	42
3.7.1. pELAM-1pro./hIDO ile transfekte edilen HeLa hücrelerindeki IDO ekspresyon seviyesinin ELISA ile belirlenmesi.....	43
3.7.2. pELAM-1pro./hIDO plazmiti ile transfekte edilen HeLa hücrelerinden RNA izole edilmesi .....	45
3.7.2.1. RNA kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi .....	45
3.7.2.2. RNA'dan cDNA sentezi.....	46
3.7.2.3. HeLa hücrelerindeki IDO geninin transkript seviyelerinin eğ zamanlı PZR ile analizi	46
3.7.2.4. HeLa hücrelerinde hIDO geninin saatli transkripsiyon ölçümleri .....	48
3.8. Western blot analizi.....	48
3.8.1. Protein izolasyonu .....	49
3.8.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	50
3.8.2.1. BSA standartlarının hazırlanması .....	50
3.8.2.2. BCA Ölçümü.....	50
3.8.3. Proteinlerin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi.....	51
3.8.4. Proteinlerin membrana transfer edilmesi .....	52
3.8.5. GAPDH proteinlerinin belirlenmesi .....	52
3.8.5.1. Membran bloklama .....	52
3.8.5.2. Birinci antikor .....	52
3.8.5.3. İkincil antikor .....	52
3.8.5.4. Görüntüleme.....	53
3.8.6. IDO (Indolamin 2,3-oksijenaz) proteinlerinin belirlenmesi.....	53
3.8.6.1. GAPDH birincil ve ikincil antikorun membrandan uzaklaştırılması.....	53
3.8.6.2. Bloklama .....	53
3.8.6.3. Birincil antikor .....	53
3.8.6.4. İkincil antikor .....	54

3.8.6.5. Görüntüleme.....	54
4.BULGULAR.....	55
4.1. PZR Reaksiyon Sonuçları.....	55
4.2. ELAM-1 promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması.....	55
4.3. ELAM-1 promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektöründen ve CMV promotor bölgesinin pCMV/hIDO vektöründen kesilerek çıkarılması.....	57
4.4. ELAM-1 promotor bölgesi ile pCMV/hIDO plazmitlerinin birleştirilmesi.....	58
4.5. ELAM-1 promotor bölgesinin nükleotid sekansı hizalamaları.....	59
4.6. HeLa Hücrelerine Gen Transfeksiyon Etkinliğinin Saptanması.....	61
4.7. ELAM-1 promotor aktivitesinin CAT ELISA Sonuçları.....	62
4.8. EĞ Transfeksiyon Sonuçları.....	63
4.9. pELAM-1pro./hIDO Transfeksiyonu Sonrası ELISA Sonuçları.....	65
4.10. HeLa Hücrelerindeki Transkripsiyon Ölçüm Sonuçları.....	66
4.11. Western blot Analiz Sonuçları.....	69
5. SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	75
EKLER.....	82
EK 1. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması.....	83
1. Agaroz Jel Hazırlanması.....	83
2. LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı Hazırlanması.....	83
3. LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması.....	84
EK 2. Vektör ve plazmit sekansları.....	85
1. ELAM-1 promotor sekansı.....	85
2. İnsan Indolamin 2, 3-dioksijenaz (hIDO) gen sekansı.....	85
3. pCVM/hygro vektör sekansı.....	85
4. pCMV/ $\beta$ galaktosidaz plazmit sekansı.....	87
5. pCAT/kontrol plazmit sekansı.....	89
6. pCAT/ELAM-1pro plazmit sekansı.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	91

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
$\gamma$	Gama
$\Delta\text{CT}$	Delta EĞik Döngüsü
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{L}$	Mikrolitre

### Açıklama

### Kısaltmalar

ASH	Antijen Sunan Hücre
Bç	Baz çifti
Bkz	Bakınız
$\beta\text{gal}$	Beta galaktosidaz
$\text{CaCl}_2$	Kalsiyum klorid
CAT	Kloramfenikol asetiltransferaz
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CMV	Sitomegalovirüs
DCs	Dentritik hücre
ddH <sub>2</sub> O	Duble Distile Su
DEPC	Dietilpirokarbonat
dk	Dakika
DMF	Dimetilformamid
dNTP	Deoksi-nükleotid trifosfat
dsRNA	Çift sarmal RNA
DTT	Dithiothreitol solüsyon
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünsorbent Analizi
EtBr	Etidyum Bromür
h	Saat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
Hpi	İnokülasyon sonrası geçen saat
HRP	Horse Radish Peroksidaz
IL-1 $\beta$	İnterlökin 1 beta
qRT-PZR	Kantitatif EĞ Zamanlı PZR
LPS	Lipopolisakkarit
mg	Milligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
ng	Nanogram

### Açıklama

p  
PBS  
pmol  
PZR  
RNA  
Rpm  
SD  
sn  
TBE  
TBS-T  
Th  
THR  
U  
UV

Plazmit  
Fosfat Tamponlu Tuz  
Pikomol  
Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
Ribo Nükleik Asit  
Dakikada devir  
Standart sapma  
Saniye  
Tris-Borik Asit-EDTA  
Tris Tampon Tuzu- Tween20  
T yardımcı hücresi  
T hücre reseptörü  
Ünite  
Mor ötesi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

ğekil 2.1. T hücrelerinde santral tolerans indüklenmesinin Çematik gösterimi.....	5
ğekil 2.2. Periferik T hücre toleransının Çematik olarak gösterimi.....	8
ğekil 2.3. Romatoid artrit sinoviyal doku hücreleri .....	14
ğekil 2.4. Memelilerde L-Triptofan metabolizmasının Kinürinin yolağı .....	16
ğekil 2.5. ELAM-1 promotor sekansı ve NF- κB bağlanma bölgeleri.....	19
ğekil 3.1. pCMV/ hygro vektörü ve sekans referans noktaları .....	22
ğekil 3.2. pGEM-T Easy vektörü ve sekans referans noktaları.....	23
ğekil 3.3. pELAM-1pro./hIDO vektörü ve sekans referans noktaları.....	24
ğekil 3.4. Hemositometrede sayım alanı .....	33
ğekil 3.5. 24 kuyulu plak üzerindeki pCMV/βgal transfeksiyon düzeni .....	34
ğekil 3.6. ELAM-1 promotor aktivite ölçüm planı .....	38
ğekil 3.7. pCAT/ELAM-1pro. ve pCMV/hIDO plazmitleriyle eÇ transfeksiyon deney planı.....	41
ğekil 3.8. HeLa hücrelerine aktarılacak pELAM-1pro./hIDO plazmitinin transfeksiyon planı.....	43
ğekil 4.1. ELAM-1 promotor amplifikasyonları %1 lik agaroz jel görüntüsü.....	55
ğekil 4.2. LB ampisilin agar görüntüsü.....	56
ğekil 4.3. ELAM-1 promotor <i>SacI</i> ve <i>MLuI</i> restriksiyon kesimi .....	57
ğekil4.4. pGEM-T Easy rekombinantlarının ve pCMV/hIDO vektörünün <i>MLuI</i> ve <i>SacI</i> enzimleri ile kesimi sonrasında 1% agaroz jelde görüntüsü .....	58
ğekil 4.5. pCMV/hIDO ve pELAM-1pro./hIDO rekombinantlarının <i>MLuI</i> ve <i>SacI</i> kesimi sonrasında %1 agaroz jelde görüntüsü .....	59
ğekil 4.6. Dizi analizi sonrasında elde edilen sekansların NCBI/BLAST programı ile hizalanması.....	60
ğekil 4.7. Transfeksiyon ve boyama sonrası HeLa hücrelerinin görüntüsü.....	61
ğekil 4.8. pCAT/ELAM-1pro. transfeksiyonu sonrası CAT ELISA aktivite sonucu .....	63
ğekil 4.9. pCAT/ELAM-1pro. ve pCMV/hIDO eÇ transfeksiyonu sonucu CAT aktivitesi .....	64
ğekil 4.10. pELAM-1pro./hIDO transfekte edilen hücrelerin uyarılma sonrası ELISA verileri .....	65
ğekil 4.11. BSA standart eğri grafiğı .....	69
ğekil 4.12. Western blot analiz sonucu .....	70

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Organ spesifik otoimmün hastalıklar ve hedef organları .....	13
Çizelge 4.1. pELAM-1pro./hIDO 24 saatlik transfeksiyon ve stimülasyon sonrası transkripsiyon verileri .....	66
Çizelge 4.2. pELAM-1pro./hIDO plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 2 ng/mL ve 5 ng/mL dozlarda IL-1 $\beta$ ile saatli uyarımı sonucunda gerçekleşen transkripsiyon sonuçları .....	67
Çizelge 4.3. pCMV/hIDO plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 2 ng/mL ve 5 ng/mL dozlarda IL-1 $\beta$ ile saatli uyarımı sonucunda gerçekleşen transkripsiyon sonuçları .....	68
Çizelge 4.4. pCMV/ $\beta$ gal plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 2 ng/mL ve 5 ng/mL dozlarda IL-1 $\beta$ ile saatli uyarımı sonucunda gerçekleşen transkripsiyon sonuçları .....	68
Çizelge 4.5. Örneklerin protein konsantrasyonları (mg/mL) .....	69

## 1.GİRİŞ

İmmünite, hastalığa özellikle de enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem adı verilir. İmmün sistemdeki hücre ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalara karşı verdikleri düzenli tepkiye ise immün yanıt denir. Normal bir immün sistemin önemli özelliklerinden biri, birçok mikroba karşı yanıt oluştururken, organizmanın kendi öz antijenlerine karşı yanıt oluşturmamasıdır (Abbas ve Lichtman 2007).

Doğal bağışıklık sistemi, kendine ait olan ve olmayanı ayırt edebilmek için genetik olarak kodlanmış reseptörlere sahiptir. Edinsel bağışıklık sistemi hücrelerinden B hücrelerinin reseptörleri (BHR) ve T hücrelerinin reseptörleri (THR) her bireyde karşılaşılabilecek epitoplardan habersiz olarak üretilirler. Sonuç olarak BHR ve THR kendinden olup olmayana tanıma özelliğine sahiptir. Öze tepki gösterme yeteneği olan hücrelerin tanınması, denetlenmesi ve ortamdaki uzaklaştırılması için belirli mekanizmalar geliştirilmiştir. Öz antijenlere tepkili hücrelerin etkisiz kılınmasını ve ortadan kaldırılmasını sağlayan mekanizmalarda oluşan düzensizlikler, otoimmüniteye yol açabilir (Doan ve ark. 2013).

Otoimmün hastalıklar bilimsel olarak ilk kez 20. yüzyılın başlarında Paul Ehrlich tarafından "ototoksik deşet (horror autotoxicus)" olarak tanımlanmıştır. Ehrlich deney hayvanları üzerinde yaptığı çalışmalarda bazı antikorların organizmanın kendi dokularına zarar verdiklerini, bazılarının ise bu zarar verici etkileri önleyecek çeşitli mekanizmalar gerçekleştirdiklerini belirtmiştir (Addams 1996).

Bu mekanizmaların başarısızlığı sonucunda immün sistem elemanları bireyin kendi hücre ve dokularına saldırarak çeşitli hastalıklara sebep olurlar. Bu hastalıklara otoimmün hastalıklar denilmektedir (Abbas ve Lichtman 2007).



Romatoid artrit, Multipl skleroz, Tip I Diyabet Mellitus, Sistemik lupus eritematozus, Psöriazis, Hoshimoto's Sendromu, Sjögren's Sendromu, Crohn Hastalığı ve Grave's hastalığı bilinen otoimmün hastalıklardır (Murphy 2012).

Bu hastalıklar tüm dünyada yaygın olmamalarına rağmen, batı ülkelerinde görülme oranı yaklaşık olarak %5'tir (Murphy 2012). Otoimmünite farklı mekanizmalar aracılığıyla gelişmektedir, henüz tanımlanmamış pek çok çevresel ve genetik faktörler ile meydana geldiği düşünülmektedir (Doan ve ark. 2013).

Bu tez çalışmasındaki amaç, otoimmün hastalıkların gelişmesinde rolü olduğu bilinen triptofan metabolizmasını hedefleyerek, triptofan aminoasit oranında bir artış gözlenmesi ve buna bağlı olarak eklemlerde meydana gelen enflamasyonu azaltmaya yönelik hedef gen tedavisi uygulanması için hedef genin uygun zamanda ifade edileceği vektörün hazırlanmasıdır.

Bu tedavi sayesinde immün hemostaziyi sağlayarak hastalığın oluşum aşamasında baskılanmasını ve ileride yapılması planlanan hayvan modelleme çalışmalarına yardımcı olabilecek veriler elde edilmesi beklenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İmmünolojik Tolerans

İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıtı 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 tetiklese tolerojenler olarak adlandırılırlar. 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 ifade edilirler. Reseptörlerin özgüllüğü, rekombine olmuş genler tarafından rastgele kodlanır. Bireyde neyin yabancı, neyin öz olduğundan etkilenmez (Abbas ve ark. 2015).

Özgün immün ve otoimmün yanıtlar aynı bileşenleri içerirler. Bu bileşenleri içeren antijenler, etkiledikleri 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 kosimülatör molekülleri, hücre yüzeylerinde bulunur. Fonksiyonel açıdan önemli birçok hücre farklılaşmış kümeler şeklinde hücre yüzeyleri ve reseptörleri ile terminolojik olarak Cluster of Differentiation (CD) adı verilen kimliklerle tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Van Parijs ve Abbas 1998).

Tolerans ilk olarak CD4 T hücrelerinde tanımlanmış olup, protein yapılı antijenlerin çoğunda immün yanıt geliştirdiği bilinmektedir. Bu hücreler öz antijenlere yanıt oluşturamazlarsa, hücre 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 (Abbas ve Lichtman 2007).

### **2.1.1. T Hücre Toleransı**

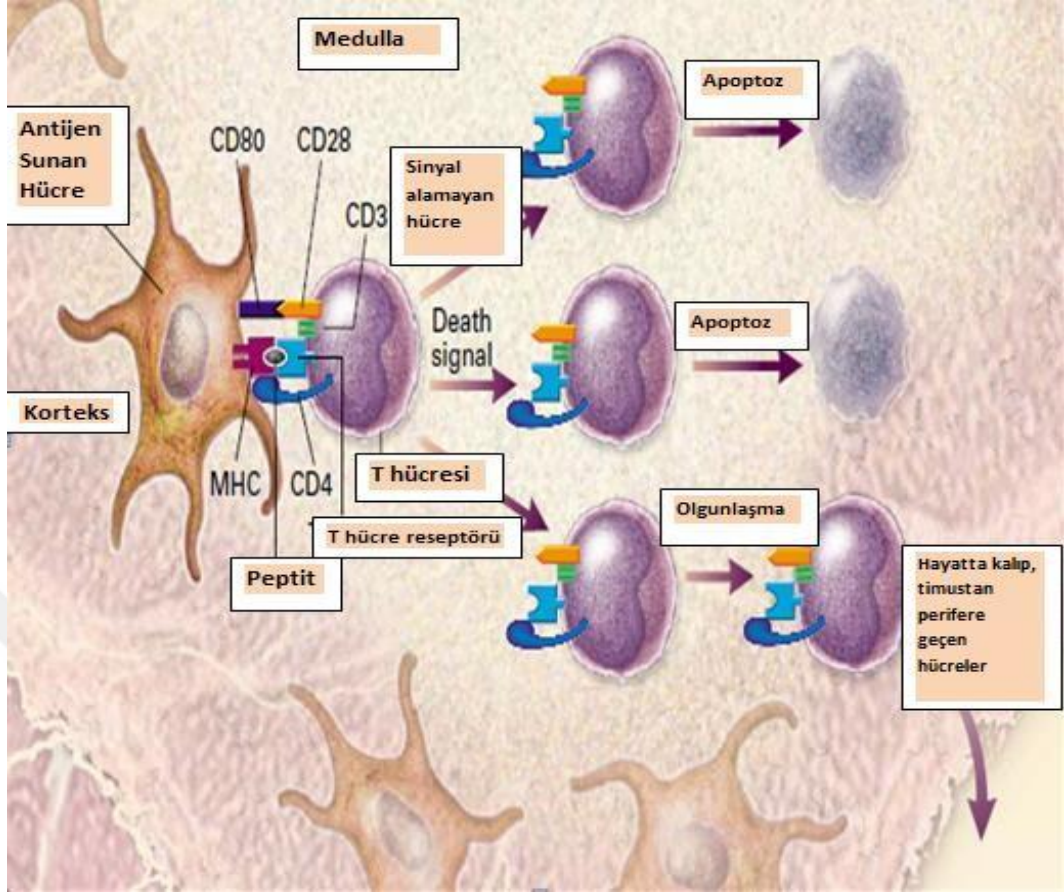
#### **2.1.1.1. T Hücrelerinde Santral Tolerans**

T hücre toleransının başlıca mekanizması timusta öz reaktif T hücrelerinin silinmesidir. Olgunlaşmamış T hücreler kemik iliğinden timusa göç ettikleri yerde, bu peptidlerden türetilerek Majör Doku Uygunluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex, MHC) moleküllerine bağlanmaları teşvik edilir (Delves ve Roitt 2000).

Düşük afiniteli T hücre reseptörleri, peptid-MHC kompleksinden sinyal alamadıklarında spontan bir şekilde apoptoz önlenir ve bu yüzden hücreler timüs içerisinde ölürler. T hücreleri yüksek afinite ile bu komplekslere bağlanırsa, yine apoptoza maruz kalırlar. Bu aşama negatif seçim olarak adlandırılır.

Eğer T hücre reseptörleri, bu komplekslere düşük seviyede bağlanma afinitesine sahipse, timusta olgunlaşır ve periferik göç eder. Bu aşama ise pozitif seçim olarak adlandırılır. Santral tolerans indüklenmesi için otoantijenlerin timüs içerisinde bulunması ve T hücrelerine tanıtılması gerekmektedir (Vafiadis ve ark. 1997, Klein ve ark. 2000).

Tüm öz antijenler timüs içerisinde oluşturulmazlar. Bu sebeple gerekli durumlarda periferik mekanizmalar T hücre toleransına katılır (Kitze ve ark. 1988).



**Şekil 2.1.** T hücrelerinde santral tolerans indüklenmesinin Çematik gösterimi (Kamradt ve Mitchison 2001).

### 2.1.1.2. T Hücrelerinde Periferik Tolerans

Periferik tolerans, timusta bulunmayan ve öz antijenlere karşı, T hücre yanıtının önlenmesini sağlayan bir yedek mekanizmadır. Periferik toleransta olgun T hücresi periferde öz antijenleri tanıdığıında gerçekleşir. Bunun sonucunda işlevsel olarak yanıtızsızlık, ölüm ya da düzenleyici T hücreler tarafından öze tepkili lenfositler baskılanır (Abbas ve ark. 2015).

### Anerji (İşlevsel Yanıtızsızlık Durumu)

T hücrelerinin aktivasyonunu sağlamak için iki uyarıya ihtiyaç vardır. THR'leri ASH (Antijen sunan hücre) yüzeyinde uygun bir MHC sınıf I ya da MHC sınıf II

proteinlerine bağlanarak T hücre aktivasyonu için gerekli olan birinci sinyali oluşturur. T hücreleri aktivasyona devam edebilmek için ASH'lerden ikinci sinyali almak zorundadır. İkinci sinyalin alınmaması durumunda naif T hücreleri, T hücre büyüme faktörü olan IL-2 sentezleyemediğinden inaktif hale gelir ve bu durum da anerji olarak tanımlanır (Doan ve ark. 2013). Ayrıca anerjide yaygın olarak görülen bazı anerjik T hücreleri IL-10 sentezlemeleri sonucunda T hücre aktivasyonunu baskırlar (Buer ve ark. 1998).

Bazı durumlarda öz antijenle karşılağan T hücreleri CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) ifade eden bir molekül sentezler. Bu molekül B7 molekülüne yüksek afinite ile bağlanma kapasitesine sahip olup, T hücrelerine cevap engelleyici bir sinyal gönderir. ASH yüzeyinde öz antijenle karşılağan T hücresi CTLA4 ile B7 molekülünü birbirine bağlayıp T hücre inaktivasyonuna sebep olur.

CTLA4 molekülü ile ilgili yapılan son çalışmalarda, CTLA4'ün öze tepkili T hücrelerinin kontrol altında tutulmasını sağladığı görülmüş aynı zamanda birçok otoimmün hastalık modelinin gelişmesinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Abbas 2007).

## **Silinme**

EĞ uyaran olmadan gerçekleşen antijen sunumunda öncül T hücrelerinin sadece bozulması değil aynı zamanda apoptoz yolğını tetikleyerek ortamdaki yok edilmesi silinme olarak adlandırılır (Akkaraju ve ark. 1997). Periferik mekanizmanın silinmesiyle sonuçlanan diğer bir mekanizma ise aktive edilmiş tüm T hücrelerindeki büyüme faktörü yoksunluğudur (Förster ve ark. 1995).

T hücre ölümü Fas (CD95) ve onun ligandını içeren (FasL) yolak aracılığıyla gerçekleşir. Fas pozitif hücrelerde Fas reseptörü apoptozu indükler (Suda T ve ark. 1993). T hücrelerinde ekspres olan hem Fas hem de FasL aktivasyonu, bu iki molekülün etkileşimi sonucunda apoptozu sebep olur (Dhein ve ark. 1995).

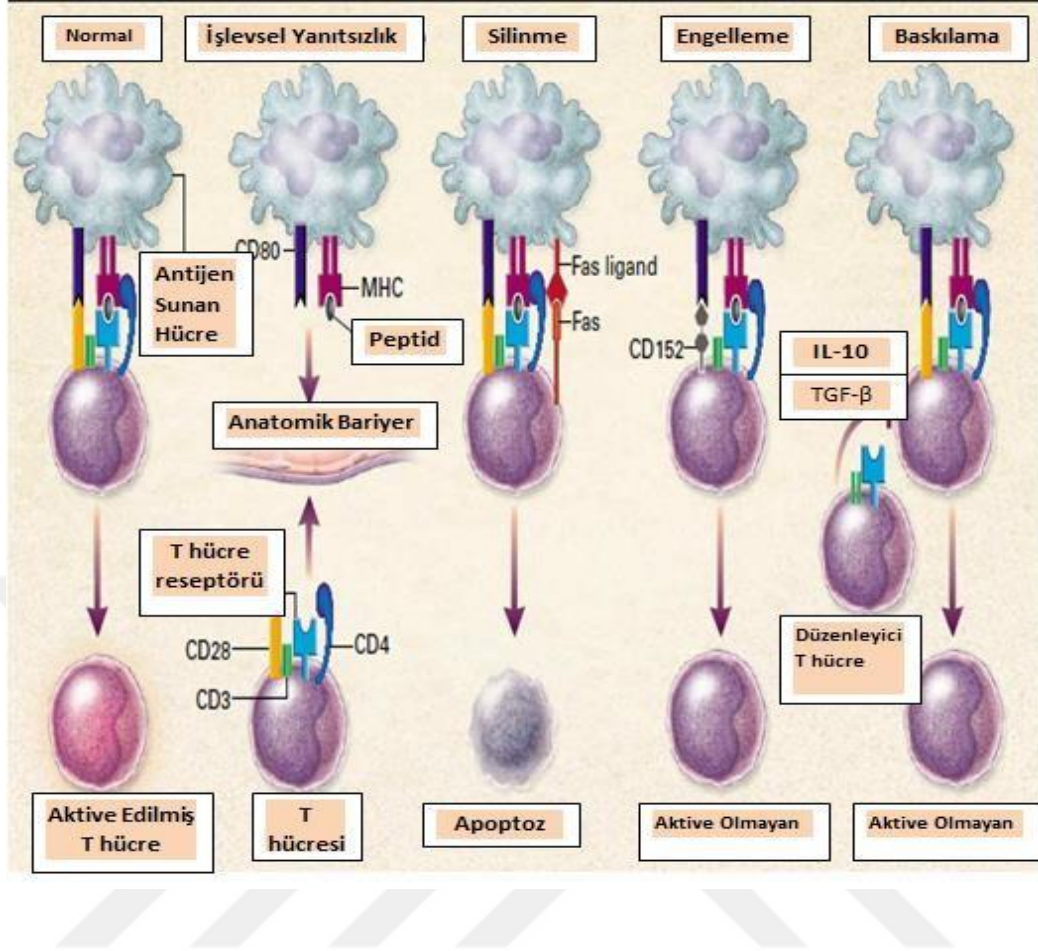
Bu mekanizmanın önemi Fas yoksunu birkaç hastada gösterilmiştir. Fas ve FasL genlerinde oluşan mutasyonlarda lenfosit birikimi sonucu otoimmün hastalık olduğu gözlenmiştir. Bu hastalıklar Lenfoproliferatif hastalık olarak tanımlanmıştır (Fisher ve ark. 1995). Bu hastalık apoptozun oluşumu esnasında meydana gelen eksiklikten ve karmaşık otoimmüniteden kaynaklanmaktadır.

Öz antijenlerle karşılaşan diğer mekanizma ise, daha önceden mikroorganizmalarla uyarılmış T hücreleri doğal immün yanıt sırasında oluşturdukları anti-apoptotik moleküllerin bunu engellemesiyle ve uyarıcı öz antijenler ise anti-apoptotik moleküller oluşmadan hücre apoptoza gitmektedir. Bu mekanizmada Fas ölüm yolu herhangi bir görev üstlenmemiştir (Abbas 2007).

### **İmmün Baskılama**

Öz antijenlerle karşılaşan öz tepkili T lenfositleri düzenleyici hücelere farklılaşabilir ya da otoimmün yanıt oluşturacak hücelere karşı bir immün baskılama gerçekleştirebilir. Düzenleyici hücelere bakıldığında, genelde CD4<sup>+</sup> hücre tipindedir ve yüksek seviyede IL-2 sitokinin alfa zincirini barındırır. Diğer düzenleyici hücelere ise IL-10 ve TGF- $\beta$  makrofaj ve lenfositlerin aktive edilmesini durduran sitokinler üretir (Abbas 2007).

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücreleri birçok antijen sunan hücre ile uyarılmış T hücre aktivitesini azaltarak enflamatuvar otoimmün hastalıkların oluşmasını engellemiştir. Otoimmün yanıtlarda öz antijenlere karşı oluşturulan yanıtlar genelde Th1 (T yardımcı hücresi 1) /Th2 (T yardımcı hücresi 2) dengesine bağlıdır (Doan ve ark. 2013).



**Şekil 2.2.** Periferik T hücre toleransının Çematik olarak gösterimi (Kamradt ve Mitchison 2001).

### 2.1.2. B Hücre Toleransı

T lenfositlerden farklı olarak otoantikor yapımını engelleyerek tolerans oluşumunu gerçekleştiren hücrelerdir. Santral ve periferik B hücre toleransı olarak iki farklı mekanizma ile gerçekleşir.

#### 2.1.2.1. Santral B Hücre Toleransı

Santral B hücre toleransında B hücreler, T hücrelerden farklı olarak kemik iliğinden farklılaşırlar. Henüz olgunlaşmamış B hücreler kemik iliğinde öz antijenlere yüksek afinite ile bağlanırsa negatif seçim yoluyla apoptoz ile ortamdaki uzaklaştırılır ya da

otoimmüniteyi engellemek için diğerk bir mekanizma olan reseptörlerin özgülüğünü değitirerek yeniden düzenlenmelerini sağlar (Pillai ve ark. 2011).

Kemik iliğinde öz antijenleri tanıyan olgunlağmamığ B hücreleri *Rag* genlerini yeniden eksprese ederek immünoglobulin G hafif zincir oluğumunu düzenler. Daha önceden oluğturulan hafif zincir, yeni oluğturulan hafif zincir ile birleğerek öz antijenlere spesifik olmayan yeni bir reseptör oluğturur. Bu da reseptör düzenleme olarak adlandırılır (Mauri ve Bosma 2012).

### **2.1.2.2. Periferik B Hücre Toleransı**

Periferik B hücre toleransı, kemik iliğini terk eden B hücrelerin periferde öz antijenlerle karđılađması sonucunda o antijene karđı herhangi bir yanıt oluğturmaması durumudur. Periferik B hücre toleransı, anerji ve olgun B hücrelerinin klonal delesyonunu içeren birkaç mekanizmayı barındırır. B hücrelerinin periferde aktivasyonu ancak ve ancak Th hücrelerinin yardımı ile gerçekteğir. Th yardımı olmadan B hücreler periferde öz antijen ile karđılađırsa anerjik hale gelir (Nemazee 2000).

Anerjik haldeki B hücreler lenfoid foliküllerden uzaklağabilir. Bu durumda hücreler yağamsal sinyalleri alamadıkları için ölürler (Abbas 2015).

## **2.2. Otoimmünite**

Bağığıklık sisteminin en önemli özelliklerinden biri normal đartlar altında öz ve öz olmayan molekülleri birbirinden rahatlıkla ayırabilmesidir. Bu đekilde kendi öz moleküllerine karđı herhangi bir tepki oluğturmaz (Ruacan 1999).

Bağığıklık sisteminin en temel görevi organizmayı enfeksiyonlardan korumak için yabancı olan ajanları tanıyıp yok etmesidir. Sistemin olgunlağması sırasında da organizmanın kendi dokularına reaksiyon veren hücreler ortamdan ayıklanır. Böylece hücreler organizmanın kendi hücrelerine toleranslı hale gelmiğ olur. Otoimmünite kendi hücrelerine tepki gösteren antikör ve bağığıklık sistemi hücrelerini kapsayan doğal bir fenomendir. Otoimmün hastalıkların geliğiminde genetik faktörler, çevresel faktörler ve enfeksiyon faktörü birlikte etkilidir (Smith ve Germolec 1999).



## 2.3. Otoimmunitiyi Etkileyen Faktörler

Otoimmün hastalıkların gelişimi, genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkisi ile olur. Birçok otoimmün hastalığın poligenik olduğu düşünülmektedir.

### 2.3.1. Genetik Faktörler

İnsan ve benzer soylu canlılar üzerine yapılan çalışmalarda MHC moleküllerinin otoimmün hastalıklara yatkın olmayla ilişkisi açıkça belirtilmiştir. Özellikle tek yumurta ikizleri üzerinde yapılan çalışmalarda, ikizlerden biri o hastalığı taşıyorsa, ikiz kardeşin diğerinin o hastalığı taşıma oranı toplum frekansında beklenenden daha fazladır (Abbas 2007). Birçok otoimmün hastalık sınıf I ve sınıf II HLA molekülü ile bağlantılıdır (Klein ve Sato 2000). Bu nedenle HLA allelleri otoimmün hastalıklara yatkınlığın tahmin edilmesinde kullanılan en önemli yapılarıdır (Alarcon- Riquelme ve ark. 2005). Lymphoproliferative sendromu ve otoimmün polyglandular (APECED) sendromu gibi bazı hastalıklar ise tek gen mutasyonundan kaynaklanmaktadır (Encinas ve Kuchroo 2000).

### 2.3.2. Çevresel Faktörler

Çevresel faktörlerin farklı sebepleri otoimmün hastalıkların gelişmesinde önemli bir role sahiptir (Alarcon-Riquelme ve Alarcon-Segovia 2005). Bireylerde hastalık tipleri ise ailesel eğilimlerle ortaya çıkmaktadır. Birçok enfeksiyon ajanı, kimyasallar, ilaç ve aşılar çevresel faktör sebepleridir (Schoenfeld ve Potter 2002).

- **Hormonlar:** Birçok otoimmün hastalık kadınlarda daha yaygın olarak görülmektedir. Bunun en önemli sebebi cinsiyet hormonlarının immün sistem hücreleri üzerine direkt etkisidir.
- **Toksik metallere maruz kalma:** Cıva, kadmiyum, kurşun, alüminyum ve nikel gibi ağır metallere maruz kalan bireylerde otoimmün hastalıkların görülme olasılığı yüksektir.

- **Kimyasal toksinler:** Endüstriyel kimyasallar, pestisitler, bazı ev temizleme ürünleri ve saç boyalarının kullanımının otoimmün hastalıklarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir.
- **Aşılama ve bağışıklama:** Yapılan son çalışmalarda Çarbon gibi bazı aşıların otoimmüniteyi tetiklediği gözlenmektedir.
- **Diyet:** Alzheimer, epilepsi, migren, fibromiyalji, kronik yorgunluk gibi hastalıkların Mg element eksikliğinden kaynaklanan hasarlardır.
- **Enfeksiyonlar:** Özgün olmayan poliklonal B hücre aktivasyonunu bağılatan Epstein-Barr virüsleri ya da bazı mikroorganizmaların antijenleri moleküler olarak birbirine benzediği için otoimmün aktivasyonu bağılatabilir. Bu olay Molecular Mimicry olarak adlandırılır. Genetik olarak duyarlı olan bireylere uygulanan enfeksiyon aracılığı ile de otoimmünite aktif hale getirilebilir. Romatoid artrit gibi hastalıklarda kollajen ile indüklenen hastalık modeli oluşturulabilmektedir. Adjuvant adı verilen ajan yardımıyla ise hastalık şiddetlendirilebilmektedir.
- **Sigara kullanımı:** Tütün ürünlerinin kullanımı en önemli çevresel faktörlerden biridir. Sigara kullanımı özellikle Sistemik Lupus Eritematozus (SLE) hastalığı ile ilişkilidir. Ayrıca sigara kullanan hastalarda Romatoid artrit prevalansı oldukça yüksektir. Sigara kullanımı özellikle HLA-DR alleli üzerine etki ederek bu risk faktörünü 21 kat arttırmaktadır. Bunun yanında doku hasarına, apoptozun artması, serbest radikal ve metalloproteinlerin salınımının artması ve lenfositlerin Fas ekspresyonunun artmasına neden olur. Sigara içmek ayrıca fibrinojen seviyesini arttırarak lökositozu indükler ve C-reaktif proteinini ile intraselüler adezyon molekülü I (ICAM-1) ve ELAM-1 seviyesini yükseltir (Shoenfeld ve ark. 2008).

## **2.4. Otoimmün Hastalıklar**

Hücrel ve humoral immün yanıt mekanizmaları otoimmün sistemin dengede tutulmasında önemli bir rol üstlenmektedir. T ve B hücrel tolerans mekanizmaları organizmanın kendine ait olan ile olmayanı ayırma yeteneğine sahiptir. Bu mekanizmalarda meydana gelen kusurlar otoimmün dengenin bozulmasına ve hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur.

İnsan genom analizleri sonucunda çoğu otoimmün hastalığın kalıtsal olduğu belirlenmiştir. Kromozomlardaki sitokin, sitokin reseptörleri ve immünregülatör moleküllerin gen bölgeleri bu analizler sonucu tanımlanmıştır (Becker ve ark. 1998).

Ayrıca sıçan, fare gibi organizmalar üzerine yapılan hayvan modelleme çalışmalarında Romatoid artrit ve sistemik lupus eritematosus hastalıklarıyla ilişkili genler tanımlanmıştır (Morel ve ark. 1999).

Otoimmün hastalıklara sebep olan immün yanıtlar çok farklı molekül, hücre ve dokuları barındırır. Hedef antijenlerin birçok dokuya ulaşması olasıdır. Bazı hastalıklar ise tek bir organ ya da dokuya özgüdür (Doan ve ark. 2013).

Bu nedenle otoimmün hastalıklar iki grup altında incelenmektedir.

### **2.4.1. Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar**

Bu tip otoimmün hastalıklar direkt organ ya da doku üzerine etki ederek hücre lizisine ve enflamasyona sebep olurlar (Çizelge 2.1.).

**Çizelge 2.1.** Organ spesifik otoimmün hastalıklar ve hedef organları

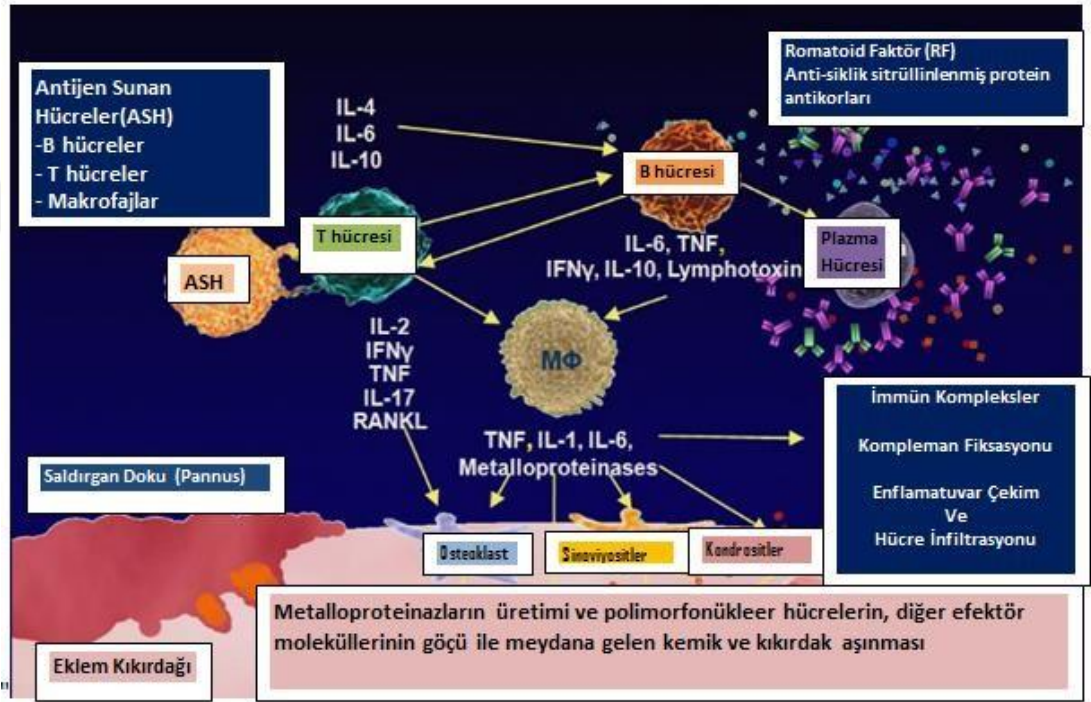
<b>Organ Spesifik Otoimmün Hastalıklar</b>	<b>Hedef Organ</b>
Otoimmün Hemolitik Anemi	Eritrosit
Adisson Hastalığı	Böbreküstü bezi
Goodpasture Sendromu	Böbrek, Akciğer
İnsüline Bağlı Diyabetes Mellitus	Pankreas
Myastenia Gravis	Kaslar
Otoimmün Ensefalomyelit	Santral Sinir Sistemi
Hashimo Tiroiti	Tiroid Bezi
Otoimmün Trombositopeni	Trombosit
Pernisiyöz Anemi	Eritrosit
Poststreptokokal Glomerülo nefrit	Böbrek
Graves Hastalığı	Tiroit

#### **2.4.2. Sistemik Otoimmün Hastalıklar**

Sistemik otoimmün hastalıklarda hedef antijenlere karşı oluşturulan yanıt, sadece doku ve organ düzeyinde kalmayıp, birden fazla organı etkileyebilir. Bu tür hastalıklarda hiperaktif T ve B hücrelerinin immün düzenlenmesinde genel bir kusur olduğu düşünülmektedir. Yaygın doku hasarı mevcut olup, otoantikorlar ya da immün kompleks hücrelerin tamamı hem hücre aracılı immün yanıtlara hem de direkt olarak hücre hasarına neden olabilir. Sistemik Lupus Eritematozus, Multiple Skleroz, Sjögren Sendromu, Skleroderma, Ankilozan Spondilit ve Romatoid Artrit otoimmün hastalıklara örnektir.

## 2.5. Model Otoimmün Hastalık Olarak Romatoid Artrit

Romatoid artrit, birçok eklemden sinoviyal dokuları hedef alan kronik enflamatuvar bir hastalıktır. RA sinoviyal dokusunda, fibroblast benzeri sinoviyositler, T ve B hücreleri, plazma hücreleri, dentritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri ve doğal öldürücü hücrelerden oluşur (Şekil 2.3.) (Tak ve Bresnahan 2000).



Şekil 2.3. Romatoid artrit sinoviyal doku hücreleri ([http://www.medscape.org/viewarticle/464118\\_3](http://www.medscape.org/viewarticle/464118_3)).

Romatoid artrit'in toplumda görülme oranı yaklaşık %1'dir. Birçok otoimmün hastalıkta olduğu gibi kadınlarda daha sık görülmektedir. Kadınlarda daha sık görülmesinde cinsiyet hormonları önemli rol oynamaktadır. Batı ülkelerde görülme sıklığı daha fazladır (Emery ve Salmon 1995). Görülme yaşı ortalama 25-50 arasında olup, her yaşta görülebilir. Bu hastalıkta eklem kapsüllerinde enflamasyon, sinoviyal hücrelerde ödem ve fibrozis görülür (Feldmann 1996). ilerleyen RA hastalarında eklem yerlerinde tahribat ve yeniden kaynaşma görülür. Ayrıca RA subkutanöz nodüller

lezyonlara ve akciğer, perikard, plevra ve sklerada enflamasyona sebep olabilir (Prete ve ark. 2011).

## **2.6. Triptofan Metabolizması ve İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO)**

İndolamin 2, 3-dioksijenaz (IDO) esansiyel bir aminoasit olan triptofanın ekstra hepatik dokularda yıkımına yol açan, kinürinin yolağının ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. IDO adaptif immün sistemde daha önce evrimsel olarak atasal genlerde kodlanmıştır ve bunun yanı sıra immün dengenin sağlanmasında da anahtar bir role sahiptir (Mellor ve Munn 2004).

IDO hücre içerisinde sürekli ya da indüklenebilir yolla plasenta, akciğer, kalın ve ince bağırsaklar, dalak, karaciğer, mide ve beyinde ifade edilir. IDO miyeloid bağlantılı hücrelerde (DCs, monositler, makrofajlar ve eozinofiller), epitelyal hücreler, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri ve de bazı tümör hücre hatlarında IFN- $\gamma$  aracılığı ile indüklenebilir (Grohmann 2003, Mellor ve Munn 2004, Takikawa 2004, Thomas ve Stocker 1999).

IDO ilk olarak maternal-fetal toleransa sağladığı katkı ile tanımlanmıştır (Munn 1998). IDO'nun insan reproduksiyonunda çok önemli bir role sahip olması IDO-bağımlı metabolik yolağın çok basit ve evrimsel olarak korunmuş bir immün tolerans mekanizmasının parçası olduğunu ortaya koymuştur. *IDO* geni eksik homozigot farelerde yapılan çalışmalar, merkezi ve homeostatik immün toleransta IDO'nun bir rolü olduğunu gösterir (Mellor 2003). Buna karşılık, yapılan çeşitli çalışmalar IDO'nun edinilmiş periferik toleransa da belirgin olarak katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (Gurtner 2003, Hayashi 2004, Kwidzinski 2005, Beutelspacher 2006).

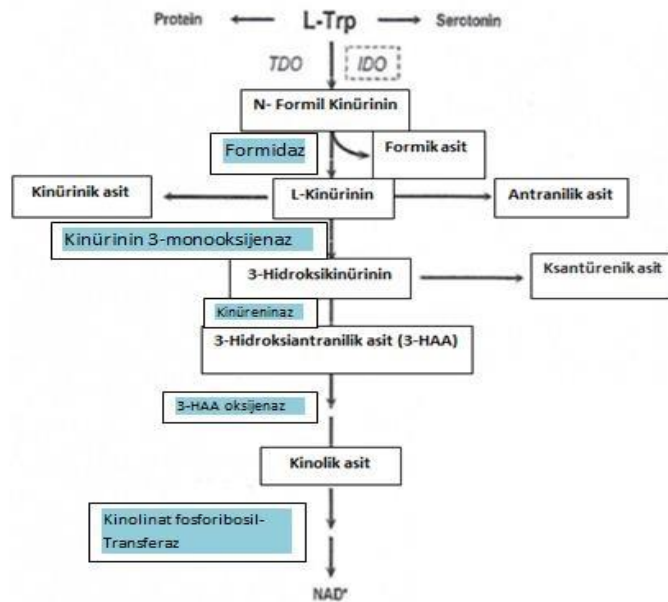
IDO, HEM proteini gibi prostetik grup tabanlı monomerik protein içerir. İnsan ve farede 8. Kromozom üzerinde 10 ekzona sahiptir ve üzerinde yaklaşık 15 kb'lık bölgesinden lokalize olup bu bölgeden kodlanır (Mellor ve Munn 2004).

İnsan İDO cDNA'sı 403 aminoasit kodlar ve yaklaşık 45 kDa'luk moleküler ağırlığa sahiptir (Sugimoto ve ark. 2006).

## 2.7. L-Triptofan'ın Kinürinin Metabolik Yolu

Triptofan aminoasit katabolizmasındaki ilk adım olan IDO, triptofanın kinürinine yıkımını sağlar (Şekil 2.4.). IDO'nun immün sistemin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu açıklayan iki temel düşünce bulunmaktadır (Moffett ve Namboodiri 2003). Bunlardan birincisi IDO tüketim teorisidir.

Dokuların mikro çevresinden ve kültür sıvılarından yapılan analizler sonucu triptofanın IDO yoluyla azaltılması T hücre proliferasyonunu azaltırken apoptoza sebep olmaktadır (Munn 1998 ve Mellor 2003). İkinci temel düşünce ise triptofan kullanım teorisidir. Kinürinin yolağı aracılığıyla sağlanan triptofan degradasyonu sonucunda açığa çıkan bazı metabolitlerin T hücre apoptozuna sebep olarak immün baskılanmanın sağlandığını ileri sürmüşlerdir (Fallarino 2002, Frumento 2002, Bauer 2005).



Şekil 2.4. Memelilerde L-Triptofan metabolizmasının Kinürinin yolağı (Grohmann 2003, Mellor ve Munn 2004, Thomas ve Stocker 1999).

## 2.8. Selektinler

Selektinler geniş bir veri alanına sahip memeli hücrelerinde bulunan reseptör aileleridir. Lökositlerin vasküler endotelial hücre adezyonuna yol açan, birbirleri arasında etkileşim içinde olan ve birbirinden bağımsız karbonhidrat bağlayıcı, nötrofil ekstravazyonuna sebep olan trombosit bağlayıcı moleküllerdir (Hallman 1991, Lawrence 1991, Luscinskas 1989, Watson 1991).

Selektin molekülleri hücre dışı kalsiyum bağlama yeteneğine sahip olup lektin bükümleri içeren tek zincirli glikoproteinlerdir (Abbas 2007). Selektinler, Lökosit adezyon molekülü (L-selektin), P-selektin (trombositler ve aktive endotelial hücre üzerinde gösterilen adezyon molekülü) ve Endotelial lökosit adezyon molekül-1 (E-selektin) (ELAM-1) olmak üzere üç farklı tiptedir.

### 2.8.1. L-Selektin (SELL)

L-selektin, hücre yüzey elamanı olan bu selektin, selektin ailesinin ‘‘homing’’ reseptörü olarak bilinir. Bu molekül çoklu domainlere sahiptir. Birinci domaini lektin homologudur, ikinci domaini epidermal büyüme faktörü taşır ve diğer iki domain ise C3 ve C4 bağlanma proteinlerini içerir (Entrezgene).

L-selektin lenfositlerin periferik lenfoid dokulara endotelial venüller aracılığıyla girmesini sağlayan bir homing reseptör gibi davranır. Mevcut endotelial hücreler üzerindeki ligandlar L-selektin eksprese eden lenfositlere bağlanarak, kanda lenfosit dolaşımını yavaşlatıp periferik bir lenfoid organa girişi kolaylaştırır (Robbins ve ark. 1998).

### 2.8.2. P-Selektin(SELP)

P-selektin, bir hücre adezyon molekülü olup, aktive edilmiş endotelial hücre yüzeylerinde bulunur (McEver 1989). P-selektin, makaryositler ve endotelial hücrelerde yapısal olarak eksprese edilir (Pan ve ark. 1998). P- selektin ekspresyonu iki farklı mekanizma ile aktive edilir. İlk mekanizmada P- selektin sentezi trombin gibi



agonistler ile granüllerden plazma zarına doğru hızlıca yer değiştirir (Hattori ve ark. 1989). İkinci mekanizma ise P-selektin'in mRNA ve protein seviyesini arttırmak için enflamasyona sebep olacak TNF- $\alpha$ , LPS ya da IL-4 gibi ajanlar ile uyarılmasıdır. P-selektin enflamasyon sırasında lökositlerin hasarlı bölgeye doğru toplanmasında önemli bir role sahiptir. Enflamasyon sırasında endotel hücreleri histamin ve trombin gibi moleküler tarafından aktive eder ve böylece P-selektin hücre içi bölgeden endotel hücre yüzeyine yönelir (Cleator ve ark. 2006).

### **2.8.3. Endotel Lökosit Adezyon Molekülü- 1 (ELAM-1)**

İmmün sistem hücrelerinin aktivasyonu, dolaşımı ve enflamatuvar bölgeye göçü ELAM-1, hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) gibi endotelde ifade edilen adezyon molekülleri ile sağlanır (McMurray 1996, Mojcik ve Shevach 1997).

Vasküler endotel, dolaşımdaki lökositlerin enflamasyon bölgelerine toplanması için sitokinler ve hücre yüzey reseptörleri arasında etkileşimi sağlayan bir ara yüz görevi görmektedir. Enflamatuvar hücre göçünün artmasına, endotel büyüme faktörlerinin sinoviyal dokudaki neovaskülarizasyonu uyarmasına da katkıda bulunur (Paeleolog 1996, Brenchley 2001).

ELAM-1 115 kDa'luk bir glikoprotein olup, TNF ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlere yanıt olarak erken dönemde ifade edilen bir adezyon molekülüdür (Pober 1986, Wellicome 1990). İnsan ELAM-1 molekülünün promotor bölgesi dört adet düzenleyici domaine sahiptir (Şekil 2.5.). Bunlardan ilki bir NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B bağlanma bölgesi (p50/p65 pozisyon -140 ile -137 arası), dördüncü domain ise NF- $\kappa$ B bağlanma bölgesi (p65/p50 pozisyon -129 ile -120 arası) (Whelan 1991, Hoof van Huijsduijnen 1993, Collins 1995). NF- $\kappa$ B sitokin ile indüklenen ELAM-1 transkripsiyonunu düzenlemek için gereklidir, fakat tek başına yeterli değildir (Whelan 1991). ELAM-1 promotor

bölgesinde yer alan diğer bağlanma bölgeleri de önem taşımaktadır (Hoof van Huijsdijnen 1993, Collins 1995).



**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 (Oral 1997).

## 2.9. Gen Tedavisi ve Gen Transfer Yöntemleri

Gen tedavisi ilk defa 1970'li yıllarda RNA retrovirüsleriyle çalışan Martine Cline tarafından ileri sürülmüştür (Baltimore 1970). 1980 yılında Cline retroviral tabanlı vektör kullanarak etkin gen transferi gerçekleştirmiştir (Watson 1981). 1982 yılında ise insanlarda ilk gen tedavi uygulaması talasemi hastalığı için yapılmıştır (Wade 1981).

Gen terapisi bazı hastalıkların ve bozuklukların engellenmesi veya tedavisi için eksik genlerin yerine konması, hatalı olarak veya fazla çalışın genlerin susturulması ve bazı genlerin işlevlerinin değiştirilmesi amacıyla genetik maddelerin hücrelere aktarılmasını kapsar (Haritha ve ark. 2012).

Genetik materyallerin hücre içerisine iki şekilde transferi mümkündür. Bunlardan ilki biyolojik yol olan hücreye replikasyon yapamayan rekombinant virüsler yoluyla ve ikincisi ise fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle genetik materyalin hücre içerisine aktarımıdır.

### **2.9.1. Biyolojik Yöntemler**

Biyolojik yöntem uygulamaları rekombinant virüs tabanlı vektörler kullanılarak gerçekleştirilir. Lenti virüs, adeno virüs, adeno-assosiyasyon virüs, herpes virüs ve retro virüsler yaygın şekilde kullanılan viral vektörlerdir. Bu virüslerin hastalık yapıcı özellikleri yok edilerek klonlanmak istenen tedavi edici rekombinant genler, belirli restriksiyon enzimlerinin yardımıyla istenilen bölgeye klonlanır. Viral vektörleri memeli hücrelerinde ekspresyon ettirmek için paketleyici hücre hatlarına transfer etmek gerekir. Paketleyici hücre hattında oluşturulan virüs kapsitleri tekrardan izole edilerek, istenilen hücre hattına nakledilebilir. Retroviral vektörlerde gen tedavisinde ise iki farklı vektör kullanılır. İlk vektör tedavi edici geni taşıırken diğer vektör ise retro virüsün üç temel gen bölgesini bulundurur (Clark ve Pazdernik 2012).

Viral vektörler aracılığıyla gerçekleştirilen gen tedavisinde ekspresyon seviyesi oldukça yüksektir. Fakat genomda geliği güzel bölgelere entegre olabileceği gibi işlevsel bölgelerde delesyona da sebep olabilir. Bu nedenle viral vektörlerle çalışmak oldukça zordur (Sheridan 2011).

## 2.9.2. Fiziksel ve Kimyasal Yöntemler

Gen tedavisinde çıplak gen parçasının doğrudan hücreye transfer edildiği yöntemlerdir. Bunlar; elektroporasyon, gen tabancası, lipozom ya da polimerler aracılığıyla gerçekleştirilir.

Elektroporasyon yönteminde yüksek elektrik akımına bırakılan hücrelerde, hücre zarlarında geçici porlar oluşturularak istenilen genetik materyalin geçişi sağlanır.

Gen tabancası aracılığıyla aktarımda ise, altın parçacıklarla örtülen DNA partiküllerine hız kazandırılarak gerçekleştirilir. Hücre zarını hızla delen DNA parçası sitoplazma içine girerek oradan çekirdeğe ulaşır (Patil ve ark. 2012).

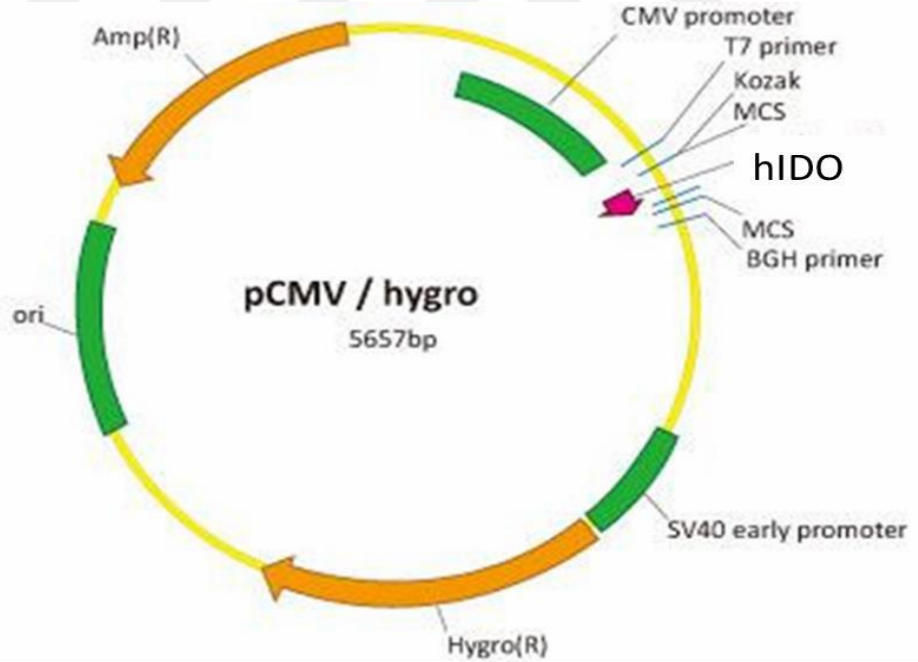
Lipozomlar, hücre zarının yapısını andıran fosfolipit yapılı, amfipatik ve veziküler özellik gösteren yapılardır (Duve ve ark. 1998). Yapılarında buldukları hidrofilik ve hidrofobik özelliklerden dolayı moleküllerin taşınmalarında önemli rol oynarlar. Lipozom yapıları ilk kez 1968 yılında Sessa Wiessman 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 (Bangham ve ark. 1965). Lipozomlar başta tıp, biyomühendislik, gıda ve kozmetik sanayide yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir.

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 düzenlenmesi gibi gen tedavi yöntemlerinde viral ajanların aksine oldukça güvenli, toksik olmayan ve hedefe yönelik aktarım gerçekleştiren yapılardır (Nicolau ve Cudd 1989).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

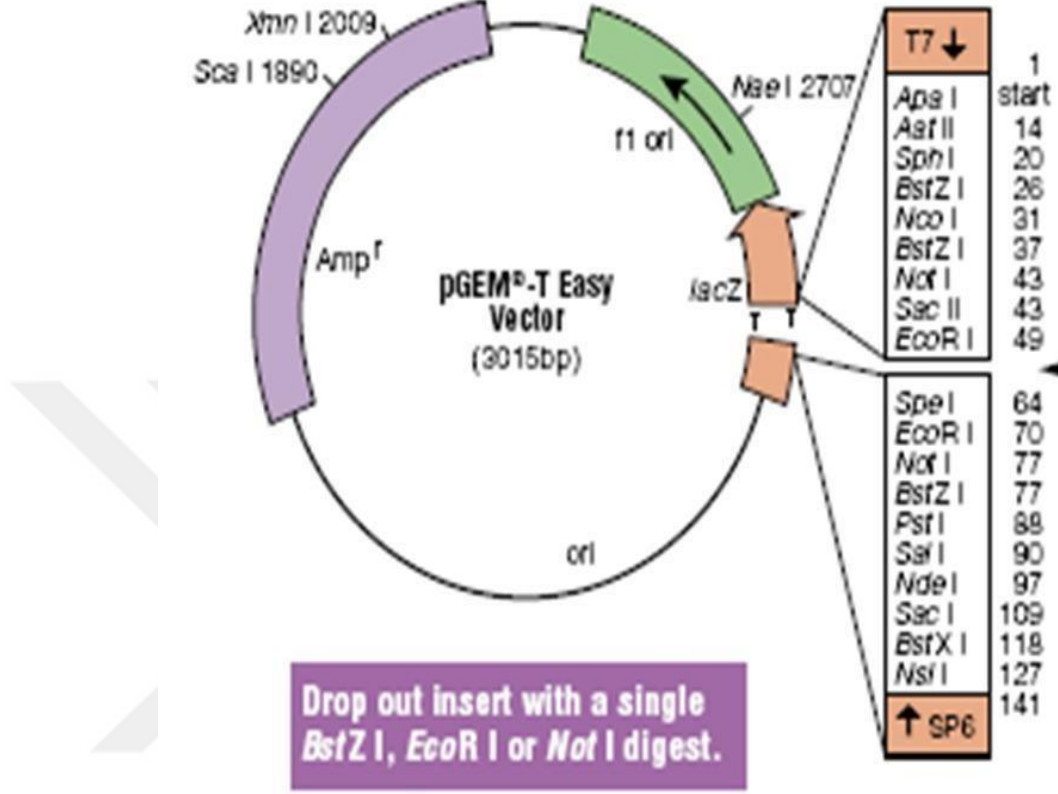
#### 3.1. İnsan IDO (*hIDO*) geninin ticari olarak elde edilerek ELAM-1 promotor downstream kısmına klonlanması

Ticari olarak *hIDO* geni pCMV/hygro vektörü içinde (Sino Biological) temin edilmiştir (şekil 3.1.). Bu vektörden CMV promotor bölgesi restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkartılmış ve 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 (şekil 3.2.) TA klonlaması ile 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 (şekil 3.3.).

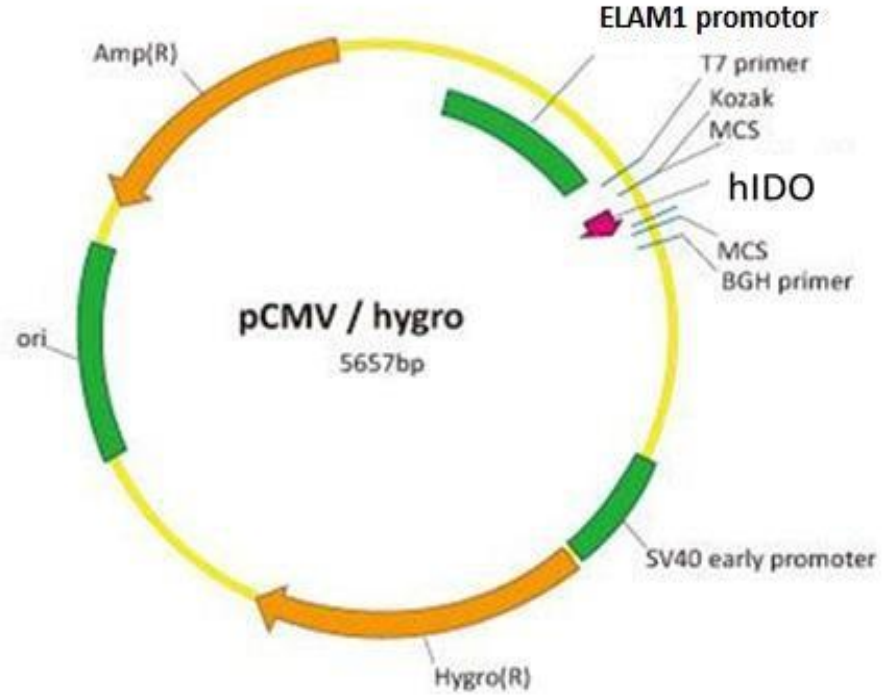


**Şekil 3.1.** pCMV/ hygro vektörü ve sekans referans noktaları (<http://www.sinobiological.com/BRCA1-cDNA-Clone-g-18849.html>).

*hIDO* geni Kozak sekansından hemen sonra bulunan MCS bölgesine klonlanmış olarak temin edilmiştir.



**şekil 3.2.** pGEM-T Easy vektörü ve sekans referans noktaları (<http://www.xenbase.org/reagents/vectorAction.do?method=displayVectorSummary&vectorId=8716564>).



**Şekil 3.3.** pELAM-1pro./hIDO vektörü ve sekans referans noktaları (<http://www.sinobiological.com/BRCA1-cDNA-Clone-g-18849.html>).

pCMV/hygro vektöründeki CMV promotoru yerine ELAM-1 promotoru klonlanmıştır.

### 3.1.1. ELAM-1 promotor bölgesinin çoğaltılması

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 1X Q5 Tampon çözeltisi (2 mM MgCl<sub>2</sub>, New England Biolabs), 200 µM dNTP Karışımı), 0.02 U/µL Q5 High Fidelity DNA polimeraz, 0,5 µM ileri primer (MLuI-F-Elam-1-5'ACGCGTATGCATGTAGACTATGGATGA 3'), 0.5 µM geri primer (SacI-R-Elam-1 5' GAGCTCTCTCTCAGGTGGGTATCAC 3') ve steril distile su son hacim 25 µL olacak şekilde karıştırılmıştır.

PZR döngü koşulları: 98 °C 30 saniye başlangıç denatürasyonu, 35 döngü; 98 °C'de 10 saniye, 61 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye yapıldıktan sonra en son 2 dakika 72 °C'de tutularak tamamlanmıştır. PCR ürünleri %1 agaroz jelde görüntülenmiştir.

### **3.1.2. ELAM-1 promotor bölgesi amplifikasyonunun 3' ucuna A takılması**

Kesilen bantlar jel temizleme kiti (OIAGEN) kullanılarak, üretici firmanın tavsiye ettiği Çekilde jelden ayrıldıktan sonra TA klonlanması için ELAM-1 promotor bölgesi amplifikasyonunun 3' ucuna A takılarak klonlama yapma üzere kullanılmıştır.

Kesilen jel parçası tartılarak, 3 birim tampon QG 1 birim jele eklenmiştir (100mg~100µL). Tüp 10 dk 50 °C'de inkübe edilmiştir (jel tamamen çözünene kadar). 1 birim izopropanol eklenerek karıştırılmıştır. DNA'nın bağlanması için, örnekler QIAquick kolonuna yüklenmiş ve 1 dk 13 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Akılgan kısım atılarak, QIAquick kolon tekrar aynı toplama tüplerinin içine yerleştirilmiştir. 0,5 mL tampon QG, QIAquick tampona eklenerek 1 dk 13 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkamak için, 0,75 mL tampon PE QIAquick kolona eklenmiş ve 13 000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Akılgan kısım atılarak, QIAquick kolon 1 dk daha 13 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. QIAquick kolon 1,5 mL'lik temiz mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve DNA'yı ayırtmak için 50 µL elüsyon tamponu (EB), QIAquickmembran'ın ortasına eklenerek 1 dk santrifüj yapılmıştır. 200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 4000 ng temizlenmiş ELAM-1 promotor bölgesi amplifikasyonunun, 1X PZR Tampon çözeltisi (75 mM Tris-HCl 25°C'de pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% (v/v) Tween20), 0.2 mM dATP Karışımı (New England Biolabs), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (New England Biolabs), 1 ünite *Taq* DNA polimeraz (New England Biolabs) steril distile su son hacim 20 µL olacak Çekilde karıştırılmıştır. 30 dakika 72 °C'de tutularak reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.3. pGEM-T Easy vektörüne bantların klonlanması**

Agaroz jelden izole edilen ve 3' ucuna A takılan bantlar pGEM-T Easy (Promega) vektörüne klonlanmıştır. 3,75 µL (750 ng) çözünmüş DNA, 12,5 ng pGEM-T Easy vektörü (Promega), 1X Ligaz Tampon çözeltisi (Promega) ve 100 ünite T4 DNA Ligaz



enzimi (Promega) son hacim 10 µL olacak şekilde PZR tüpüne konulmuştur. Karışım gece boyunca 4°C de (yaklaşık 18 saat) inkübe edilmiştir.

#### **3.1.4. *E. coli* kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması**

*E. coli* DH5-α kompetan hücrelerine (New England Biolabs) klonlanmış DNA parçası içeren pGEM-T Easy vektörü üreticinin tavsiye ettiği şekilde aktarılmıştır. Steril 2 mL tüpe 5 µL ligasyon ürünü ve 50 µL *E. coli* DH5-α kompetan hücre eklenmiştir. Karışım 30 dakika buzda bekletildikten sonra 42 °C 30 saniye ısı şoku uygulanmıştır. 5 dakika buzda bekletildikten sonra hücrelerin üzerine 300 µL LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C 'de 60 dakika boyunca çalkalanarak çoğaltılan hücreler LB agar (ampisilin ve IPTG içeren) besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C'de çoğalmaları sağlanmıştır. Transformasyon, hücrelerin ampisilin içeren (LB ampisilin 100 µg/mL) ortamda çoğaltılması ve X-Gal (80 µg/mL) kimyasalının substrat olarak kullanımı IPTG (100 µg/mL) ile aktive edilen β Galaktosidaz aktivitesi sebebiyle mavi kolonilerin oluşması ile kontrol edilmiştir. Beyaz koloniler seçilerek hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

#### **3.1.5. Plazmit izolasyonu**

Plazmitler QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edilmiştir.

2 mL bakteri kültürü alınıp 5 dk 15 000 rpm'de santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı dökülerek, tüp ters düz edilmiş ve fazlalık oluşturan maddeleri uzaklaştırmak için kağıt havlu ile kurutulmuştur. Tüpe tampon P1 (250 µL) eklenerek ve hücre peleti vorteks yapılarak tamamen akıcı hale getirilmiştir. Tampon P2 (250 µL) eklenerek ve tüp dört kere yavaşça ters düz edilerek karıştırılmış, yaklaşık 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklere N3 solüsyonu (350 µL) eklenerek, dört kez ters düz edilerek karıştırılmıştır. Örnek tüpler 10 dk 15 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Lizat temizlenerek üstteki faz dönme kolonuna transfer edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dk 15 000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.

Santrifüjden sonra, toplama tüpündeki alt faz atılarak toplama tüpü geri çıkartılmıştır. 750 µL Kolon Yıkama solüsyon tamponu PE dönme kolonuna eklenerek oda sıcaklığında 1 dk 15 000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. AkıŒkan kısım atılarak toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiş ve 1 dk daha santrifüj yapılarak kalan yıkama tamponu tamamen uzaklaştırılmıştır. Dönme kolonu içeriği 1,5 mL yeni steril bir tüpe aktarılmış, plazmit DNA'sı 50 µL tampon EB (Elüsyon tamponu) eklenerek ve 1 dk 15 000 rpm'de santrifüj yapılarak ayrıştırılmıştır. İzole edilen plazmit DNA'sı -20 °C'de saklanmıştır.

### **3.1.6. İzole edilen plazmitlerin görüntülenmesi**

DNA'nın plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir. 1 µg plazmit DNA'sı, 1X NEB 2.1 Tampon Çözeltisi (New England Biolabs), 10 Ünite *EcoRI* restriksiyon enzimi (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37 °C'de 1 saat bekletilmiş, 65 °C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapılmış ve örnekler %1 agaroz jelde yürütülmüştür.

### **3.1.7. ELAM-1 promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektöründen kesilerek çıkartılması**

pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış olan ELAM-1 promotor öncelikle restriksiyon enzimi içeren primerler kullanılarak çoğaltılıp, klonlandıkları için bu enzimler ile kesilerek pCMV/hIDO vektörüne aktarılmaları sağlanmıştır. pGEM-T Easy plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *MLuI* ve *SacI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir. 8 µg plazmit DNA'sı, 1X NE Tampon Çözeltisi 2.1 (New England Biolabs), 10 Ünite *MLuI* ve 10 Ünite *SacI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37 °C'de 1 saat bekletilmiş, 80 °C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapılmış ve örnekler %1 agaroz jelde yürütülmüştür.

### **3.1.8. CMV promotor bölgesinin pCMV/hIDO hygro vektöründen kesilerek çıkartılması**

Klonlama yapılması için aynı enzimler ile pCMV/hIDO hygro vektöründen CMV promotor bölgesi çıkartılmıştır. 8 µg plazmit DNA'sı, 1X NE Tampon Çözeltisi (New England Biolabs), 1 Ünite *MluI* ve 1 Ünite *SacI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37 °C'de 3 saat bekletilmiş, 80 °C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapılmış ve örnekler %1 agaroz jelde yürütülmüştür.

### **3.1.9. ELAM-1 promotor bölgesinin pCMV/hIDO hygro plazmitine klonlanması**

2 µL jelden temizlenmiş plazmit DNA'sı (pCMV/hIDO), 6 µL jelden temizlenmiş klonlanacak gen parçası (ELAM-1 promotor bölgesi), 1X NE Tampon Çözeltisi (MBI Fermentas), 100 Ünite DNA ligaz (MBI Fermentas), son hacim 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 4 °C'de gece boyunca bekletilmiş ve ertesi gün kompetan *E. coli* DH5-α (New England Biolabs) hücrelerine aktarılmıştır.

### **3.1.10. *E. coli* kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması**

*E. coli* DH5-α kompetan hücrelerine (New England Biolabs), klonlanmış ELAM-1 promotoru içeren pCMV/hIDO hygro vektörü aktarılmıştır. Steril 2 mL tüpe 5 µL ligasyon ürünü ve 50 µL *E. coli* DH5-α kompetan hücre eklenmiştir. Karışım 30 dakika buzda bekletildikten sonra 42 °C 30 saniye ısı şoku uygulanmıştır. Hücrelerin üzerine 300 µL LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C'de 60 dakika büyütülen hücreler 5 dakika buzda bekletildikten sonra LB agar (ampisilin) besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C'de büyümüştür. Transformasyon, hücrelerin ampisilin içeren (LB ampisilin 100 µg/mL) ortamda büyümesi ile kontrol edilmiştir. Çoğaltılan koloniler seçilerek hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

### 3.1.11. Plazmit izolasyonu

Plazmitler, bölüm 3.1.6'da anlatıldığı gibi QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edilmiştir.

### 3.1.12. İzole edilen plazmitlerin görüntülenmesi

DNA'nın plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *MLuI* ve *SacI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir. 10 µg plazmit DNA'sı, 1X NE Tampon Çözeltisi 2.1 (New England Biolabs), 10 Ünite *MLuI* ve 10 Ünite *SacI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37 °C'de 3 saat bekletilmiş, 80 °C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu yapılmış ve örnekler %1 agaroz jelde yürütülmüştür.

Kesim sonrasında beklenen boyda bant tespit edilen plazmitlerden 3 adedi 5' AGATCTCCCGATCCCCTATG3' ve 5'CTAGCCAGCTTGGGTCTCC3' primerleri kullanılarak ABI prism-310 Genetic Analyzer kullanılarak sekanslatılmıştır.

### 3.1.13. *E. coli* kompetan hücrelere ticari ve klonlanmış plazmitlerin aktarılması

*E. coli* DH5-*a* kompetan hücrelerine (New England Biolabs), bölüm 3.1.11 de anlatıldığı gibi klonlanmış DNA parçası içeren pELAM-1pro./hIDO vektörü, kontrol plazmitleri pCMV/βgal, pCAT/ELAM-1pro., pCAT/kontrol ve ticari olarak satın alınan pCMV/hIDO hygro vektörleri aktarılmıştır. İzole edilen plazmitlerin konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür.

Hücre kültürüne transferleri sağlanacak plazmitlere bol miktarda ihtiyaç duyulacağı için kompetan hücrelerin stoklanması sağlanmıştır. Stok hücre için 500 µL hücre üzerine 500 µL gliserol eklenerek pipetleme yapılmış ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı'nda bulunan -80 °C'deki dondurucuda saklanmıştır.

### 3.1.14. Hücre kültürüne aktarmak üzere Midi-Prep plazmitlerin hazırlanması

-80 °C'deki dondurucuda saklanan hücre stoklarından 150 mL LB ampisilin içeren *E. coli* besiyerine ekim yapılmıştır. Besiyeri çalkalamalı inkübatörde 200 rpm 37 °C sıcaklıkta 16 saat bekletilerek hücrelerin üremesi sağlanmıştır.

Üreyen hücrelerden izolasyon işlemi "HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN)" üretici firmasının tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

50 mL steril falkon tüp içerisinde hücrelerin çöktürme işlemi 3 kez tekrarlanarak 6000 g devirde 4 °C sıcaklıkta 15 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çöken hücre pelleti üzerine 6 mL P1 tampon eklenerek hücreler akıcı hale gelene kadar pipetleme yapılmıştır. 6 mL P2 tamponu eklenerek falkon tüp 5 kez ters düz edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Önceden soğutulmuş 6 mL P3 tamponu eklenerek 5 kez ters düz edilmiş ve mavi renkteki solüsyonun beyaz renge dönmesi sağlanmıştır. Falkon tüp içerisindeki tamponlar filtreli kartuş içerisinde dökülerek 10 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon esnasında diğer bir filtre olan "HiSpeed Tip" içerisinde 4 mL QBT tamponu eklenerek filtre ıslatılmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra çırınanın deklanşörü takılarak lizat "HiSpeed Tip" içerisinde filtre edilmiştir. Lizat filtreden tamamen geçtikten sonra 20 mL QC tamponu ile yıkanmıştır. Filtrede tutulan DNA 5 mL QF tamponu eklenerek 15 mL'lik falkon tüp içerisine alınmıştır. 3,5 mL izopropanol eklenerek karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon esnasında 20 mL'lik çırınanın ucuna "QIAprecipitator" takılmıştır. DNA örnekleri 20 mL çırına içerisine aktarılmış ve deklanşöre kuvvetli bir şekilde basılarak DNA örneklerinin "QIAprecipitator" içerisine geçişi sağlanmıştır. "QIAprecipitator" içerisindeki DNA, 2 mL %70'lik etanol ile yıkanmıştır. 5 mL'lik çırına ucuna takılan "QIAprecipitator" üzerine 1 mL EB (Elüsyon tamponu-endotoxin free) eklenerek filtre içerisindeki DNA steril ependorf tüp içerisine alınmıştır. Nanodrop spektrofotometre ile konsantrasyonları ölçülerek daha sonra uygun hücre hatlarına aktarılmak üzere - 20 °C dondurucuda saklanmıştır.

## **3.2. Hücre Kültürü**

### **3.2.1. Hücre materyali**

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

### **3.2.2. Donmuş hücrelerden kültür yapılması**

ATCC'den soğuk zincirle temin edilen dondurulmuş hücreler, hücre kültürü laboratuvarına getirilmiştir. Hücre süspansiyonunun uygun Ėekilde 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 çözölen hücre süspansiyonu eklenip birkaç kez yavağça 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<sup>2</sup>'lik steril (Orange scientific) flask içerisine alınmıştır. Hücreler 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilerek çoğalmaları sağlanmıştır.

### **3.2.3. Hücrelerin pasajlanması**

25 cm<sup>2</sup> 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 Trypsin-EDTA (1X) eklenmiş ve 5 dakika 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

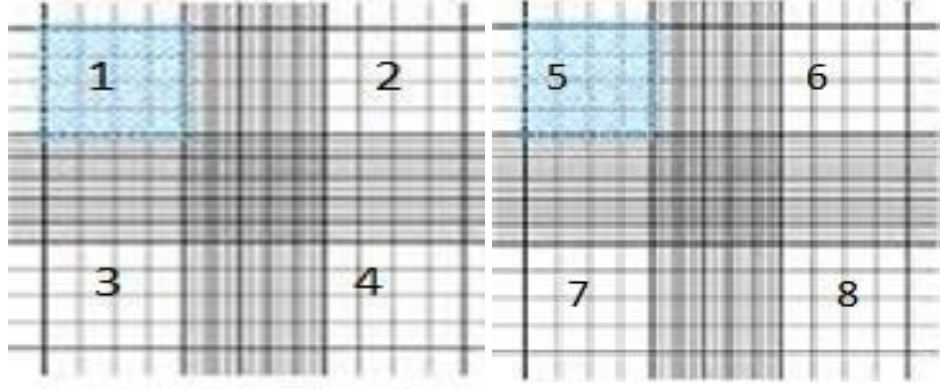
Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden söküldüğu gözlenerek biyogüvenlik kabini içerisine alınan hücrelerin üzerine 10 mL RPMI 1640 (%10 Fetal sığır serumu, %1 L-

glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) (Lonza) besiyeri eklenerek pipetle birkaç kez karıştırılıp 75 cm<sup>2</sup> flask içerisine aktarılıp 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde çoğalmaları sağlanmıştır.

#### **3.2.4. Hücrelerin sayılması**

Çiinde bulunan hücrelerin sayısını tespit etmek istediğimiz flask biyogüvenlik kabinine alındıktan sonra kapağı açılıp vakum makinesiyle içindeki RPMI 1640 (%10 Fetal Bovine Serum, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin) besiyeri flasktan uzaklaştırılmıştır. Flasktaki hücreler 10 mL HBSS (Lonza) ile 2 kere yıkanmıştır. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla 2 mL (%0,25 Trypsin-EDTA) (1X) eklenmiş ve 37 °C %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 5 dk bekletilmiştir. Etüvden çıkarılmış hücre kültürü ışık mikroskopunda incelendikten ve hücrelerin yüzeyden kalktığı saptandıktan sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla 10 mL RPMI 1640 (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) 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 mavisini (Sigma Aldrich) çözeltisinden ve 20 µL hücre süspansiyonundan alınarak pipetleme yapılmış ve 2 dakika ve 37 °C %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

Hemositometrenin olukları arasına 10 µL alttan ve 10 µL üstten olmak üzere karışım pipetlenmiştir. Işık mikroskopunda görülen küçük karelerin etrafındaki büyük kareler sayılmış ve aritmetik ortalaması alınarak 2X100000 ile çarpılarak 1 mL'deki toplam hücre sayısı bulunmuştur (gekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Hemositometrede sayım alanı

### **3.3. HeLa hücre hattına pCMV/ $\beta$ gal plazmitinin transfer edilmesi**

HeLa hücreleri transfeksiyon yeteneklerinin yüksek olması ve IL-1 $\beta$  ile uyarılabilmeleri sebebiyle tercih edilmiştir.

Bu çalışmada dört farklı marka ticari lipozom kullanılmıştır. Kontrol plazmiti olarak kullanılan pCMV/ $\beta$ gal ile hücrelere 6, 24 ve 48 saatlik transfeksiyonlar firmaların önerdiği şekilde yapılmış olup ardından X-gal boyama ile hücrelerin transfeksiyon yetenekleri belirlenmiştir.

Transfeksiyondan bir gün önce HeLa (İnsan Servikal Kanseri) hücrelerinin flask içerisindeki yoğunluklarına bakılmış ve %80 üzeri yoğunluktaki hücreler tripsinle muamele edilip falkon tüp içerisine alınmıştır. Bunu takiben tripan mavisi ile hemositometride sayımları yapılmıştır. Transfeksiyon etkinliğini ve toksisitesini değerlendirme deneyleri için, transfeksiyon uygulamasından bir gece önce 24 kuyucuklu kültür plaklarına  $6 \times 10^4$  hücre/kuyu yoğunluğunda hücreler kültüre edilmiş ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde bekletilmiştir.

Etüv içerisinde bir gece bekletilen hücrelerin mikroskop altında durumlarına bakılmış ve sağlıklı oldukları tespit edilerek biyogüvenlik kabini içerisine alınmıştır. Hücre üzerindeki eski besiyeri aspire edilip, her kuyucuğa 500  $\mu$ L taze RPMI 1640 (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) besiyeri eklenmiştir.



Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA), XtremeGENE 9 (Roche, USA), FuGENE-HD (Promega, USA), Attractene (QIAGEN, Germany) marka lipozomlar üretici firmaların tavsiye ettiği şekilde kullanılmıştır. Her lipozom markası için bir adet 24 kuyucuklu plak kullanılmış ve her plak 6, 24 ve 48 saatlik inkübe edilen kuyucuklar ve bir de kontrol kuyucuğu olmak üzere toplamda 4 kuyucuk kullanılmıştır (şekil 3.5.).

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)	Kontrol	6 saat	24 saat	48 saat
FuGENE HD	Kontrol	6 saat	24 saat	48 saat
XtremeGENE 9 (Roche)	Kontrol	6 saat	24 saat	48 saat
Attractene (Qiagen)	Kontrol	6 saat	24 saat	48 saat

**Şekil 3.5.** 24 kuyulu plak üzerinde pCMV/βgal transfeksiyon düzeni

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) markalı lipozom için kuyucuk başına 0,8 µg pCMV/βgal plazmiti için 1,5 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılmıştır. pCMV/βgal plazmit (101ng/µL) konsantrasyonumuza göre hesaplanan 0,8 µg DNA için kuyucuk başına 8 µL olarak belirlenmiştir. 4 kuyu için 32 µL plazmit DNA'sı ve 168 µL OptiMEM (1X) (Gibco) besiyeri steril bir bju tüp içerisinde karıştırılıp pipetleme yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 6 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) ve 194 µL OptiMEM besiyeri (1X) (Gibco) ayrı steril bir bju tüp içerisinde karıştırılıp, pipetleme yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İki tüp içerisindeki DNA, lipozom ve OptiMEM (1X) besiyeri tek bir tüpte karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek 500 µL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) eklenmiş hücrelere kontrol kuyucuğu hariç 100'er µL olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler 6, 24 ve 48 saat olacak şekilde 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

XtremeGENE 9 (Roche) markalı lipozom için kuyucuk bağına 1 µg DNA için 3 µL XtremeGENE 9 lipozom kullanılmıştır. 30 µL pCMV/βgal plazmiti ve 9 µL XtremeGENE 9 lipozom 261 µL OptiMEM (1X) (Gibco) besiyeri steril bir biju tüp içerisinde karıştırılıp 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 500 µL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) besiyeri eklenmiş hücrelere kontrol kuyucuğu hariç, 100'er µL olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler 6, 24 ve 48 saat olacak şekilde 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

FuGENE HD (Promega) markalı lipozom için kuyucuk bağına 2 µg DNA için 5 µL FuGENE HD (Promega) lipozom kullanılmıştır. 30 µL pCMV/βgal plazmiti, 15 µL FuGENE HD (Promega) lipozom ve 255 µL OptiMEM (1X) (Gibco) besiyeri steril bir biju tüp içerisinde pipetlenerek karışması sağlanmış ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. 500 µL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) besiyeri eklenmiş hücrelere kontrol kuyucuğu hariç 100'er µL olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler 6, 24 ve 48 saat olacak şekilde 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

Attractene (QIAGEN) markalı lipozom için kuyucuk bağına 0,4 µg DNA için 1,5 µL Attractene (QIAGEN) lipozom kullanılmıştır. 12 µL pCMV/βgal plazmiti, 4,5 µL Attractene (QIAGEN) lipozom ve 163,5 µL OptiMEM (1X) (Gibco) besiyeri steril bir biju tüp içerisinde pipetlenerek oda sıcaklığında bekletilmiştir. 500 µL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) besiyeri eklenmiş hücrelere kontrol kuyucuğu hariç 60'ar µL olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler 6, 24 ve 48 saat olacak şekilde 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

### **3.3.1. HeLa hücrelerinin fikse edilmesi**

6 ve 24 saat sonra hücrelerin üzerine 500 µL taze RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve stresptomisin) besiyeri eklenmiş ve 48 saat

sonra ise tüm hücreler üzerindeki besiyeri, DNA ve lipozom solüsyonları aspire edilerek 2 kez 500 µL steril PBS (Euroimmun, Germany) ile yıkanmıştır.

Hücelere kuyucuk başına 500 µL fiksatif (%0,2 gluteraldehit + %0,2 formamid içeren PBS) eklenerek 10 dakika 4 °C bekletilmiştir. Fiksatif aspire edildikten sonra 500 µL PBS (Euroimmun) ile bir kez yıkanıp aspire edilmiştir.

### **3.3.2. HeLa hücrelerinin X-gal boyaması**

X-gal solüsyonu [5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 200 µg/mL X-gal içeren N-N-dimetilformamid (DMF), 1 M MgCl] olarak hazırlanmıştır.

Karışım 500 µL olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiş ve 5 saat 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda boyalar aspire edilip 1 kez 500 µL PBS ile yıkanmış ve kuyular inverted mikroskopta incelemek üzere 500 µL PBS içerisinde 4 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

### **3.4. ELAM-1 promotor aktivitesinin belirlenmesi**

#### **3.4.1. pCAT/ELAM-1pro., pCAT/kontrol ve pCMV/βgal plazmitlerinin hücre hatlarına transfer edilmesi**

ELAM-1 promotor aktivitesini belirlemek için pCAT/ELAM-1pro. plazmiti kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak pCAT/kontrol plazmiti ve negatif kontrol olarak uygunsuz bir plazmit olan pCMV/βgal kullanılmıştır. 6 kuyucuklu plaklara bir gece önceden kuyucuk başına 2,5x10<sup>5</sup> HeLa hücresi ekilmiştir. Transfeksiyon etkinliklerini değerlendirdiğimizde hem toksisite hem de transfeksiyon yüzdesi bakımından Lipofectamin 2000 (Invitrogen) markası ile devam edilmesi uygun bulunmuştur.

HeLa hücre hattına transfeksiyon için 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 4 µg plazmit DNA'sı ve 7,5 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) lipozom kullanılmıştır (şekil 3.6.).

6 ve 24 saat için iki ayrı plak hazırlanmıştır. Toplamda 9 kuyu için hazırlanan 36 µg pCAT/ELAM-1pro. plazmiti 4,5 mL OptiMEM (1x) (Gibco) ile tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 67,5 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) lipozom 4432,5 µL OptiMEM (1x) (Gibco) ile tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İki ayrı tüpteki karışımlar tek tüp içerisine alınıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 2 mL RPMI 1640(Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri içeren kuyucukların üzerine uygun şekilde 1'er mL olarak eklenmiştir.

3 kuyu olarak hesaplanan 12 µg pCAT/kontrol plazmiti 1,5 mL OptiMEM (1x) (Gibco) ile tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 22,5 µL µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) lipozom 1477,5 µL OptiMEM (1x) (Gibco) ile tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İki ayrı tüpteki karışımlar tek tüp içerisine alınıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 2 mL RPMI 1640(Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri içeren kuyucukların üzerine uygun şekilde 1'er mL olarak eklenmiştir.

3 kuyu olarak hesaplanan 12 µg pCMV/βgal plazmiti 1,5 mL OptiMEM (1x) (Gibco) ile tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 22,5 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) lipozom 1477,5 µL OptiMEM (1x) (Gibco) ile tamamlanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İki ayrı tüpteki karışımlar tek tüp içerisine alınıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 2 mL RPMI 1640(Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri içeren kuyucukların üzerine uygun şekilde 1'er mL olarak eklenmiştir. 24 saat transfeksiyon sonrasında hücre üzerindeki besiyeri, DNA ve lipozom örnekleri aspire edilip taze 2 mL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri eklenmiştir.

ELAM-1 promotorunu uyarmak için 2 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL 3 ayrı konsantrasyonda IL-1β uygulanmıştır. 6 saatlik inkübasyonun sonunda, 6 saatlik plak içerisindeki besiyeri aspire edilerek 2 mL taze RPMI 1640(Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri eklenerek 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda plaklar

biyogüvenlik kabini içerisine alınarak besiyerleri aspire edilmiş ve 2 kez steril PBS (Euroimmun) ile yıkanmıştır. Her kuyu hücre kazıyıcı ile 500'er µL PBS (Euroimmun) ile 2 kez kazınıp toplamda 1 mL olacak şekilde steril tüplere alınarak -80 °C dondurucuda saklanmıştır.

pCAT/ELAM-1pro. stimüle edilmemiş	pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 2 ng/mL	pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 5 ng/mL
pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 10 ng/mL	pCAT/kontrol	pCMV/βgal

**Şekil 3.6.** ELAM-1 promotor aktivite ölçüm planı

### **342 ELAM-1 promotor aktivasyonunun CAT ELISA yöntemi ile belirlenmesi**

HeLa hücrelerine transfer edilen plazmitlerdeki CAT (Kloramfenikol Asetil Transferaz)'in kantitatif olarak belirlenmesi için CAT ELISA (Enzim Bağlı İmmünsorbent Analizi) (Roche) kitiyle üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Steril ependorf içerisindeki hücrelerin çözünmesi sağlanarak 4 °C sıcaklıkta 250 g devirde 10 dakika döndürülen hücrelerin üst fazı atılır. Her tüpe 500 µL Liziz tamponu (1X) eklenerek 30 dakika bekletilmiştir.

Antikor kaplı kuyucuklara sırasıyla, başta kör örnek (blank) ve daha sonra konsantrasyonları sırasıyla 1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL, 0 olan testin standart kontrolleri ve daha sonra gen transferi yapılarak 6/24 saat IL-1β ile stimüle

edilmiş hücre lizatlarından 200 µL olacak şekilde kuyucuklara eklenmiş üzeri kaplama kağıdı ile sarılarak bir saat 37 °C etüv içerisinde bekletilmiştir.

Kuyucuk içerisindeki örnekler boşaltılarak (1X) Yıkama Tamponu, her kuyucuk için 250 µL olacak şekilde pipetlenmiş ve 30 saniye çalkamalı etüvde bekletilerek 5 kez yıkanmıştır. Kuyucuklar kurutulduktan sonra taze olarak hazırlanan Anti-CAT-DİG solüsyonundan her kuyucuğa 200 µL eklenerek 1 saat 37 °C etüvde bekletilmiştir.

Kuyu içerisindeki solüsyon uzaklaştırılarak (1X) Yıkama Tamponu, her kuyucuk için 250 µL olacak şekilde pipetlenmiş 30 saniye çalkamalı etüvde bekletilerek 5 kez yıkanmıştır. Kuyucuklar kurutulduktan sonra taze olarak hazırlanan Anti-DİG-POD solüsyonu her kuyucuğa 200 µL olacak şekilde eklenerek kaplama kağıdı ile sarılmış ve 1 saat 37 °C etüvde bekletilmiştir.

Kuyu içerisindeki solüsyon uzaklaştırılarak (1X) Yıkama Tamponu, her kuyucuk için 250 µL olacak şekilde 30 saniye çalkamalı etüvde bekletilerek 5 kez yıkanmıştır. Kurutma kağıdına vurularak iyice kurutulan kuyucukların üzerine 200 µL POD substrat eklenerek karanlık ortamda, oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometrenin 450-492 nm dalga boyu aralığında okutulularak, standart eğriye göre düzey tayini yapılmıştır.

### **35. HeLa hücrelerinin pCAT/ELAM-1pro. ve pCMV/hIDO plazmitleriyle eş transfeksiyonu**

İnsan IDO ekspresyonunu yapısal olarak sağlayan CMV promotor kontrolündeki plazmit ile pCAT/ELAM-1pro. plazmiti kullanılarak eş transfeksiyon yapılmıştır. Eş transfeksiyonun amacı, pCMV/hIDO plazmiti varlığında CAT ekspresyonunda herhangi bir değişim olup olmadığını araştırmak üzere yapılmıştır. Bu deneyde kontrol olarak pCMV/hIDO hygro plazmiti yerine pCMV/βgal plazmiti kullanılmıştır. Bir gün önceden 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına  $2 \times 10^5$  HeLa hücresi ekilmiştir (gekil 3.7.).

EĞ transfeksiyonda 2/3'e 1/3 oranında DNA transfeksiyonu yapılmıştır. pCAT/ELAM-1pro. ve pCMV/hIDO plazmitlerinin transfeksiyonu için Lipofectamine 2000 (Invitrogen) üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır. Her kuyucuk için 4 µg DNA ve 7,5 µL lipozom kullanılmıştır. 4 kuyu için hesaplanan plazmit konsantrasyonlarına göre pCAT/ELAM-1pro. plazmitinin 1/3'ü 19,2 µL ve pCMV/hIDO plazmitinin 2/3'ü 228 µL olarak alınmış ve 1600 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Aynı bir bju tüp içerisinde 1970 µL (1X) OptiMEM (Gibco) üzerine 30 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) eklenmiş ve 5 dk bekletilmiştir. Lipozom ve plazmit karışımları tek bir tüp içerisinde karıştırılarak 15 dk bekletilmiş ve 2 mL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) bulunan kuyucuk üzerine 1 mL olacak şekilde eklenerek 24 saat 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

Kontrol olarak pCMV/hIDO plazmiti yerine kullanılacak pCMV/βgal plazmiti için de ayrı bir bju tüp içerisinde 1/3 pCAT/ELAM-1pro. ve 2/3 oranında pCMV/βgal transfeksiyonu 4 kuyu için hesaplanmıştır. pCMV/βgal için 54,4 µL ve pCAT/ELAM-1pro. için 19,2 µL plazmitler steril bir bju tüp içersine alınmış 1927 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. Aynı bir bju tüp içerisinde 1970 µL (1X) OptiMEM (Gibco) üzerine 30 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) eklenmiş ve 5 dk bekletilmiştir. Lipozom ve plazmit karışımları tek bir tüp içerisinde karıştırılarak 15 dk bekletilmiş ve 2 mL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) bulunan kuyucuk üzerine 1 mL olacak şekilde eklenerek 24 saat 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

Farklı bir plak içerisinde iki ayrı kuyuda biri pCAT/kontrol ve diğeri pCMV/βgal plazmitleri ile transfeksiyon yapılmıştır. Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde kuyu başına 4 µg plazmit için 7,5 µL Lipofectamine 2000 (Invitrogen) lipozom kullanılmıştır. 2 kuyu için hesaplanan pCAT/kontrol plazmitinden 17 µL alınıp 983 µL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. 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 bekletilmiş ve 2 mL RPMI 1640(Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1

penisilin ve streptomisin) bulunan kuyucuk üzerine 1 mL olacak ekilde eklenerek 24 saat 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir. 2 kuyu için hesaplanan pCMV/βgal plazmitinden 40,4 μL alınıp 960 μL (1X) OptiMEM (Gibco) ile tamamlanarak 5 dk bekletilmiştir. 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 bekletilmiş ve 2 mL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) bulunan kuyucuk üzerine 1 mL olacak ekilde eklenerek 24 saat 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

24 saatlik transfeksiyon sonrasında kuyucuklardaki besiyeri aspire edilip her kuyucuğa taze 2 mL RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri eklenmiştir. IL-1β ile 2 ng/mL ve 5 ng/mL olacak ekilde farklı dozlarda stimüle edilmiştir. 24 saat 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir. Hücreler üzerindeki besiyerleri aspire edilip 2 kez PBS (Euroimmun) ile yıkanmıştır. Her kuyu ikişer kez 500 μL PBS (Euroimmun) eklenip kazıyıcı ile kazınarak hücreler steril ependorf tüplere alınmış ve daha sonra analiz edilmek üzere - 80 °C dondurucuda saklanmıştır.

pCMV/hIDO pCAT/ELAM-1pro. Stimüle edilmemiş	pCMV/ hIDO pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 2 ng/mL	pCMV/hIDO pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 5 ng/mL
pCMV/β gal pCAT/ELAM-1pro. Stimüle edilmemiş	pCMV/β gal pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 2 ng/mL	pCMV/βgal pCAT/ELAM-1pro. IL-1β 5 ng/mL
pCAT/kontrol	pCMV/βgal	

**şekil 3.7.** pCAT/ELAM-1-pro. ve pCMV/hIDO plazmitleriyle eğ transfeksiyon deney planı



### **36. Eş transfeksiyon sonrası CAT ekspresyonunun ELISA yöntemi ile analiz edilmesi**

Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

### **37. Klonlanan pELAM-1pro./hIDO plazminin HeLa hücrelerine transfer edilmesi**

Bir gece önceden 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde HeLa hücreleri ekilmiştir. Plazmit transferi Lipofectamine 2000 (Invitrogen) marka lipozom ile üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır (gekil 3.8.). 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 promotörü bulandıran 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. Aynı 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. Aynı 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 Çekilde eklenmiş ve 24 saat 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüde 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 IL-1 $\beta$  ile stimüle edilerek 24 saat 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüde bekletilmiştir.

pELAM-1pro./hIDO Stimüle edilmemiş	pELAM-1pro./hIDO IL-1 $\beta$ 2 ng/mL	pELAM-1pro./hIDO 5 ng/mL
pCMV/hIDO (pozitif kontrol)	pCMV/ $\beta$ gal (negatif kontrol)	HeLa Hücresi

**Şekil 3.8.** Hela hücrelerine aktarılabacak pELAM-1pro./hIDO plazmitinin transfeksiyon planı

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

### **3.7.1. 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. (USA) markalı kit üretici firmanın tavsiye ettiği Çekilde kullanılmıştır. -80 °C'de saklanan

hücre örnekleri 3 kez 1'er saat arayla -20 °C'de dondurulup çözülerek hücre içeriklerinin PBS (Euroimmun)'e geçmesi sağlanmıştır. Örnekler +4 °C 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 konsantrasyonda standart dilüsyonları hazırlanmıştır.

Standart solüsyonunun ilk konsantrasyonu 40 ng/mL'dir. Standart solüsyon oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve ardından ilk pipetlenecek olan konsantrasyona 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 °C'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 °C'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 °C'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. 37 °C'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 okutulmuştur.

### **3.7.2. pELAM-1pro./hIDO plazmiti ile transfekte edilen HeLa hücrelerinden RNA izole edilmesi**

HeLa hücrelerine bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi, pELAM-1pro., pCMV/hIDO ve pCMV/ $\beta$ gal plazmitleriyle transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu Ez-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit (Bio Basic Inc., USA) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde uygulanmıştır.

1,5 mL’lik steril ependorf tüplerde PBS (Euroimmun) içerisinde bulunan hücreler +4 °C soğutmalı santrifüjde 12 000 rpm’de 5 dk döndürülerek çöktürülmüştür. Üst faz olan PBS (Euroimmun) uzaklaştırılıp çöken hücre pelleti üzerine 350  $\mu$ L RLT tamponu eklenmiş ve iyice pipetleme yapılmıştır. 5 kez insülin enjektörü yardımıyla hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. RLT tamponu ile eşit miktarda (350  $\mu$ L) %70’lik etil alkol eklenerek karışım pipetlenmiş ve kolonlu tüplere aktarılmıştır. Kolonlu tüpler 8 000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek alt faz uzaklaştırılmıştır. Kolona 500  $\mu$ L RW tamponu eklenerek 8 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek alt faz uzaklaştırılmıştır. Kolonlu tüplere 500  $\mu$ L RPE tamponu (%70 etil alkol) eklenmiş ve 8 000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılarak alt faz uzaklaştırılmıştır. Etil alkolü tamamen uzaklaştırmak için 8 000 rpm’de boş olarak döndürülen tüplerin alt kısımları atılarak kolonlar 1,5 mL’lik steril ependorf tüplere yerleştirilmiştir. Kolon içerisine 30  $\mu$ L DEPC-Water eklenmiş 50 °C’lik ısı bloğunda 2 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonlar 10 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek RNA örnekleri kolondan saflaştırılmıştır.

#### **3.7.2.1. RNA kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi**

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) spektrofotometre ile 1  $\mu$ L örnek kullanılarak ölçülmüştür. RNA’nın kalitesi: 230/260 ve 260/280 oranı ~1,6- 2,00 olan RNA örnekleri qRT-PZR için kullanılmıştır. RNA örnekleri -80 °C’de saklanmıştır.

### 3.7.2.2. RNA'dan cDNA sentezi

RNA izolasyonları tamamlandıktan sonra cDNA sentezi iğlemine geçilmiştir. Bu iğlemin sağlıklı yapılabilmesi içinde, olası DNA ve protein kalıntıları RNA örneklerinden uzaklaştırılmıştır. Bunun için RNA örneklerinden 10 µg alınarak 10 ünite RNase içermeyen DNaseI ile 20 µL'lik reaksiyon hacminde toplanmış ve 37 °C'de 30 dk tutularak 65 °C'de 10 dk ek inkübasyon ile toplam RNA örnekleri DNA'dan arındırılmıştır. Daha sonra DNase muamelesi yapılmış olan RNA örnekleri 2,5 M LiCl ile -20 °C'de inkübe edilerek çöktürülmüş ve 4 °C'de, 15 000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak toplanmıştır. Çöken RNA %70'lik etil alkol ile yıkanarak daha önceden DEPC ile muamele edilmiş olan ddH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop ND-2000 spektrofotometre ile 1µL örnek kullanılarak ölçülmüştür.

cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermantas) ile üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

DNA'dan arındırılmış olan RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

200 µL'lik steril PZR tüpüne, 500 ng RNA örneği, 4 µL 5X Reaksiyon Tamponu, 1 µL Ribolock RNAaz, 2 µL 10 nM dNTP mix, 1 µL ReverAid M-M Ters Transkriptaz enzimi, 1 µL 10 pmol/µL oligo dT eklenmiş ve son hacim 20 µL olacak şekilde steril su ile tamamlanmıştır. Reaksiyon 42 °C de 1 saat ve sonlandırma reaksiyonu için 72 °C'de 5 dakika tutulmuştur. Tek zincir cDNA örnekleri -20 °C'de daha sonra qRT-PZR da kullanılmak üzere saklanmıştır.

### 3.7.2.3. HeLa hücrelerindeki *IDO* geninin transkript seviyelerinin eş zamanlı PZR ile analizi

Tek ilk iplik cDNA 1/20 oranda sulandırılarak son konsantrasyonları 50 ng/µL olacak şekilde ayarlanmıştır. HeLa hücrelerine transfekte edilen pELAM-1pro./hIDO geninin IL-1β ile farklı dozlarda uyarılması sonucu kontrol plazmit ile transfekte edilen

hücrelere göre transkript seviyelerinin belirlenebilmesi için kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) uygulanmıştır.

IDO geninin transkript seviyelerini belirlemek için İnsan IDO (hIDO-RT) ileri primeri 5'CAAAGGTCATGGAGATGCC 3' ve İnsan IDO (hIDO-RT) geri primeri 5'CCACCAATAGAGAGACCAGG 3' şeklinde tasarlanmıştır. qRT-PZR reaksiyonları üçer kez tekrarlı olarak yapılmıştır. RNA miktarını normalize edebilmek için iki referans gen kullanılmıştır. EĞ zamanlı PZR için kullanılan primerler: İnsan GAPDH ileri primeri 5' AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT 3', İnsan GAPDH geri primeri 5' CCCCACTTGATTTTGGAGGGA 3', İnsan β-actin ileri primeri 5'AGCCTCGCCTTTGCCGA 3', İnsan β-actin geri primeri 5' CTGGTGCCTGGGGCG 3'.

Normalizasyon için kullanılan bu iki transkriptin deneysel koşullar altında sürekli ifade edilmektedir (Diss 2008, Liu 2013, Thomas 2007). Her reaksiyon için 3,4 µL ddH<sub>2</sub>O, 5 µL cDNA (50 ng/ µL), 0,8 µL 10 pmol/µL ileri ve geri primer kullanılmıştır. 10 µL SYBR yeşil karışımı 2X (Roche-LightCycler) eklenmiştir. PZR döngü koşulları 95 °C'de 2 dk, 40 döngü; 95 °C'de 15 sn, 55 °C'de 15 sn ve 72 °C'de 15 saniyedir.

Erime eğrisi primerlerin dimer oluşturup oluşturmadığını görmek için analiz edilmiştir. Normalizasyon sonrası genlerin ekspresyonundaki farklılıklar Delta eĞik döngüsü (ΔCT -threshold cycle) değerlerine göre kat değişimi formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kat değişimi} = \frac{2^{\Delta C_p \text{ Referans gen (kontrol- örnek)}}}{2^{\Delta C_p \text{ İlgili gen (kontrol- örnek)}}$$

#### 3.7.2.4. HeLa hücrelerinde hIDO geninin saatli transkripsiyon ölçümleri

24 saatlik transkripsiyon analizinde IDO transkriptinin belirgin bir şekilde saptanmasından sonra genin hangi saat aralığında daha aktif olduğunu saptamak ve CMV promotor bölgesinin enflamasyon uyarımından etkilenip etkilenmediğini anlamak için HeLa hücre hatlarına bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi pELAM-1pro./hIDO, pCMV/hIDO ve pCMV/ $\beta$ gal plazmitleriyle transfeksiyon yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında, hücreler üzerindeki solüsyonlar aspire edilerek 2 mL taze RPMI 1640 (Lonza) (%10 Fetal sığır serumu, %1 L- glutamin, %1 penisilin ve streptomisin) besiyeri eklenmiştir. Besiyeri üzerine hücreleri uyarmak için IL-1 $\beta$ 'nın 2 ng/mL ve 5 ng/mL'lik iki farklı dozu kullanılmıştır. Hücre uyarmı süreleri ise uyarılmamış hücre, 1/2 saat, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 4 saat uyarmı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Toplamda 6 farklı plak kullanılmış olup her hücre örneğine 2 ayrı plak için transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon sonrasında hücre içeren plaklar 2 farklı doz kullanılarak uyarılmıştır.

Hücreler kontrollü şekilde toplanıp -80 °C'de RNA izolasyonu yapmak üzere saklanmıştır. Toplamda 36 farklı örnek için RNA izolasyonu yapılmıştır. Bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin bölüm 3.7.1'de anlatıldığı gibi konsantrasyonları belirlenmiştir. Örneklerden cDNA sentezi bölüm 3.7.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Sentezlenen tek zincir cDNA'lar gruplandırılarak bölüm 3.7.3'de anlatıldığı gibi eÇ zamanlı PZR(qRT-PZR) ile analiz edilmiştir.

#### 3.8. Western blot analizi

Western blot ya da immün blotlama, protein ekspresyonunu belirlemek amacıyla kullanılan tekniklerden biridir. Bu teknikte istenilen (hedef) proteinin varlığı, protein-protein hibridizasyonu ile belirlenir. Herhangi bir doku ya da hücreden protein analizi yapabilmek için öncelikle proteinleri doğru bir şekilde açığa çıkarılması gerekmektedir. Açığa çıkarılan proteinlerin SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) yardımıyla 3 boyutlu yapısını sağlayan S-S bağları kırılır ve proteinler SDS içeren Poliakrilamid jelde yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılırlar.

Jel içerisinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan bantlar elektrotransfer metodu ile nitroselüloz membrana aktarılır. Membrana aktırılan proteinlerden hedef proteine spesifik birinci antikor ve daha sonra birinci antikorun yapısına uygun ve enzim ilave edilmiş olan ikinci antikor ile muamele edilir.

Membrandaki spesifik proteini görüntülemek için ise antikora bağlı bulunan enzimin substratı ortama eklenerek hedef proteinin görüntülenmesi sağlanmıştır olur.

SDS-PAGE Western blot yönteminde iki farklı konsantrasyonda jel kullanılır. Bunlardan ilki olan toplayıcı jel hafif asidiktir (pH: 6,8) ve akrilamid konsantrasyonu düşüktür. İkinci jel ise ayırıcı jel olarak adlandırılır ve baziktir (pH: 8,8). Ayırıcı jelde Poliakrilamid oranı yüksek olup jel gözenekleri daha dardır. Bu nedenle de proteinlerin ağırlıklarına göre ayırımı daha kolay gerçekleştirilir.

SDS-PAGE metodu ile ayrılan proteinler öncelikli olarak ısı ile denatüre edilir. Bunun yanı sıra Sodyum Dodesil Sülfat anyonik bir deterjan olduğu için denatüre olan proteinlere bağlanıp onları negatif yükler ve böylece proteinler jelde katottan anoda doğru hareket ederler. Blotlama işleminden sonra görüntülemenin olabilmesi için kemiluminesans yönteminden faydalanılır.

HeLa hücreleri bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bunu takiben protein izolasyonu yapılmıştır.

### **3.8.1. Protein izolasyonu**

3 mL liziz tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) için 30 µL 200 mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 30µL 100mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 45 µL proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı.

Protein izolasyonunu gerçekleştirmek için 15 mL'lik falkonlara toplanan hücreler üzerine 5 mL soğuk PBS ekleyip +4 °C 1000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında



süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Önceden hazırlanan liziz tamponu falkonlardaki hücrelere 0,5 mL olacak şekilde eklenmiş ve pipetaj yapılarak hücreler 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. 30 dakika buz üzerinde bekletilen hücreler 10 dakikada bir insülin enjektörü yardımıyla parçalanmıştır. 30 dakikanın ardından ependorf tüpler +4 °C 10 000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımlar yeni steril ependorf tüplere alınarak protein miktarları tayin edilmiştir.

### **3.8.2. Proteinlerin BCA yöntemi ile konsantrasyonlarının belirlenmesi**

#### **3.8.2.1. BSA standartlarının hazırlanması**

BSA ile protein miktarlarını tayin edebilmek için sığır serum albümin (BSA) proteinin farklı konsantrasyonları ultrasaf ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizilmiştir. (Bicinchoninic Acid Kit ,Sigma, St. Louis, MO; Bovine Serum Albumin Standardı, Amresco, Solon, OH, USA). Konsantrasyonlar sırasıyla 0,2- 0,4- 0,6- 0,8- 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

#### **3.8.2.2. BCA ölçümü**

BCA (Biçinkoninik asit) protein miktar tayininde kullanılan BCA çözeltisine bakır sülfat eklendiğinde tepkime sonucunda yeşil bir renk oluşmaktadır. Bu çözelti üzerine protein eklediğinde ise, peptit bağları ile etkileşimi sonucu oluşan tepkimede Cu<sup>++</sup> iyonları Cu<sup>+</sup> iyonlarına dönüşmektedir. Tepkime sonucunda yeşil renk mor renge dönüşmektedir.

Ölçüm için gerekli olan BCA (Biçinkoninik Asit) kiti (Thermo Scientific) ve 96 kuyucuklu plak ( Orange Scientific) tarafından sağlanmıştır. Öncelikli olarak kuyulara sırasıyla 0, 20, 40, 60, 80 ve 100'er mL standart solüsyon eklenmiştir.

Konsantrasyonları bilinmeyen protein örnekleri ise ölçümlerdeki hataları önlemek için ddH<sub>2</sub>O ile 10 kat seyreltilmiştir. Sırasıyla önce standartlar ve daha sonra protein örnekleri 10 µL olacak şekilde kuyulara pipetlenmiş ve ardından 200 µL çalışma

solüsyonu (Working Reagent) örneklerin üzerine eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır. Süre bitiminin ardından oluşan değişim spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 562 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

## **Çözeltiler**

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, Invitrogen, CA, USA): 30mL Running buffer, 570 mL ultra saf H<sub>2</sub>O ile tamamlanarak hazırlanmıştır

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

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, Invitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Antioksidant (Invitrogen, CA, USA)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA)

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

10X pH: 7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base 24,23 g (Scharlau, Barcelona, Spain) NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) 80,06 g ve 5 mL Tween20 (Dako, CA, USA) 1L ultrasaf H<sub>2</sub>O eklenerek çözülmüştür.

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK)

Phototope<sup>®</sup>-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, MA, USA)

### **3.8.3. Proteinlerin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi**

Örnekler daha önce BCA yöntemiyle belirlenen total protein konsantrasyonuna göre 35 µg olacak şekilde sabitlenmiştir. Sample Buffer ve Reducing agent 1X olacak şekilde 0,5 mL'lik tüplere pipetlenmiştir. Tüpler 95 °C'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) 5 µL ve örnekler hesaplanan miktardaki hacimlerde dikkatli bir şekilde kuyulara

yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra protein degradasyonunu önlemek için tank +4 °C'de 150V'de 60 dakika yürütülmüştür.

#### **3.8.4. Proteinlerin membrana transfer edilmesi**

Transfer işleminde I-Blot jel transfer cihazı (Invitrogen, CA, USA) kullanılmıştır. Anot (+) bakır en üste gelecek şekilde, jel, ddH<sub>2</sub>O 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.

#### **3.8.5. GAPDH proteinlerinin belirlenmesi**

##### **3.8.5.1. Membran bloklama**

GAPDH için öncelikli olarak %5'lik süt (Cell Signaling) çözeltisi hazırlanarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edilmiştir. Bir saatin sonunda membran TBS-T ile 3'er kez 5 dakika yıkanmıştır

##### **3.8.5.2. Birincil antikor**

GAPDH antikor (Cell signalling) 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA çözeltisinde hazırlanmıştır. +4 °C'de 18 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiş ve süre sonunda TBS-T ile 3'er kez 5 dakika yıkanmıştır.

##### **3.8.5.3. İkincil antikor**

GAPDH için Anti-Rabbit (Cell signalling) 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.

#### **3.8.5.4. Görüntüleme**

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

#### **3.8.6. IDO (İndolamin 2,3 dioksijenaz) proteininin belirlenmesi**

##### **3.8.6.1. GAPDH birincil ve ikincil antikorların membrandan uzaklaştırılması**

Birincil ve ikinci antikorları membrandan uzaklaştırmak için Stripping Tamponu (Cell Signaling, USA) üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde kullanılmıştır.

TBS-T ile yıkanan membranın üstünü kaplayacak şekilde stripping tamponu eklenir, alüminyum folyo ile üzeri kapatılarak 50 °C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membran 6 kez 5'er dakika bekletilerek TBS-T ile yıkanmıştır.

##### **3.8.6.2. Bloklama**

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.

##### **3.8.6.3. Birincil antikor**

IDO antikoru (Cell Signaling, USA), 1:1000 oranında %5 BSA çözeltisi içerisinde hazırlanarak +4 °C'de 18 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır.

#### **3.8.6.4. İkincil antikor**

IDO için Anti-Rabbit (Cell Signaling,USA) 1:2000 oranında %5 BSA çözeltisinde hazırlanarak çalkalayıcıda 60 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır.

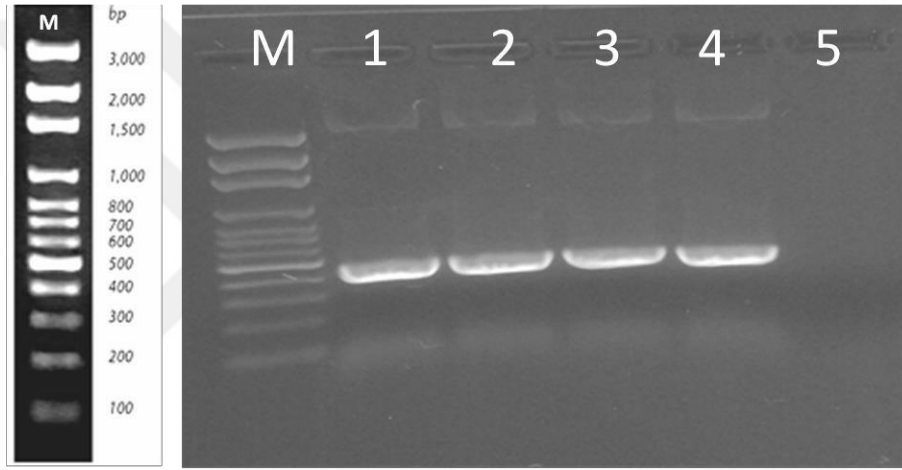
#### **3.8.6.5. Görüntüleme**

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

## 4. BULGULAR

### 4.1. PZR Reaksiyon Sonuçları

ELAM-1 promotor bölgesinin çoğaltılması için hazırlanmış olan primerler kullanılarak (Bölüm 3.2.) PZR gerçekleştirilmiş ve genler ticari olarak satın alınan plazmidten kısmi olarak çoğaltılmıştır. ELAM-1 promotor bölgesi için beklenen parça boyu 483 bp'dir. Çoğaltma sonuçları, etidyum bromür ile boyanmış %1'lik agaroz jelinde tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



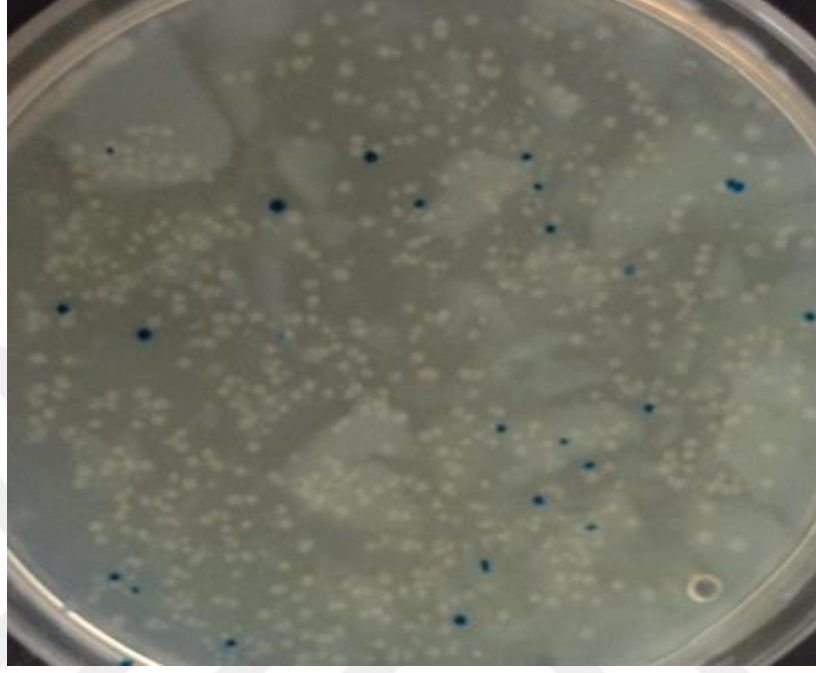
**Şekil 4.1.** ELAM-1 promotor amplifikasyonları %1 lik agaroz jel görüntüsü  
M: Moleküler ağırlık markörü (100bp marker, Axygen), 1-4 nolu kuyucuklar: ELAM-1 amplifikasyonları (483bp), 5 nolu kuyucuk: Negatif kontrol

Kesilen bantlar jel temizleme kiti (QIAGEN) kullanılarak jelden ayrıldıktan sonra TA klonlanması için ELAM-1 promotor bölgesi amplifikasyonunun 3' ucuna A takılarak klonlama yapmak üzere kullanılmıştır.

### 4.2. ELAM-1 promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektörüne klonlanması

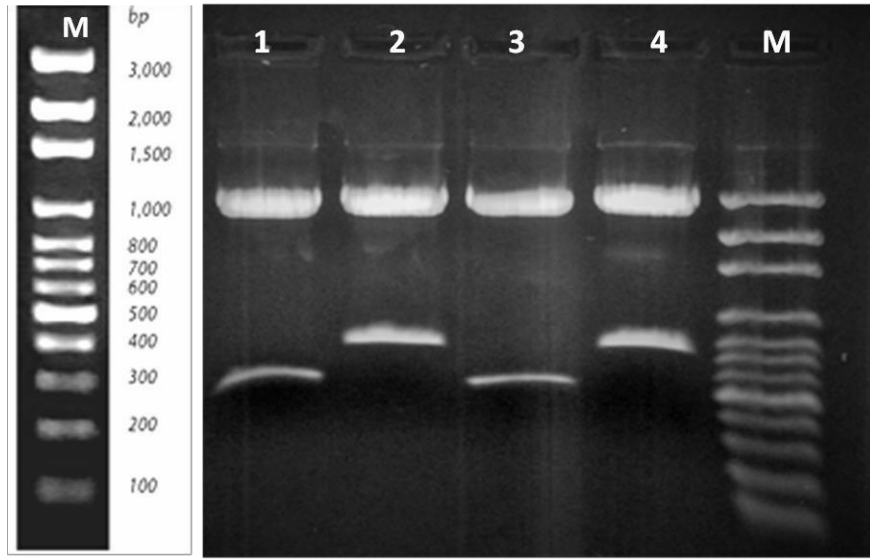
3' ucuna A takılan ELAM-1 promotor bölgesi pGEM-T Easy (Promega) vektörüne (Şekil 3.1.3) DNA ligaz kullanılarak klonlanmıştır. Klonlama sonrasında ligasyon ürünü kompetan *E. coli* hücrelerine aktarılarak, transforme olmuş hücreler ampisilin içeren

(LB ampisilin 50 µg/mL) ortamda büyütülerek ve rekombinant vektör ise β Galaktosidaz aktivitesi kullanılarak seçilmiştir. β Galaktosidaz aktivitesi göstermeyen beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu için kullanılmıştır (şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** LB ampisilin agar görüntüsü

Plazmitler QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılarak izole edildikten sonra ELAM-1 promotor bölgesinin plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *SacI* ve *MLuI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Beklenen boydaki bantlar (483 bp) %1'lik agaroz jelde tespit edilmiştir (şekil 4.3.).



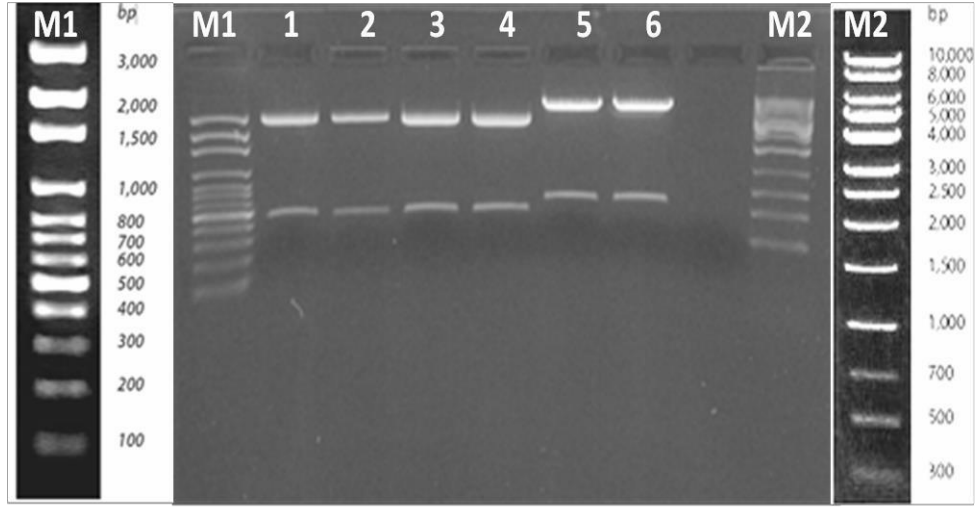
**Şekil 4.3.** ELAM-1 promotor *SacI* ve *MLuI* restriksiyon kesimi  
M: Moleküler ağırlık markörü (100bp marker, Axygen), 1 ve 3 nolu kuyucuklar ELAM-1 promotoru

1 ve 3 numaralı hücrelerden izole edilen plazmitlerdeki klonlanan parça boyları ELAM-1 promotor sekansının büyüklüğüne uygun olduğu için bu plazmitler kullanılarak klonlama işlemlerine devam edilmiştir.

#### **4.3. ELAM-1 promotor bölgesinin pGEM-T Easy vektöründen ve CMV promotor bölgesinin pCMV/hIDO vektöründen kesilerek çıkarılması**

pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış olan ELAM-1 promotor öncelikle *MLuI* ve *SacI* restriksiyon enzimi içeren primerler kullanılarak çoğaltılıp klonlandıkları için bu enzimler ile kesilerek pCMV/hIDO vektörüne aktarılmaları sağlanmıştır. Klonlama yapılması için aynı enzimler ile pCMV/hIDO vektöründen CMV promotor bölgesi çıkartılmıştır (Şekil 4.4.).





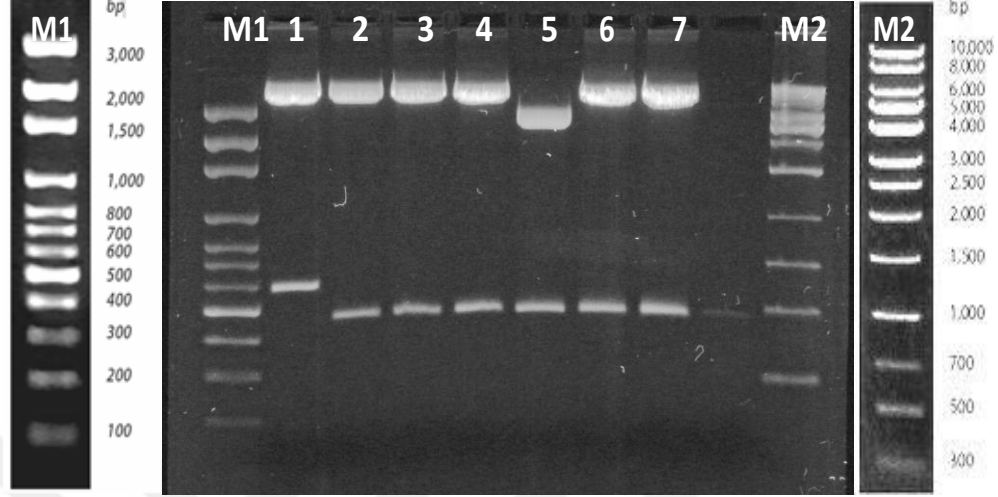
**Şekil 4.4.** pGEM-T Easy rekombinantlarının ve pCMV/hIDO vektörünün *MLuI* ve *SacI* enzimleri ile kesimi sonrasında 1% agaroz jelde görüntüsü  
M1: Moleküler ağırlık markörü (100bp DNA ladder, Axygen) 1 -4 nolu kuyucuklar: pGEM-T Easy/pELAM-1pro (483bç), 5-6 nolu kuyucuklar pCMV/hIDO (CMV promotor bölgesi 590bç), M2: Moleküler ağırlık markörü (1kb DNA ladder, Axygen).

Klonlanma için kullanılan pCMV/hIDO vektörünün restriksiyon haritası şekil 3.1'de gösterilmektedir. *MLuI* ve *SacI* enzimleri kullanılarak kesim sonucunda CMV sürekli ekspresyon promotoru (590bç) çıkartılarak yerine ELAM-1 promotor bölgesi (483 bç) klonlanmıştır. Bu şekilde *hIDO* geni ELAM-1 promotor aktivitesi altında seçici olarak eksprese olacak şekilde hazırlanmıştır.

#### 4.4. ELAM-1 promotor bölgesi ile pCMV/hIDO plazmitlerinin birleştirilmesi

Jelden temizlenmiş plazmit DNA'sı (pCMV/hIDO) ile jelden temizlenmiş klonlanacak gen (ELAM-1 promotor) bölgesi ligasyon ile birleştirilerek, *E. coli* DH5 $\alpha$  (New England Biolabs) kompetan hücrelerine aktarılmıştır. LB agar (ampisilin) besiyerine ekilerek gece boyunca 37 °C'de büyümüştür. Transformasyon, hücrelerin ampisilin içeren (LB ampisilin 100  $\mu$ g/mL) ortamda çoğaltılması ile kontrol edilmiştir. Çoğalan koloniler seçilerek hücrelerden QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. ELAM-1 promotor bölgesinin plazmit DNA'sına entegre

olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *MLuI* ve *SacI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir (şekil 4.5.).



**Şekil 4.5.** pCMV/hIDO ve pELAM-1pro./hIDO rekombinantlarının *MLuI* ve *SacI* kesimi sonrasında %1 agaroz jelde görüntüsü  
M1: Moleküler ağırlık markörü (100bç ladder, Axygen), 1 nolu kuyucuk: pCMV/hIDO plazmiti (590 bç CMV promotor bölgesi), 2-3-4-6-7 nolu kuyucuklar: pCMV/hIDO/ELAM-1 plazmitleri (ELAM-1 promotor bölgesi 483 bç), 5 nolu kuyucuk pGEMT-Easy/ ELAM-1 plazmiti (ELAM-1 promotor bölgesi 483 bç). M2: Moleküler ağırlık markörü (1 kb ladder, Axygen).

Kesim sonrasında beklenen boyda bant tespit edilen plazmitlerden 3 adedi 5' AGATCTCCCGATCCCCTATG3' ve 5'CTAGCCAGCTTGGGTCTCC3' primerleri kullanılarak ABI prism-310 Genetic Analyzer kullanılarak sekanslatılmıştır.

#### **4.5. ELAM-1 promotor bölgesinin nükleotid sekansı hizalamaları**

Sekansların doğruluğunun tespit etmek için Gen Bankası ELAM-1 promotor bölgesinin nükleotid sekansları kullanılarak NCBI Blast ile taranmıştır (şekil 4.6).

Sekanslama sonrasında elde edilen nükleotidlerin hizalanması ile klonlanan parçanın tamamen doğru sekansta (%100 aynı) olduğu NCBI/BLAST ile gösterilmiştir.

Download ▾ GenBank Graphics

Homo sapiens selectin E (endothelial adhesion molecule 1) (SELE) gene, complete cds  
Sequence ID: [gb|AF540378.1](#) Length: 14019 Number of Matches: 1

Range 1: 1144 to 1605 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
854 bits(462)	0.0	462/462(100%)	0/462(0%)	Plus/Plus
Query 209	GTAGACTATGGATGACAAACCTATTCTTGGTTTCCTTCTGTTTCTGAAATCTAATTACT			268
Sbjct 1144	GTAGACTATGGATGACAAACCTATTCTTGGTTTCCTTCTGTTTCTGAAATCTAATTACT			1203
Query 269	ACCACAACCTACATGAGAGACACTACTAACAAGCAAAGTTTTACAACTTTTTAAAGACATA			328
Sbjct 1204	ACCACAACCTACATGAGAGACACTACTAACAAGCAAAGTTTTACAACTTTTTAAAGACATA			1263
Query 329	GACITTTATGTTATTATAAATTAATAATCAATGCAATTTTGTGCATATTAATAAAATGCATAT			388
Sbjct 1264	GACITTTATGTTATTATAAATTAATAATCAATGCAATTTTGTGCATATTAATAAAATGCATAT			1323
Query 389	ACGATATAAAGGCATGGACAAAGGTGAAGTAGCTTCAAGAGACAGAGTTTCTGACATCAT			448
Sbjct 1324	ACGATATAAAGGCATGGACAAAGGTGAAGTAGCTTCAAGAGACAGAGTTTCTGACATCAT			1383
Query 449	TGTAATTTTAAAGCATCGTGGATATCCCGGAAAGTTTTGGATGCCAATGGGGATTTC			508
Sbjct 1384	TGTAATTTTAAAGCATCGTGGATATCCCGGAAAGTTTTGGATGCCAATGGGGATTTC			1443
Query 509	TCITTTACTGGATGTGGACAATATCCTCCTATTATTACAGGAAGCAATCCCTCCTATAAA			568
Sbjct 1444	TCITTTACTGGATGTGGACAATATCCTCCTATTATTACAGGAAGCAATCCCTCCTATAAA			1503
Query 569	AGGGCCTCAGCCGAAGTAGTGTTCAGCTGTCTTGGCTGACTTCACATCAAAACTCCTAT			628
Sbjct 1504	AGGGCCTCAGCCGAAGTAGTGTTCAGCTGTCTTGGCTGACTTCACATCAAAACTCCTAT			1563
Query 629	ACTGACCTGAGACAGAGGCAGCAGTGATACCCACCTGAGAGA 670			
Sbjct 1564	ACTGACCTGAGACAGAGGCAGCAGTGATACCCACCTGAGAGA 1605			

Download ▾ GenBank Graphics

Homo sapiens selectin E (SELE), RefSeqGene on chromosome 1  
Sequence ID: [ref|NG\\_012124.1](#) Length: 18440 Number of Matches: 1

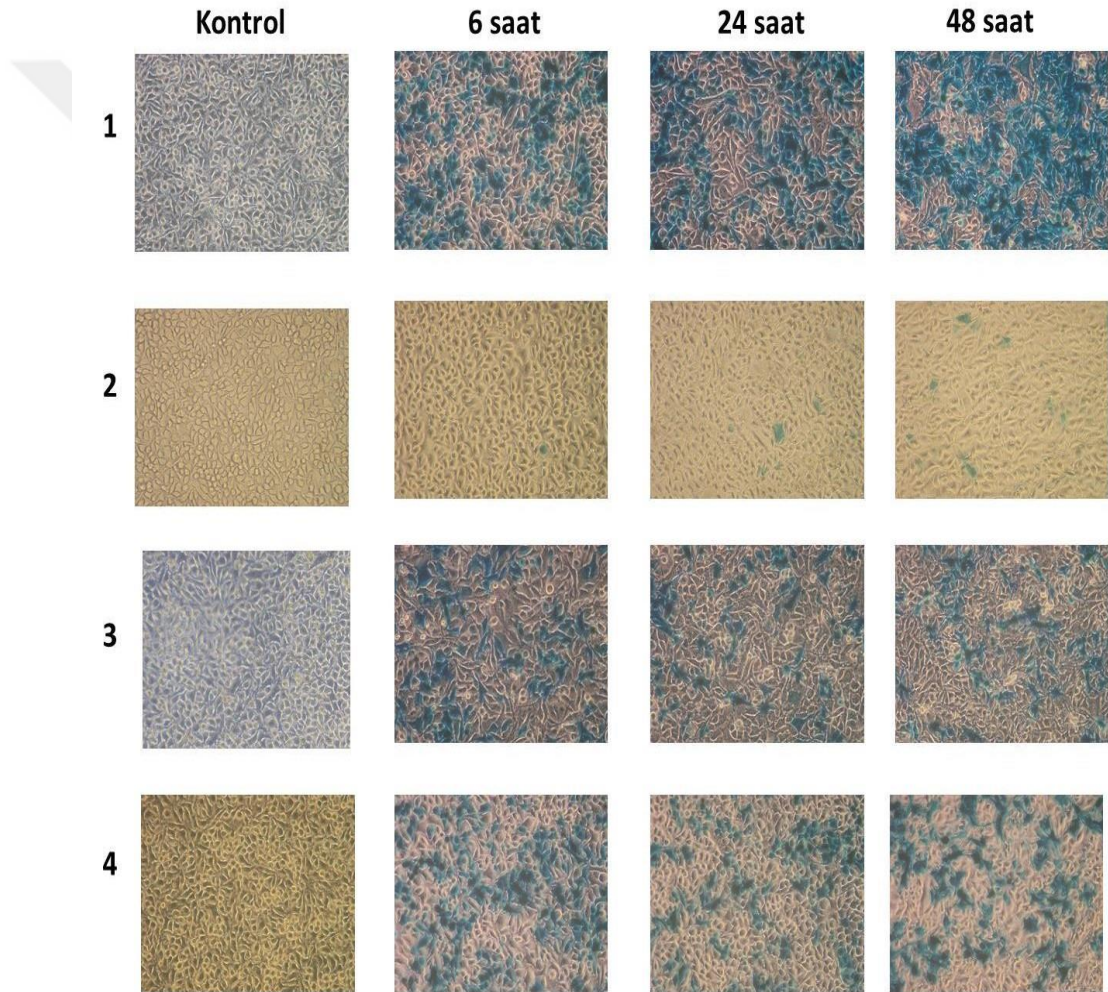
Range 1: 4617 to 5078 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
854 bits(462)	0.0	462/462(100%)	0/462(0%)	Plus/Plus
Query 209	GTAGACTATGGATGACAAACCTATTCTTGGTTTCCTTCTGTTTCTGAAATCTAATTACT			268
Sbjct 4617	GTAGACTATGGATGACAAACCTATTCTTGGTTTCCTTCTGTTTCTGAAATCTAATTACT			4676
Query 269	ACCACAACCTACATGAGAGACACTACTAACAAGCAAAGTTTTACAACTTTTTAAAGACATA			328
Sbjct 4677	ACCACAACCTACATGAGAGACACTACTAACAAGCAAAGTTTTACAACTTTTTAAAGACATA			4736
Query 329	GACITTTATGTTATTATAAATTAATAATCAATGCAATTTTGTGCATATTAATAAAATGCATAT			388
Sbjct 4737	GACITTTATGTTATTATAAATTAATAATCAATGCAATTTTGTGCATATTAATAAAATGCATAT			4796
Query 389	ACGATATAAAGGCATGGACAAAGGTGAAGTAGCTTCAAGAGACAGAGTTTCTGACATCAT			448
Sbjct 4797	ACGATATAAAGGCATGGACAAAGGTGAAGTAGCTTCAAGAGACAGAGTTTCTGACATCAT			4856
Query 449	TGTAATTTTAAAGCATCGTGGATATCCCGGAAAGTTTTGGATGCCAATGGGGATTTC			508
Sbjct 4857	TGTAATTTTAAAGCATCGTGGATATCCCGGAAAGTTTTGGATGCCAATGGGGATTTC			4916
Query 509	TCITTTACTGGATGTGGACAATATCCTCCTATTATTACAGGAAGCAATCCCTCCTATAAA			568
Sbjct 4917	TCITTTACTGGATGTGGACAATATCCTCCTATTATTACAGGAAGCAATCCCTCCTATAAA			4976
Query 569	AGGGCCTCAGCCGAAGTAGTGTTCAGCTGTCTTGGCTGACTTCACATCAAAACTCCTAT			628
Sbjct 4977	AGGGCCTCAGCCGAAGTAGTGTTCAGCTGTCTTGGCTGACTTCACATCAAAACTCCTAT			5036
Query 629	ACTGACCTGAGACAGAGGCAGCAGTGATACCCACCTGAGAGA 670			
Sbjct 5037	ACTGACCTGAGACAGAGGCAGCAGTGATACCCACCTGAGAGA 5078			

Şekil 4.6. Dizi analizi sonrasında elde edilen sekansların NCBI/BLAST programı ile hizalanması.

#### 4.6. HeLa Hücrelerine Gen Transfeksiyon Etkinliğinin Saptanması

24 kuyucuklu plaklara kontrol, 6, 24 ve 48 saat inkübasyon olacak şekilde tasarlanmış ve pCMV/ $\beta$ gal plazmidi ile transfekte edilmiştir. Transfekte edilen HeLa hücreleri daha sonra fikse edilerek X-gal boyaması yapılmış ve inverted ışık mikroskobuyla görüntülenmiştir. Ticari olarak 4 farklı transfeksiyon ajanı ile gerçekleştirilen transfeksiyon işlemindeki amaç transfeksiyonun etkinliğinin en yüksek ve toksisitenin en düşük olduğu lipozom markasını belirlemektir.



**Şekil 4.7.** Transfeksiyon ve boyama sonrası HeLa hücrelerinin görüntüsü (1) Lipofectamine 2000, (2) Fugene HD, (3) X-treme GENE 9 (Roche) (4) Attractene (Qiagen) (Deney seti 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir).

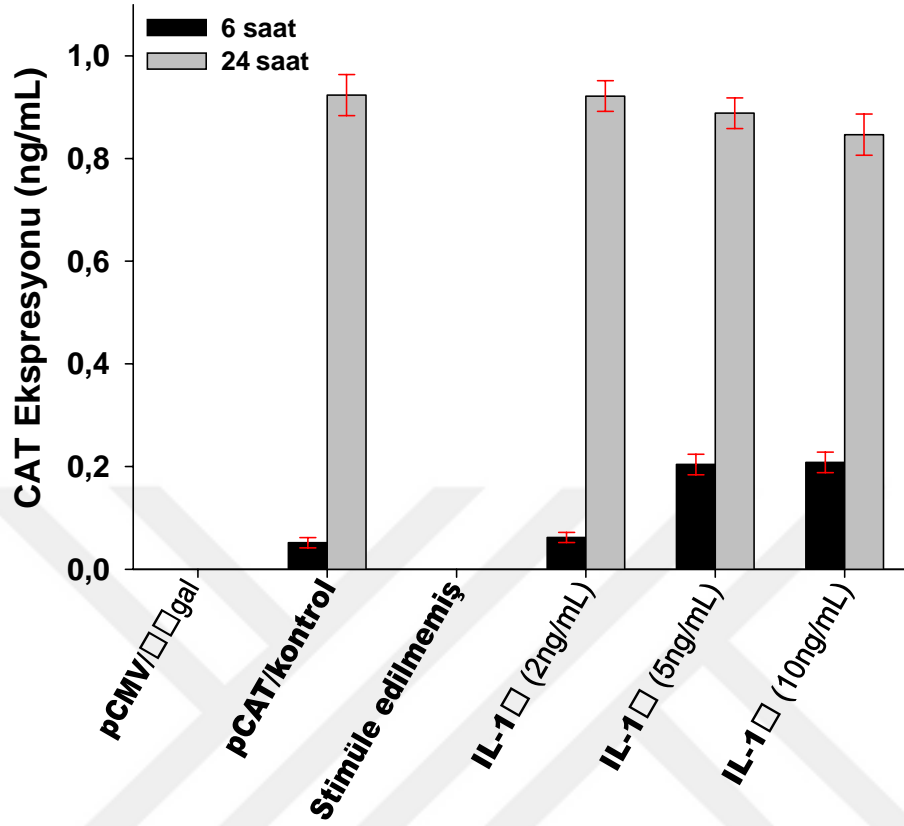
Farklı firmalardan temin edilen transfeksiyon ajanlarının, transfeksiyon etkinliklerinin saptanması için firmaların önerdikleri şekilde HeLa hücrelerine transfeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Belirlenen inkübasyon süreleri sonunda X-gal boyama ile ışık mikroskopunda 20X büyütme objektif ile incelenerek fotoğraflanmıştır.

Bu deneylere paralel olarak MTT testi ile hücre ölüm oranı ve lipofeksiyona bağlı toksisite oranlarına da bakılması amaçlanmıştır olsa da, bu durum mikroskopik incelemede net olarak gözlemlenebilirdiği için kullanılmamıştır. En fazla etkinlik ve en düşük toksisite gösteren transfeksiyon ajanı Lipofectamine 2000'in tüm deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir.

#### **4.7. ELAM-1 promotor aktivitesinin CAT ELISA Sonuçları**

HeLa hücrelerinin ve pCAT/ELAM-1pro. plazmitinin indüklenebilirliğinin ve kullanılan IL-1 $\beta$ 'nin etkin olup olmadığına yönelik olarak pCAT/ELAM-1pro. ile transfekte edilen hücreler farklı dozlarda IL-1 $\beta$  (2 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL) ile 6 veya 24 saat süre ile uyarıldı. Pozitif kontrol olarak CAT geninin yapısal olarak transkripsiyonuna neden olan CMV promotora sahip pCAT/kontrol (CMV promotor kontrolünde), negatif kontrol olarak CAT geni yerine başka bir röportör gene sahip olan pCMV/ $\beta$ gal (uygunsuz plazmit) kullanıldı.

CAT düzeylerinin ölçümü için ticari CAT ELISA testi uygulandı. ELAM-1 promotor aktivitesinin 6 saat içinde uygulanan tüm dozlarda uyarılabildiği, ancak muhtemel kümülatif etkiye de bağlı olarak 24 saatte daha belirgin olarak aktive olduğu gösterilirken, uyarılmamış hücrelerde herhangi bir CAT ekspresyonu artışı gözlenmemiştir.



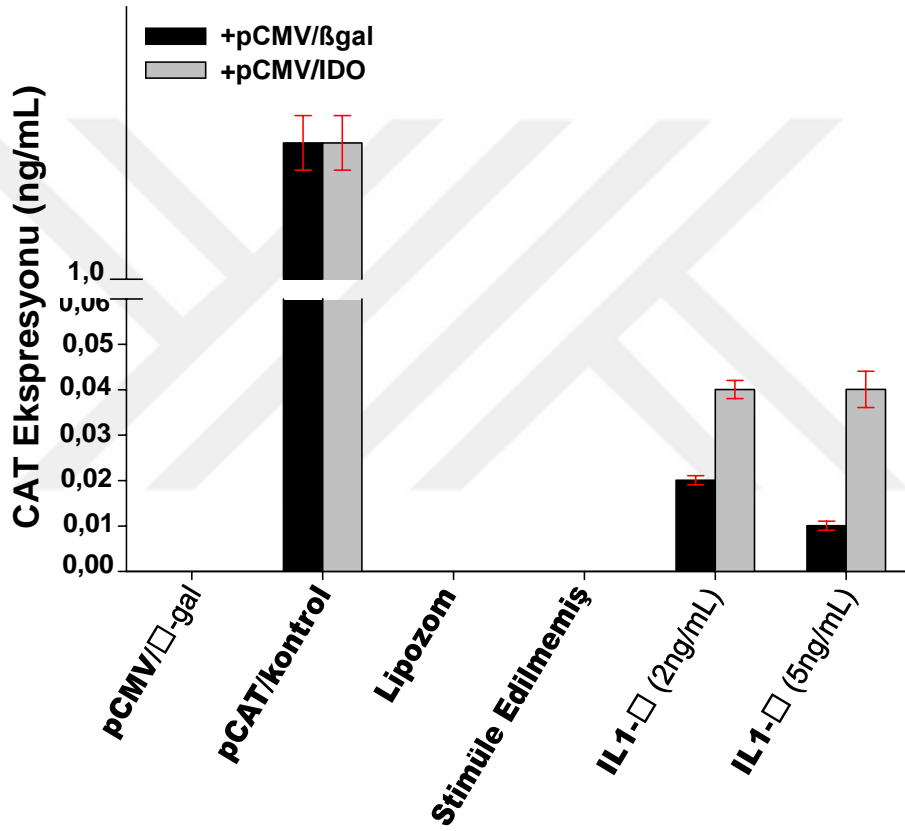
**Şekil 4.8.** pCAT/ELAM-1pro. transfeksiyonu sonrası CAT ELISA aktivite sonucu HeLa hücreleri 6 kuyulu kültür plaklarına  $2,5 \times 10^5$ /kuyu olarak dağıtılarak bir gece (yaklaşık 18 saat) kültüre edildi. Bir kısım kuyudaki hücreler pCAT/ELAM-1pro. ile transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak, bir kısım kuyudaki pCAT/kontrol, negatif kontrol olarak ise pCMV/βgal (uygunsuz plazmit) ile transfekte edildi. (Deney seti 4 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir).

#### 4.8. Eş Transfeksiyon Sonuçları

IDO ekspresyonu yapısal olarak sağlayan CMV promotor kontrolündeki plazmit ile pCAT/ELAM-1pro. plazmiti IDO'nun ELAM-1 promotor indüklenebilirliği üzerine baskılayıcı özelliği olup olmadığını anlamak için HeLa hücrelerine eş transfekte edilmiştir. Bu deneylerde kontrol olarak pCMV/βgal (pCMV/hIDO yerine) kullanılmıştır.



CAT düzeylerinin diğer deneylerdekine göre düşük bulunmasının nedeni pCAT/ELAM-1pro. plazmit konsantrasyonunun, eÇ-transfeksiyon çalışması yapılması nedeniyle optimal konsantrasyondan 3 kat düşük olarak kullanılmasına bağlanmıştır. EÇ transfeksiyon analizi sonrasında ELAM-1 promotorunun IDO üzerinde baskılayıcı bir etkisi olmadığı, bunun aksine IDO'yu aktive edici özellik gösterdiği belirgin bir şekilde görülmektedir.

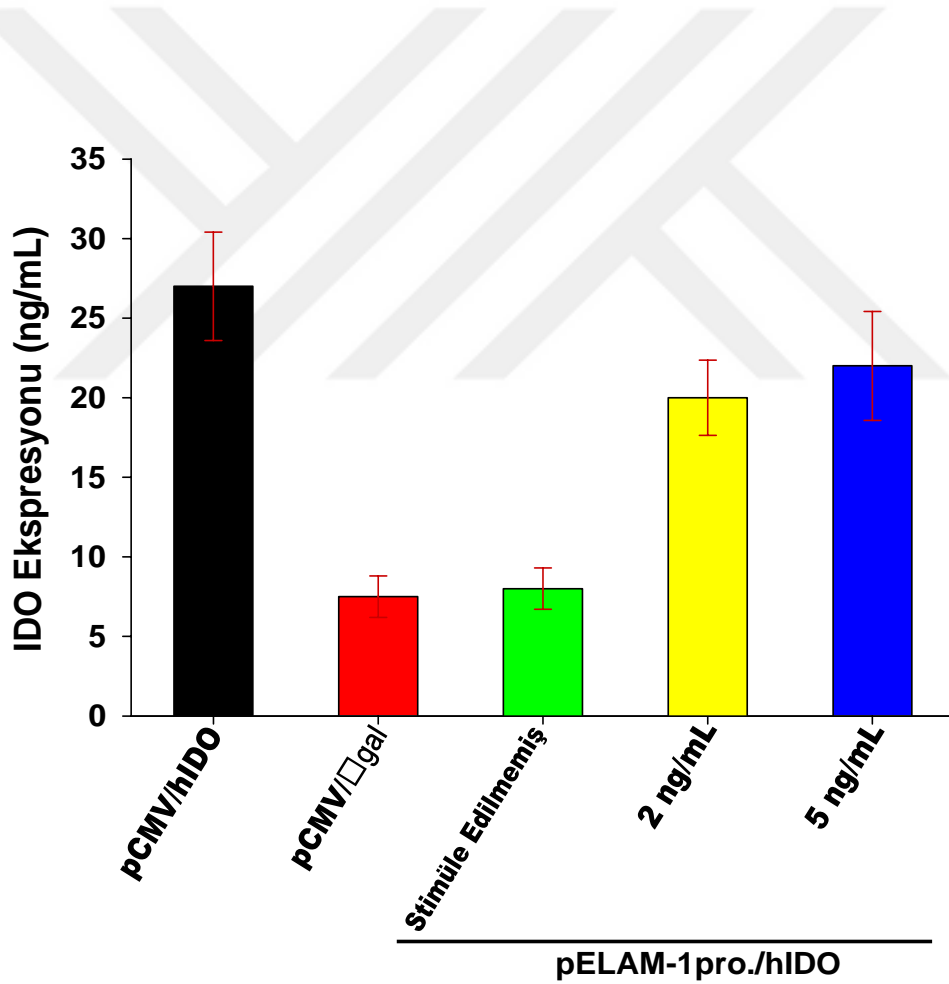


**Şekil 4.9.** pCAT/ELAM-1pro. ve pCMV/hIDO eÇ transfeksiyonu sonucu CAT aktivitesi HeLa hücreleri 6 kuyulu kültür plaklarına 2.5 x 10<sup>5</sup>/kuyu olarak dağıtılarak bir gece (yaklaşık 18 saat) kültüre edildi. Bir kısım kuyudaki hücreler pELAM-1.pro/CAT + pCMV/IDO veya pCMV ile sırasıyla (1:2) oranında karıştırılarak eÇ-transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak, bir kısım kuyudaki pCAT/kontrol, negatif kontrol olarak ise pCMV/βgal (uygunsuz plazmit) ile transfekte edildi. (Deney seti 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir).

#### 4.9. pELAM-1pro./hIDO Transfeksiyonu sonrası ELISA Sonuçları

Hücreler transfeksiyon sonrası IL-1 $\beta$  ile 2 ng/mL ve 5 ng/mL'lik dozlarda uyarılmıştır. U.S (stimüle olmayan) hücelere ELAM-1/hIDO transfer edilmiş fakat hüceler uyarılmamıştır. Hücelere pozitif kontrol olarak pCMV/hIDO ve negatif kontrol olarak pCMV/ $\beta$ gal plazmitleri aktarılmıştır.

Hücre lizatlarından alınan örnekler ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. IL-1 $\beta$  ile farklı dozlarda uyarılan hücelerde IDO aktivitesi negatif kontrole ve uyarılmamış hücelere göre önemli derecede artmıştır (şekil 4.10.).



Şekil 4.10. pELAM-1pro./hIDO transfekte edilen hücelerin uyarılma sonrası ELISA verileri (Deney seti 3 kez tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir).



#### 4.10. Hela Hücrelerindeki Transkripsiyon Ölçüm Sonuçları

24 saatlik transfeksiyon sonrası 24 saat IL-1 $\beta$  ile 2 ng/mL ve 5 ng/mL  $\zeta$ eklinde uyarılan hücreler, pozitif ve negatif kontrollerdeki transkriptlerle beraber incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak CMV promotor kontrolünde sürekli eksprese olan IDO, negatif kontrol olan pCMV/ $\beta$ gal ile kıyaslanmıştır. ELAM-1 promotor kontrolünde eksprese olan IDO ise pELAM-1pro./hIDO transfekte edilen fakat stimüle edilmemiş hücrelerdeki transkriptlerle kıyaslanmıştır (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** pELAM-1pro./hIDO 24 saatlik transfeksiyon ve stimülasyon sonrası transkripsiyon verileri ( Deney seti 3 tekrarlı olacak  $\zeta$ ekilde gerçekleştirilmiştir).

	$\Delta$ CT	$2^{\Delta}$ $\Delta$ CT	SD
<b>pCMV/hIDO</b>	-7,74167	214,03	$\pm$ 0,747
<b>pELAM-1pro./hIDO IL-1<math>\beta</math> 2 ng/mL</b>	-1,37333	2,59	$\pm$ 0,375
<b>pELAM-1pro./hIDO IL-1<math>\beta</math> 5 ng/mL</b>	-1,48667	2,8	$\pm$ 0,181

pCMV/hIDO transfekte edilen hücreler, pCMV/ $\beta$ gal negatif kontrol transfekte edilen hücrelerdeki IDO transkriptleriyle karşılaştırılmış, pELAM-1pro./hIDO transfekte edilen hücreler de IL-1 $\beta$  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 IL-1 $\beta$  ile uyarılmıştır. Böylece transkripsiyonun hangi zaman aralığında en üst seviyeye geldiği belirlenmiştir. ELAM-1 promotörü enflamasyonun ilk 30 dakikasından sonra belirgin bir artış göstermiş ve 1 saatte maksimum seviyeye gelmiştir. 4 saat sonunda transkripsiyon seviyesi azalmaya başlamıştır.

Ayrıca pCMV/IDO plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin IL-1 $\beta$  (2 ng/mL ve 5 ng/mL) ile stimüle edildiklerinde IDO transkripsiyonunda önemli bir değişim gerekleğmemiştir. Bu durum IL-1 $\beta$ 'nin iki farklı dozunun da CMV promotoru üzerinde etkili olmadığı anlağılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan pCMV/ $\beta$ gal plazmiti transfekte edilen hücrelerde de IL-1 $\beta$  uyarımı sonrasında herhangi bir transkripsiyon artığı görülmemiştir.

**Çizelge 4.2.** pELAM-1pro./hIDO plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 2 ng/mL ve 5 ng/mL dozlarda IL-1 $\beta$  ile saatli uyarımı sonucunda gerekleğen transkripsiyon sonuçları (Deney 3 tekrarlı olacak ekilde gerekleğtirilmiştir).

pELAM-1pro./hIDO IL-1 $\beta$ 2ng/mL				pELAM-1pro./hIDO IL-1 $\beta$ 5 ng/mL			
Stimölasyon Süresi	$\Delta$ CT	2 $^{\Delta}$ $\Delta$ CT	SD	Stimölasyon Süresi	$\Delta$ CT	2 $^{\Delta}$ $\Delta$ CT	SD
<b>1/2 h</b>	-5,3	39,4	$\pm$ 0,240	<b>1/2 h</b>	-5,64	49,87	$\pm$ 0,05
<b>1 h</b>	-5,7	51,98	$\pm$ 0,250	<b>1 h</b>	-5,59	48,17	$\pm$ 0,210
<b>2 h</b>	-5,2	36,76	$\pm$ 0,152	<b>2 h</b>	-5,4	42,22	$\pm$ 0,113
<b>3 h</b>	-5,1	34,3	$\pm$ 0,321	<b>3 h</b>	-5,09	34,06	$\pm$ 0,170
<b>4 h</b>	4,3	17,9	$\pm$ 0,084	<b>4 h</b>	-4,59	24,08	$\pm$ 0,400

**Çizelge 4.3.** pCMV/hIDO plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 2 ng/mL ve 5 ng/mL dozlarda IL-1 $\beta$  ile saatli uyarımı sonucunda gerçekleşen transkripsiyon sonuçları (Deney 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir).

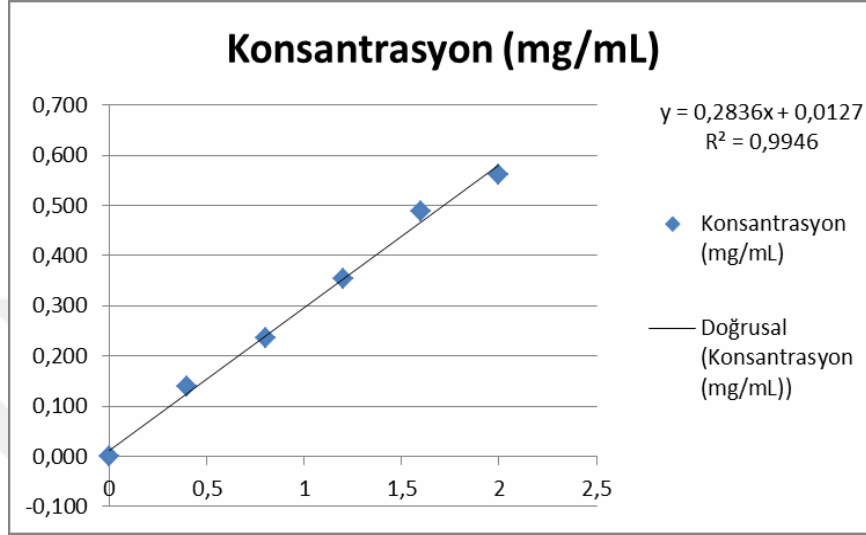
pCMV/hIDO IL-1 $\beta$ 2ng/mL				pCMV/hIDO IL-1 $\beta$ 5 ng/mL			
Stimülasyon Süresi				Stimülasyon Süresi			
	$\Delta$ CT	2 <sup>^</sup> $\Delta$ CT	SD		$\Delta$ CT	2 <sup>^</sup> $\Delta$ CT	SD
<b>1/2 h</b>	0,43	0,74	$\pm$ 0,082	<b>1/2 h</b>	0,27	0,83	$\pm$ 0,119
<b>1 h</b>	-0,4	1,32	$\pm$ 0,113	<b>1 h</b>	-0,7	1,62	$\pm$ 0,210
<b>2 h</b>	3,6	0,08	$\pm$ 0,364	<b>2 h</b>	-0,31	1,24	$\pm$ 0,113
<b>3 h</b>	0,75	0,59	$\pm$ 0,545	<b>3 h</b>	-0,29	1,22	$\pm$ 0,176
<b>4 h</b>	0,69	0,62	$\pm$ 0,106	<b>4 h</b>	-0,64	1,56	$\pm$ 0,400

**Çizelge 4.4.** pCMV/ $\beta$ gal plazmiti ile transfekte edilen hücrelerin 2 ng/mL ve 5 ng/mL dozlarda IL-1 $\beta$  ile saatli uyarımı sonucunda gerçekleşen transkripsiyon sonuçları (Deney 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir).

pCMV/ $\beta$ gal IL-1 $\beta$ 2ng/mL				pCMV/ $\beta$ gal IL-1 $\beta$ 5 ng/mL			
Stimülasyon Süresi				Stimülasyon Süresi			
	$\Delta$ CT	2 <sup>^</sup> $\Delta$ CT	SD		$\Delta$ CT	2 <sup>^</sup> $\Delta$ CT	SD
<b>1/2 h</b>	1,58	0,33	$\pm$ 0,06	<b>1/2 h</b>	-0,33	1,26	$\pm$ 0,007
<b>1 h</b>	1,7	0,31	$\pm$ 0,349	<b>1 h</b>	-0,8	1,74	$\pm$ 0,516
<b>2 h</b>	0,7	0,62	$\pm$ 0,444	<b>2 h</b>	-0,3	1,23	$\pm$ 0,303
<b>3 h</b>	1,9	0,27	$\pm$ 0,212	<b>3 h</b>	0,1	0,93	$\pm$ 0,212
<b>4 h</b>	1,5	0,35	$\pm$ 0,233	<b>4 h</b>	-0,55	1,46	$\pm$ 0,311

#### 4.11. Western blot protein analiz sonuçları

HeLa hücre hatlarından elde edilen lizatların total protein konsantrasyonlarını belirlemek için bir standart eğri grafiği çizilmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. BSA standart eğri grafiği

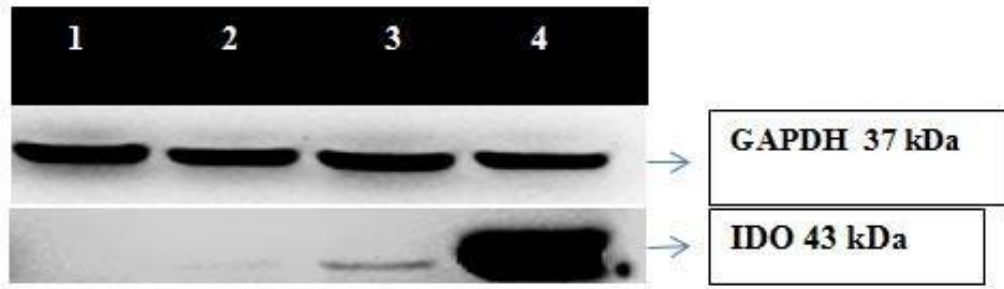
Kuyulara yüklenecek örneklerin protein konsantrasyonları 35 µg olacak şekilde sabitlenmiş ve grafik formülünün yardımıyla konsantrasyonlar hesaplanmıştır (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Örneklerin protein konsantrasyonları (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 IL-1 $\beta$  ile uyarılan hücrelerdeki protein seviyeleri kıyaslanmıştır. Uyarılmayan hücrelerde *IDO* geninin aktive olmadığını, 2 ng/mL'lik dozda ise protein ekspresyonunun başladığı, 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 4.12).



**Şekil 4.12.** Western blotlama analizi sonucu

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

## 5. SONUÇ

İmmünolojik tolerans, antijen ile karşılaşan lenfositlerin yanıtsız kalması olarak tanımlanmıştır. Karşılaştığı antijene özgül reseptörler taşıyan lenfositler ya aktive olarak immün yanıtın oluşumuna yol açabilir (Efektör İmmün Yanıt) ya da fonksiyonel olarak etkisiz hale getirilir veya öldürülerek ortadan kaldırılabılır (Tolerans). Bazı durumlarda, ise antijene özgül lenfositler antijeni görmezden gelerek veya göremeyerek herhangi bir yanıt geliştirmedikleri için de tolerans gelişebilir.

Normal bireyler kendi (öz) antijenlerine karşı toleranslıdır, çünkü lenfositler öz antijenlere yanıt vermeyecek şekilde seçilmişlerdir. (Abbas ve ark. 2015). Tolerans ilk olarak CD4 T hücrelerinde tanımlanmış olup bu hücreler öz antijenlere yanıt oluşturmazlarsa, hücrel ve humoral immüniteye karşı oluşturdukları yanıt engellenmiş olacaktır. Bunun aksine yardımcı T hücrelerindeki toleransın kırılması durumunda öz antijene T hücre aracılı saldırı ya da öz proteinlere karşı otoantikor yapımı sonucunda otoimmün reaksiyonlar gerçekleşebilir (Abbas ve Lichtman 2007).

Örneğin Sistemik otoimmün bir hastalık olan Romatoid artrit, birçok eklemden sinoviyal dokuları hedef alan kronik enflamatuvar bir hastalıktır (Tak ve Bresnihan 2000). 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 patogeneze rolü olduğu ortaya konulmuştur (Mellor ve Munn 2004).

Diğer yandan birçok enflamatuvar 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) (McMurray 1996, Mojcik ve Shevach 1997). 115 kDa'luk bir glikoprotein olan ELAM1 pro-enflamatuvar

sitokinler olan TNF ve IL-1 ile uyarıldıklarında erken dönemde (2-6 saat) endotel üzerinde ifade edilir (Pober ve ark. 1986, Wellicome ve ark. 1990). IDO geni ise, insan ve farede 8. Kromozom üzerinde 10 ekzona sahiptir ve üzerinde yaklaşık 15 kb'lık bölgesinde lokalize olup oradan kodlanır (Mellor ve Munn 2004). İnsan IDO cDNA'sı 403 aminoasit kodlar ve yaklaşık 45 kDa'luk moleküler ağırlığa sahiptir (Stocker 1999).

Bu çalışmadaki amaç Indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) geninin indüklenebilir ELAM-1 promotör kontrolü altında ekspresyonunu sağlamaktır. Böylece ELAM-1 promotörü altındaki *IDO* geninin sadece enflamasyon durumunda eksprese olup terapötik etkisini gösterebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda öncelikle HeLa hücrelerine klonlanan plazmidin transfeksiyonunu gerçekleştirmek için dört farklı ticari lipozom markası denenmiştir. Analizler sonucunda en etkili ve toksik olmayan lipozom markasının Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> olduğu gösterilmiştir.

Klonlamadan önce ELAM-1 promotörünün indüklenebilirliğini test etmek için pCAT/ELAM-1pro. plazmit ekspresyonu gözlenmiştir. IL-1β'nin etkin dozları ise 2 ng/mL ve 5 ng/mL olarak gösterilmiştir.

IDO'nun ELAM-1 promotörün üzerine muhtemel bir baskılayıcı etkisi olup olmadığını test etmek için IDO ekspresyonunu yapısal olarak sağlayan CMV promotör kontrolündeki plazmit pCMV/hIDO ile pCAT/ELAM-1pro. plazmiti HeLa hücrelerine eÇ-transfekte edilmiştir. Bu deney sonucunda IDO'nun ELAM-1 promotör etkisini baskılayıcı yönde bir etkisinin olmadığı, aksine bir miktar artışa yol açtığı ortaya konmuştur.

Ardından ELAM-1 promotörü kontrolünde eksprese edilen IDO plazmidinin yapımına geçilmiştir. ELAM-1 promotörü uygun restriksiyon bölgeleri içeren primerler ile pCAT/ELAM-1pro. plazmidinden çoğaltılarak TA klonlamayla pGEMT-Easy vektörüne yerleştirilmiştir ve *E. coli*'ye transforme edilmiştir. X-gal içeren besiyerindeki beyaz koloniler seçilerek bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmış ve aynı

restriksiyon enzimleri ile kesilerek uygun olabileceği düşünülen koloniler belirlenmiştir. pCMV/hIDO vektöründeki CMV promotoru aynı enzimlerle kesilerek çıkarılmış ve kolonilerden kesilen ELAM-1 promotoru T4 ligaz enzimi yardımıyla CMV promotorunun yerine yapıştırılmıştır. Transfomasyon ile pELAM-1pro./hIDO plazmiti aktarılan *E. coli* hücreleri besiyerinde çoğaltılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Ardından, plazmite klonlanmış DNA fragmanının T7 ve BGH pCMV/hygro vektör primerleriyle çift yönlü sekans analizi yapılmıştır. Sekans sonuçları Gen Bankası ELAM-1 promotoruna ait sekans verileri kullanılarak NCBI (Blast) ile hizalanmıştır. Sekans sonuçlarının en güvenilir olduğu klondan bol miktarda plazmit elde edilmiştir.

pELAM-1pro./hIDO plazmidi Lipofectamin 2000<sup>TM</sup> gen aktarım ürünü ile 24 saatlik transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra 24 saat IL-1 $\beta$  (2 ng/mL ve 5 ng/mL) dozları ile stimüle edilerek ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 5 ng/mL'lik dozun IDO ekspresyonunu en belirgin şekilde aktive ettiği gözlenmiştir. Bunun yanında IDO transkripsiyonunu gözlemek için aynı süre içerisinde inkübe edilip, aynı dozlarla uyarılan hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ters transkripsiyon ile izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kantitatif olarak qRT-PZR ile ölçülen değerler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve housekeeping genlerle normalize edilmiştir. 24 saatlik stimülasyon sonucunda 5 ng/mL dozda uyarılan hücrelerde, transkripsiyonun uyarılmayan hücrelerle kıyaslandığında daha belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Fakat beklenenden daha düşük değerlerin gözlenmesi nedeniyle 24 saatlik transfeksiyon sonrası hücreler belirli saatlerde IL-1 $\beta$  ile uyarılmış ve kantitatif analizleri yeniden gerçekleştirilmiştir. Ayrıca CMV promotorunun IL-1 $\beta$ 'nin farklı dozlarından etkilenip etkilenmediğini belirlemek için hücreler pCMV/hIDO plazmitiyle transfekte edilerek aynı şekilde uyarılmıştır. Saatli stimülasyonlar sonucunda, ilk yarım saat ve bir saatlik stimüle edilen hücrelerde IDO'nun transkripsiyonu 2 ng/mL ve 5 ng/mL'lik farklı dozlarda diğerlerine göre en yüksek seviyede gözlenmiştir. CMV promotorunun IL-1 $\beta$ 'den etkilenmediği deney sonuçlarında belirgin olarak gözlenmektedir.

IDO'nun protein analizi ise Western blotlama ile gösterilmiştir. pELAM-1pro. vektörü ile 24 saat transfekte edilen hücreler, 2 ng/mL ve 5 ng/mL iki farklı dozda IL-1 $\beta$  ile 24



saat stimüle edilmiştir. Pozitif kontrol olarak pCMV/hIDO ve negatif kontrol olarak pELAM-1pro./hIDO plazmiti kullanılmış fakat IL-1 $\beta$  ile stimüle edilmemiştir. Yapısal (constitutive) promotor olan CMV transfekte edilen hücrelerde 43 kDa'luk bant belirgin şekilde gözlenmiştir. 5ng/mL'lik dozda uyarılan hücrelerdeIDO proteini belirgin bir şekilde gözlenirken 2ng/mL'deki bant görüntüsü daha düşük düzeyde protein ekspresyonun olduğunu göstermiştir. IL-1 $\beta$  ile uyarılmayan hücrelerde ise herhangi bir bant gözlemlenmemiştir. IDO ekspresyonu GAPDH ile normalize edilmiştir.

Sonuç olarak enflamatuvar sitokinlerle indüklenen insan *IDO* genini eksprese eden plazmitin yapımı gerçekleştirilmiş ve işlevsel olduğu gösterilmiştir. Bu gen kombinasyonunu içeren konstrüksiyon birçok otoimmün ve enflamatuvar hastalık modellerinde (özellikle hayvan modelleri) lipozom aracılı ve ya viral vektörler aracılı olarak ileri çalışmalarda kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

**Abbas, A.K. Lichtman, A.H. 2007.** İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite İmmün Sistem Fonksiyonları ve Bozuklukları: Temel İmmünoloji, Editörler: Camcıoğlu, Y. Deniz, G., İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, s. 161-176.

**Abbas, A.K. Lichtman, A.H. 2007.** İmmünolojik Tolerans ve Otoimmünite İmmün Sistem Fonksiyonları ve Bozuklukları: Temel İmmünoloji, Editörler: Camcıoğlu, Y. Deniz, G., İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, s. 284.

**Abbas, A.K. Lichtman, A.H. Pillai, S. 2015.** Immunologic Tolerance and Autoimmunity: Basic Immunology Functions and Disorders of the Immune System, Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, pp. 315-337.

**Addams, D. 1996.** How the immun system works and why it causes autoimmun disease: *Immunol Today*, (17): 300-302.

**Akkaraju, S. Ho, W.Y. Leong, D. Canaan, K. Davis, M.M. Goodnow, C.C. 1997.** A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigenallows nondestructive thyroiditis or insulitis. *Immunity*, (7):255-71.

**Alarcon-Riquelme, M., Alarcon-Segovia, D. 2005.** Shared Autoimmunity: The concept and introduction. *Autoimmunity*, 38(3): 199.

**Anonim, 2009.** Entrezgene. SELL selectin-L *Homo sapiens* (human). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6402-> (Erişim tarihi: 10.02.2017).

**Baltimore, D. 1970.** Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226(5252):1209-11.

**Bangham, A.D., Standish , M.M., Watkins, J.C. 1965.** Diffusion of Univalent Ions Across the lamellae of swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, (13): 238 -262.

**Bauer, T.M., Jiga, L.P., Chuang, J.J., Randazzo, M., Opelz, G., Terness, P. 2005.** Studying The İmmunosuppressive Role Of İndoleamine 2,3-Dioxygenase: Tryptophan Metabolites Suppress Rat Allogeneic T-Cell Responses İn Vitro And İn Vivo. *Transplant International*, (18): 95-100.

**Becker, K.G., Simon, R.M., Bailey-Wilson, J.E. 1998.** Clustering of non- major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proceedings of National Academy of Sciences*, (95):9979-84.

**Beutelspacher, S.C., Pillai, R., Watson, M.P., Tan, P.H., Tsang, J., McClure, M.O., George, A.J., Larkin, D.F. 2006.** Function Of İndoleamine 2,3-Dioxygenase İn Corneal Allograft Rejection And Prolongation Of Allograft Survival By Over-Expression. *European Journal of Immunology*, (36): 690-700.

**Beutespacher S.C., Tan, P.H., McClure, M.O., Larkin, D.F., Lechler, R.I., George, A.J. 2006.** Expression Of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (Ido) By Endothelial Cells: Implications For The Control Of Alloresponses. *American Journal of Transplantation*, (6): 1320-1330.

**Brenchley, P.E. 2001.** Antagonising Angiogenesis In Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(3): 71-74.

**Buer, J. Lanoue, A. Franzke, A. Garcia, C. von Boehmer, H. Sarukhan, A. 1998.** Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, (187):177-83.

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

**Cleator, J.H., Zhu, W.Q., Vaughan, D.E., 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.

**Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T. 1995.** Transcriptional Regulation Of Endothelial Cell Adhesion Molecules: Nf-Kappa B And Cytokine-Inducible Enhancers. *The Jaseb Journal*, (9): 899-909.

**Delves P.J, Roitt I.M. 2000.** The immune system. *The New England Journal of Medicine*, 343: 37-49.

**Dhein, J. Walczak, H. Bäuml, C. Debatin, K.M. Krammer, P.H. 1995.** Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, (373): 438-41.

**Diss, J., Fraser, S.P., Walker, M.M., Patel, A., Latchman, D.S., Djamgoz, M.B.A. 2008.**  $\alpha$ -Subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Nature*, 11: 325-333.

**Doan, T. Melvold, R. Viselli S. Waltenbaugh, C. 2013.** Otoimmünite: İmmünoloji, Editör: Harvey, R.A., Nobel Yayıncılık, İstanbul, s. 243-256.

**Duve, C., Trouet, A., Campeneere, D.D. 1998.** Liposomes as Lysosomotropic Carriers. *Annals of the New York Academy Sciences*, (53): 266-234.

**Emery, P., Salmon, M. 1995.** Early rheumatoid arthritis: time to aim for remission. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 54(12):944-7.

**Encinas, J.A., Kuchroo, V.K. 2000.** Mapping and identification of autoimmunity genes. *Current Opinion in Immunology*, (12): 691-7.

**Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C. Puccetti, P. 2002.** T Cell Apoptosis By Tryptophan Catabolism. *Cell Death and Differentiation*, (9): 1069-1077.

**Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N. 1996.** Rheumatoid arthritis. *Cell*, 85(3): 307-10.

**Ferber, I. Schönrich, G. Schenkel, J. Mellor, A.L. Hammerling, G.J. Arnold, B. 1994.** Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science*, (263): 674-6.

**Fisher, G.H. Rosenberg, F.J. Straus, S.E. 1995.** Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune Lymphoproliferative syndrome. *Cell*, (81): 935-46.

**Förster, I. Hirose, R. Arbeit, J.M. Clausen, B.E. Hanahan, D. 1995.** Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity*, (2): 573-85.

**Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., 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): 459-468.

**Grohmann, U., Fallarino, F., Puccetti, P. 2003.** Tolerance, DCs and tryptophan: Much ado about IDO. *Trends Immunology*, 24(5): 242-248.

**Gurtner, G.J., Newberry, R.D., Schloemann, S.R., McDonald, K.G., Stenson, W.F. 2003.** Inhibition Of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Augments Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis In Mice. *Gastroenterology*, (125): 1762-1773.

**Hallmani, R., Julita, C.W., Smith, D.C., Anderson, T.K., Kishimoto, K., Butcher E.C. 1991.** The peripheral lymph node homing receptor LECAM-1 is involved in CD18-independent adhesion of human neutrophils to endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (174): 236-243.

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

**Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., 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.

**Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A. Raz, E. 2004.** Inhibition Of Experimental Asthma By Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *The Journal of Clinical Investigation*, (114): 270-279.

**Hoof van Huijsduijnen, R., Pescini, R., 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): 3711-3717.

**Kamradt, T., Mitchison, A.N. 2001.** Tolerance and Autoimmunity. *The New England Journal of Medicine*, 344(9): 655-664.

**Kitze, B. Pette, M. Rohrbach, E. Stadt, D. Kappos, L. Wekerle, H. 1988.** Myelin-specific T lymphocytes in multiple sclerosis patients and healthy individuals. *Journal of Neuroimmunology*, 20: 237.

**Klein, J., Sato, A. 2000.** The HLA system. *The New England Journal of Medicine*, (343): 782-6.

**Klein, L. Klugmann, M. Nave, K.A. Tuohy, V.K. Kyewski, B. 2000.** Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nature Medicine*, (6):56-61.

**Kudo, Y., Boyd, C.A., Spyropoulou, I., Redman, C.W., Takikawa, O., Katsuki, T., Hara, T., Ohama, K. Sargent, I.L. 2004.** Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Distribution And Function in The Developing Human Placenta. *Journal of Reproductive Immunology*, (61): 87-98.

**Kwidzinski, E., Bunse, J., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R. Bechmann, I. 2005.** Indoleamine 2,3-Dioxygenase is Expressed in The Cns And Down-Regulates Autoimmune Inflammation. *The FASEB Journal*, (19): 1347-1349.

**Lawrence, M.B., Springer, T.A. 1991.** Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, (65): 859-873.

**Liu, G., Li, X., Li, Y., Tang, X., Xu, J., Li, R., Hao, P., Sun, Y. 2013.** PPAR $\delta$  Agonist GW501516 Inhibits PDGF-Stimulated Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Function Related to Pathological Vascular Remodeling. *Hindawi Publishing Corporation Biomed Research International*, 903947.

**Luscinskas F. W., Brock, A F., Arnoout, M.A., Gimbrone, M.A. 1989.** Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 dependent and leukocyte (CD11/CD18)dependent mechanisms contribute to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cytokine-activated human vascular endothelium. *The Journal of Immunology*, (142): 2257-2263.

**Mauri, C. Bosma, A. 2012.** Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of Immunology*, (30): 221-241.

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

**McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F. 1989.** GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of Clinical Investigation*, 84 (1): 92–9.

**Mcmurray, R.W. 1996.** Adhesion Molecules in Autoimmune Disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, (25): 215-233.

**Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P.A., Iwashima, M., Munn, D.H. 2003.** Cutting Edge: Induced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Dendritic Cell Subsets Suppresses T Cell Clonal Expansion. *The Journal of Immunology*, (171): 1652-1655.

**Mellor, A.L., Munn, D.H. 2004.** IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature*, 4(10): 762-774.

**Moffett, J.R., Nambodiri, M.A. 2003.** Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology*, 81, 247-265.

**Mojcik, C.F., Shevach, E.M. 1997.** Adhesion Molecules: A Rheumatologic Perspective. *Arthritis and Rheumatology*, (40): 991-1004.

**Morel, L., Tian, X.H., Croker, B.P. 1999.** Wakeland EK. Epistatic modifiers of autoimmunity in a murine model of lupus nephritis. *Immunity*, (11): 131-9.

**Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. Mellor, A.L. 1998.** Prevention Of Allogeneic Fetal Rejection By Tryptophan Catabolism. *Science*, (281): 1191-1193.

**Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A. 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): 280-290.

**Murphy, K. 2012.** Autoimmunity: Janeway's Immunobiology, Editörler: 8 th., Garland Science, Newyork, USA, pp. 462-480.

**Naquet, P. Ellis, J. Tibensky, D. 1988.** T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *The Journal of Immunology*, (140): 2569-78.

**Nemazee, D. 2000.** Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, (18): 19-51.

**Nicolau, C., Cudd, A. 1989.** Liposomes as carriers of DNA. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, (6): 239–271.

**Oral, H.B. 1997.** Use of gene transfer to protect cells from oxidant-mediated injury. PhD. Thesis, Royal Postgraduate Medical School, University of London, United Kingdom.

**Paeleolog, E.M. 1996.** Angiogenesis: A Critical Process In The Pathogenesis Of RA a Role For Vegf Br. *The Journal of Rheumatology*, (35): 917-919.

**Pan, J., Xia, L., 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.

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

**Pillai, S. Mattoo, H. Cariappa, A. 2011.** B cells and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, (23): 721–731.

**Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Jr., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R. Springer, T.A. 1986.** Overlapping Patterns Of Activation Of Human Endothelial Cells By Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, And Immune Interferon. *The Journal of Immunology*, (137): 1893-1896.

**Prete, M., Racanelli, V., Digiglio, L., Vacca, A., Dammacco, F., Perosa F. 2011.** Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity Reviews*, (2): 123–31.

**Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. 1998.** Robbins Pathologic Basis of Disease. *W.B Saunders Company*, 97: 2307–2315.

**Ruacan, Ş. 1999.** Otoimmünite: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, Güneş Kitabevi, Ankara, s. 245-249.

**Schoenfeld, Y., Potter, K. 2002.** Human Antibodies. (11): 9-12.

**Sheridan, C. 2011.** Gene therapy finds its niche. *Nature Biotechnology*, 29: 121-128.

**Shoenfeld, Y., Zandman-Goddard, G., Stojanovich, L., Cutolo, M., Amital, H., Levy, Y. Abu-Shakra, M., Barzilai, O., Berkun, Y., Blank, M., Freire de Carvalho, J., Doria, A., Gilburd, B., Katz, U., Toubi, E., Sherer., Y. 2008.** The Mosaic of Autoimmunity: Hormonal and Environmental Factors Involved in Autoimmune Diseases. *Israel Medical Association Journal*, (10): 12.

**Smith, D.A., Germolec, D.R. 1999.** Introduction to Immunology and Autoimmunity. *Environmental Health Perspectives*, 107(5): 661-665.

**Sugimoto, H., Oda, S., Otsuki, T., Yoshida, T., Shiro, Y. 2006.** Crystal structure of human indolamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(8): 2611-2616.

**Tak, P.P., Bresnihan, B. 2000.** The Pathogenesis And Prevention Of Joint Damage In Rheumatoid Arthritis: Advances From Synovial Biopsy And Tissue Analysis. *Arthritis Rheumatology*, 43: 2619-2633.

**Takikawa, O. 2005.** Biochemical and medical aspect of indolamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 338(1): 12-19.

**Thomas, R.S., Terentis, C.A., Cai, H., Takikawa, O., Levina, A., Lay, A.P., Freewan, M., Stocker, R. 2007.** Post-translational regulation of human indolamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33): 23778-23787.

**Thomas, S.R., Stocker, R. 1999.** Redox reaction related to indolamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurinin pathway. *Redox Report*, 4(5): 199-220.

**Vafiadis, P. Bennett, S.T. Todd, J.A. 1997.** Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nature*, (15): 289-92.

**Van Parijs, L., Abbas, A.K. 1998.** Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, 280:243-248.

**Wade, N. 1981.** Gene therapy caught in more entanglements. *Science*, 212(4490): 21-4.

**Watson, J.D. 1981.** Gene therapy: How ripe the time? *Lancet*, 317(8213): 196-7.

**Watson, S.R., Fennie, C., Lasky, L.A. 1991.** Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature*, (349): 164-167.

**Wellicome, S.M., Thornhill, M.H., Pitzalis, C., Thomas, D.S., Lanchbury, J.S., Panayi, G.S. 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): 2558-2565.

**Whelan, J., Ghersa, P., Hooft Van Huijsduijnen, R., Gray, J., Chandra, G., Talabot, F., 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): 2645-2653.



## **EKLER**

**EK 1** Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

**EK 2** Vektör ve Plazmit Sekansları



## **EKLER**

### **EK 1: Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması**

#### **1. Agaroz Jel Hazırlanması**

Agaroz pahalı bir madde olduğu için öncelikle jel döküm tablasının boyutları (jel kalınlığı da dikkate alınarak) ölçülür ve hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gereken miktar agaroz dikkatli bir şekilde tartılır ve erlen içine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanır) konarak ateş üzerine alınır ve eritilir (3-5 sn kaynaması yeterlidir). Ateşten alınan jel üzerine son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde stok EtBr. solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 °C'ye (el sıcaklığı) geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür ve yaklaşık 40 dk beklenerek donması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılır. Jel, örneklerin yüklenmesine ve elektroforeze hazırdır.

#### **2. LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı Hazırlanması**

1 litre için

Yeast extract: 5 gr

Bacto tryptone: 10 gr

NaCl: 10 gr

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre içindir. Hazırlanacak olan hacim için gereken miktar içerik orantılanarak tartılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür ve pH'sı NaOH ile 7,5'e ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanır ve erlenlere (erlen hacminin 1/10'u oranında) paylaştırılır. Erlenlerin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak otoklavlanır. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir. Kontaminasyon belirtisi olanlar dökülür.

### 3. LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması

Hazırlanan sıvı besiyerine %1,5 oranında agar katılır ve aynı şekilde otoklavlanır. Kullanılacak petri kutuları da kağıda sarılarak otoklavlanır. Besiyeri steril kabin içinde petri kutularına paylaştırılır ve donduktan sonra streç filmle sarılarak +4 °C'de saklanır. Saklama süresi iki haftayı geçmemelidir. Antibiyotik ilave edileceği zaman, son konsantrasyonlar dikkate alınarak besiyeri sıcaklığı yaklaşık 48 °C'ye geldiğinde ilave edilir ve zaman geçirmeden petri kutularına paylaştırılır. Plakların üzerine ilgili bilgiler yazılarak etiketlenir.



## EK 2: Vektör ve plazmit sekansları

### 1. ELAM-1 promotor sekansı

GGAGTGCTCTCTTTACTCGCTTACAGACTAGGCAAGCAGTTAAGTTTGTGAACTCTCTTGTGGTGGTCAT  
GTCCTTGGTGTCAAGTATGGGCCAGGTGTTCTTGTGTCAGTTCTGTTGATACGATTCAGCCGAATCTC  
TTCACCACAATTCTTCAGCGTTTTTGGATTCCCAATCTCAAGTTGATCAAAGGTTCTCTTG

### 2. IDO1 kodlayan sekans İnsan indolamine 2,3-dioksijenaz (1201 bç)

1 ATGGCACACG CTATGGAAAA CTCCTGGACA ATCAGTAAAG AGTACCATAT TGATGAAGAA  
61 GTGGGCTTTG CTCTGCCAAA TCCACAGGAA AATCTACCTG ATTTTATAA TGACTGGATG  
121 TTCATTGCTA AACATCTGCC TGATCTCATA GAGTCTGGCC AGCTTCGAGA AAGAGTTGAG  
181 AAGTTAAACA TGCTCAGCAT TGATCATCTC ACAGACCACA AGTCACAGCG CTTGCACGT  
241 CTAGTCTGG GATGCATCAC CATGGCATAT GTGTGGGGCA AAGTCATGG AGATGTCCGT  
301 AAGGTCTTGC CAAGAAATAT TGCTGTTCCCT TACTGCCAAC TCTCCAAGAA ACTGGAAGT  
361 CCTCCTATTT TGGTTTATGC AGACTGTGTC TTGGCAAAC GGAAGAAAA GGATCCTAAT  
421 AAGCCCCTGA CTTATGAGAA CATGGACGTT TTGTTCTCAT TTCGTGATGG AGACTGCAGT  
481 AAAGGATTCT TCCTGGTCTC TCTATTGGTG GAAATAGCAG CTGCTTCTGC AATCAAAGTA  
541 ATTCTACTG TATTCAAGGC AATGCAAATG CAAGAACGGG AACTTTGCT AAAGGCGCTG  
601 TTGAAAATAG CTTCTTGCTT GGAGAAAGCC CTTCAAGTGT TTCACCAAAT CCACGATCAT  
661 GTGAACCCAA AAGCATTTTT CAGTGTCTT CGCATATATT TGCTGGCTG GAAAGGCAAC  
721 CCCCAGCTAT CAGACGGTCT GGTGTATGAA GGGTTCTGGG AAGACCCAAA GGAGTTTGCA  
781 GGGGGCAGTG CAGGCCAAAG CAGCGTCTTT CAGTGTCTT ACCTCTGCT GGGCATCCAG  
841 CAGACTGCTG GTGGAGGACA TGCTGCTCAG TTCCTCCAGG ACATGAGAAG ATATATGCCA  
901 CCAGCTCACA GAACTTCCCT GTGCTCATA GAGTCAAATC CCTCAGTCCG TGAGTTTGT  
961 CTTTCAAAG GTGATGCTGG CTTGCGGGAA GCTTATGACG CCTGTGTGAA AGCTCTGGTC  
1021 TCCCTGAGGA GCTACCATCT GCAAATCGTG ACTAAGTACA TCCTGATTCC TGCAAGCCAG  
1081 CAGCCAAAG AGAATAAGAC CTCTGAAGAC CCTTCAAAC TGGAGCCAA AGGAACTGGA  
1141 GGCAGTATT TAATGAATTT CCTGAAGACT GTAAGAAGTA CAACTGAGAA ATCCCTTTG  
1201 AAGGAAGTT AA

### 3. pCMV/hygro vektör sekansı

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG  
61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG  
121 CGAGCAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC  
181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT  
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCATATA  
301 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC  
361 CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC  
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAACGCCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT  
481 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT  
541 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTAATTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA  
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGTTTTG  
661 ACTCACGGGG ATTTCAAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC  
721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTGCGT ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG  
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA  
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCATATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGG  
901 CCGCCACCAA GCTAAACCCG CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTT CCAGCCATCT  
961 GTTGTGTTGCC CCTCCCCGT GCCTTCTT ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGCTCTT  
1021 TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATT CATTCTGGGG  
1081 GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG  
1141 GATGCGGTGG GCTCTATGGC TTCTGAGGCG GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT  
1201 CCCCACGCGC CCTGTAGCGG CGCATTAAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG

1261 ACCGCTACAC TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTCTC  
1321 GCCACGTTTCG CCGGCTTTC CCGTCAAGCT CTAATCGGG GGCTCCCTTT AGGGTTCCGA  
1381 TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCAAA AAACCTTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT  
1441 GGGCCATCGC CCGTATAGAC GGTTTTTTCG CTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT  
1501 AGTGGACTCT TGTCCAAAC TGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTGAT  
1561 TTATAAGGGA TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAA  
1621 TTTAACGCGA ATTAATTCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGAAAG TCCCCAGGCT  
1681 CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC AGGTGTGGAA  
1741 AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA  
1801 CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCCATCC CGCCCCTAAC TCCGCCAGT TCCGCCATT  
1861 CTCCGCCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC GCCTTGCCCT  
1921 CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCAAAAAGC  
1981 TCCCCGGAGC TTGTATATCC ATTTTCGGAT CTGATCAGCA CGTGATGAAA AAGCCTGAAC  
2041 TCACCGCGAC GTCTGTGCGAG AAGTTTCTGA TCGAAAAGTT CGACAGCGTC TCCGACCTGA  
2101 TGCAGCTCTC GGAGGGCGAA GAATCTCGTG CTTTCAGCTT CGATGTAGGA GGGCGTGGAT  
2161 ATGTCCTGCG GGTAATAGC TGCGCCGATG GTTTCTACAA AGATCGTTAT GTTTATCGGC  
2221 ACTTTGCATC GGCCGCGCTC CCGATTCCGG AAGTGCTTGA CATTGGGGAA TTCAGCGAGA  
2281 GCCTGACCTA TTGCATCTCC CGCCGTGCAC AGGGTGTAC GTTCAAGAC CTGCCTGAAA  
2341 CCGAAGTCC CGCTGTTCTG CAGCGGTCG CGGAGGCCAT GGATGCATG GCTCGGCGCG  
2401 ATCTTAGCCA GACGAGCGGG TTCGGCCCAT TCGGACCGCA AGGAATCGGT CAATACACTA  
2461 CATGGCGTGA TTTCATATGC GCGATTGCTG ATCCCCATGT GTATCACTGG CAAACTGTGA  
2521 TGGACGACAC CGTCAGTGCG TCCGTCGCGC AGGCTCTCGA TGAGCTGATG CTTTGGGCCG  
2581 AGGACTGCCC CGAAGTCCGG CACCTCGTGC ACGCGGATT CGGCTCCAAC AATGCTCTGA  
2641 CGGACAATGG CCGCATAACA GCGGTCATTG ACTGGAGCGA GGCGATGTT GGGGATTCCC  
2701 AATACGAGGT CGCCAACATC TTCTTCTGGA GGCCGTGGTT GGCTTGTATG GAGCAGCAGA  
2761 CGCGTACTT CGAGCGGAGG CATCCGGAGC TTGCAGGATC GCCGCGGCTC CGGGCGTATA  
2821 TGCTCCGCAT TGGTCTTGAC CAACTCTATC AGAGCTTGGT TGACGGCAAT TTCGATGATG  
2881 CAGCTTGGGC GCAGGGTCGA TGCAGCGCAA TCGTCCGATC CGGAGCCGGG ACTGTGCGGC  
2941 GTACACAAAT CGCCCGCAGA AGCGCGGCCG TCTGGACCGA TGGCTGTGTA GAAGTACTCG  
3001 CCGATAGTGG AAACCGACGC CCCAGCACTC GTCCGAGGGC AAAGGAATAG CACGTGCTAC  
3061 GAGATTTTGA TTCCACCGCC GCCTTCTATG AAAGGTTGGG CTTCGGAATC GTTTTCCGGG  
3121 ACGCCGGCTG GATGATCCTC CAGCGCGGGG ATCTCATGCT GGAGTTCTT CCCCACCCA  
3181 ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATACA AATTTACAAA  
3241 AATAAAGCAT TTTTCACTG CATTCTATG TTGGTTTGT CAAACTCATC AATGATCTT  
3301 ATCATGTCTG TATACCGTCG ACCTCTAGCT AGAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT  
3361 TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACA TTCCACACA CATAAGAGCC GGAAGCATAA  
3421 AGTGTAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC  
3481 TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCTG GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACCGC  
3541 CGGGGAGAGG CGGTTTTCGT ATTGGGCGCT CTTCCGCTT CTCGCTCACT GACTCGCTGC  
3601 GCTCGTCTG TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGCGGTA ATACGGTTAT  
3661 CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCGAG CAAAAGGCCA  
3721 GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC  
3781 ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC  
3841 AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG  
3901 GATACCTGTC CGCCTTCTC CTTTCGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA  
3961 GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG  
4021 TTCAGCCCCA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGTAAAGC  
4081 ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCAACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG  
4141 GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACACGCT CTACACTAGA AGAACAGTAT  
4201 TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT  
4261 CCGGCAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA  
4321 GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGA  
4381 ACGAAAACTC ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA  
4441 TCCTTTTAAA TTAATAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTGGT  
4501 CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTAGG CACCTATCTC AGCATCTGT CTATTTCTGT  
4561 CATCCATAGT TGCCGACTC CCCGCTGTG AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT  
4621 CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG  
4681 CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCCT  
4741 CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT  
4801 TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTG ACGCTCGTCT TTTGGTATGG  
4861 CTTCACTCAG CTCCGGTTC CAACGATCAA GGCGAGTTAC ATGATCCCCC ATGTTGTGCA  
4921 AAAAAAGCGT TAGCTCCTTC GCCTCTCCA TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAAGT  
4981 TATCACTCAT GGTATGGCA GCACTGCATA ATTCTCTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGT  
5041 GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC

5101 CGAGTTGCTC TTGCCCGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACTTTAA  
 5161 AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GGCGAAAACT CTCAAGGATC TTACCGCTGT  
 5221 TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG CACCCAACCTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT  
 5281 TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA  
 5341 GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATT  
 5401 ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA  
 5461 TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAAG TGCCACCTGA CGTC

#### 4. pCMV/ $\beta$ galaktosidaz plazmit sekansı

gaattcagacttgcctgcaggtcgttacataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgaccccc  
 cccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatt  
 tacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaa  
 tggcccgctggcattatgccagttacatgaccttattgggactttcctacttggcagttacatctacgtattagtcacgc  
 tattaccatggtgatgcggtttggcagttacatcaatggcgctggatagcgggttgactcacggggattccaagtccc  
 accccattgacgtcaatgggagttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgcccc  
 ttgacgcaaatggcggttagcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctg  
 gagacgccatccacgtgtttgacctcatagaagacaccgggaccgatccagcctccggactctagaggatccgggtac  
 tcgaggaactgaaaaaccagaaagttactgtaagtttagctttttgtcttttatttcaggtcccggatccgggtggtg  
 gtgcaaatcaagaactgctcctcagtggtgttgccttacttctaggcctgtacggaagtgtacttctgctctaaaa  
 gctgcgggaattgtaccgcccgcgaattcccggggatcgaagagcctgctaaagcaaaaaagaagtcaccatgctggt  
 tactttgaccaacaagaactgattttcgttccggctctgggagcattggctggtgacaccagcaaggagctgctcaagc  
 gcgatcccgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccacaacttaategccttgcagcacatccccct  
 ttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcg  
 ctttgctggtttccggcaccagaagcgggtccggaaagctggctggagtgcgatcttctgaggccgatactgctgctg  
 tcccctcaactggcagatgcacggttacgatgcgccatctacaccaacgtaacctatcccattacggatcaatccgccc  
 tttgtcccacggagaatccgacgggtgttactcgtcacatttaattgtgatgaaagctggctacaggaaggccagac  
 gcgaattattttgatggcgttaactcggcgtttcatctgtggtgcaacggcgctgggtcgggttacggccaggacagtc  
 gtttccgtctgaattgacctgagcgcattttacgcgccggagaaaaccgcctcgcgggtgatggtgctgcttggagt  
 gacggcagttatctggaagatcaggatgtggcggatgagcggcattttccgtgacgtctcgttgcataaaccgac  
 tacacaaatcagcgaattcattgttccactcgtttaatgatgatttcagccgcgctgtactggaggctgaagttcaga  
 tgtgcggcgagttgctgactacctacgggtaacagtttctttatggcagggtgaaacgcaggtgccagcggcaccgcg  
 ctttcggcggtgaaattatcgtatgagcgtggtggtatgccgatcgcgtcacactacgtctgaacgtcgaaaaccgaa  
 actgtggagcggcgaatcccgaatctctatcgtcgggtggtgactgcacaccggcagggcacgctgattgaagcag  
 aagcctgcgatgctggtttccgcgaggtgcggattgaaatggtctgctgctgctgacggcaagccgttgcgtattcga  
 ggcgttaaccgtcacgagcatcctctgcatggtcaggtcatggatgagcagacgatggtgcaggatcctgctgat  
 gaagcagaacaactttaacgccgtgcgctgttcgcaattatccgaacctccgctgtggtacacgctgtgcgaccgctacg  
 gcctgtatgtggtgatgaagccaatattgaaaccacggcatggtgccaatgaatcgtctgaccgatgatccgcgctgg  
 ctaccggcgatgagcgaacgcgtaacgcgaatggtgcagcgcgatcgaatccccgaggtgatcatctggtcgtggg  
 gaatgaatcaggccacggcgtaatacagcgcgctgtatcgtggtatcaaatctgtcgtatcctcccggcggtgcagt  
 atgaaggcggcgagccgacaccacggccaccgatattttgccgatgtacgcgcgctggatgaagaccagcccttc  
 ccggctgtccgaaatggtccatcaaaaaatgctttcgtacctggagagacgcgccgctgatctttgcaatacgc  
 ccacgcgatgggtaacagcttggcggtttcgtataataatggcagggcgtttcgtcagtatccccgtttacagggcggt  
 tctgtctgggactgggtgatcagtcgctgattaatatgatgaaacggcaaccctggtcggcttacggcggtgatttt  
 ggcgatacggcaacgatcggcagttctgtatgaacggtctggtctttgccgaccgcacggcctaccagcgtgacgga  
 agcaaacaccagcagcagttttccagttccgtttatccgggcaaacatcgaagtaccagcgaatacctgttccgctc  
 atagcgataacgagctcctgactggatggtggcgtggatggtaagccgctggcaagcggtaagtgccctctggatgctc  
 gctccacaaggtaaacagttgattgaactgctgaactaccgcaaccggagagcggcggaactctggctcacagctacg

cgtagtgaaccgaacgcgaccgcatggtcagaagccgggcacatcagcgcctggcagcagtgccgtctggcgaaaac  
ctcagtgtgacgtccccgccgctcccacgccatcccgcactgaccaccagcgaaatggattttgcatcgagctgggt  
aataagcgttgcaatttaaccgccagtcaggctttttcacagatgtggattggcgataaaaaacaactgctgacgcc  
gctgcgcatcagttcacccgtgcaccgctggataacgacattggcgtaagtgaagcgaccgcattgaccctaacgct  
gggtcgaacgctggaagcgcgggccattaccaggccgaagcagcgttggcagtgacggcagatacacttgctgat  
gcggtgctgattacgaccgctcacgcgtggcagcatcaggggaaaaccttattatcagccggaaaacctaccggattga  
tgtagtggtcaaatggcgattaccgttgatgtgaagtggcgagcgatacaccgcatccggcgaggattggcctgaact  
gccagctggcgaggtagcagagcgggtaaacggctcgattaggggccgaagaaaactatcccaccgccttactgcc  
gcctgtttgaccgctgggatctgccattgacagatgtataccccgtacgtctcccagcgaaaacggctgcgctg  
cgggacgcgcgaattgaattatggcccacaccagtgccgcggcgacttccagttcaacatcagccgctacagtcacacg  
aactgatggaaccagccatgccatctgctgacgcggaagaaggcacatggctgaatatcagcggttccatagggg  
attggtggcgacgactcctggagcccgtcagatcggcggaattacagctgagcggcggctgctaccattaccagtgtg  
ctggtgcaaaaataataaaccgggcaggccatgtctgccgtatttcgcgtaaggaaatccattatgtactattaa  
aaaacacaacttttgatgtcggtttattctttttactttttatcatgggagcctacttcccgttttcccg  
atgtgctacatgacatcaaccatcagcaaaagtatacgggtattttttgccgctatttctctgttctcgtatt  
attcaaccgctgtttggctgctttctgacaaactggcctcactctaggcggccgcggggatccagacatgataaga  
tacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgc  
ttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggg  
aggtgtgggaggtttttcggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgaatcatggctatagctgttt  
cctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagccgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtccta  
atgagtgagtaactacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgctgagcagctgact  
aatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgctattggcgctcttccgcttctcgtcactgactgctgcgc  
tcgctgctcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaggcggtatacggttatccacagaatcaggggataacgc  
aggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggcgttttccataggc  
tccgccccctgacgagcatcaaaaaatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaccggacaggactataaagataccag  
gcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctcctgttccgacctgccgcttaccggatactgtccgcttctccc  
ttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcctcaagctgggct  
gtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgcttaccggtaactatcgtcttgagccaacccggtaagacac  
gacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagtcttga  
gtggtggcctaactacggctacactagaaggacagatttggatctgcgctctgctgaagccagttacctcggaaaa  
gagttgtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctgtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgc  
agaaaaaaggatcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagg  
gattttggtcatgagattatcaaaaaggatctcactagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaa  
gtatatatgagtaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagctgctctatttctg  
tcatcatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctgccccagtgctgcaat  
gataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagt  
gtcctgcaactttatccgctccatccagcttataattgttccgggaagctagagtaagtagttccagttaatagt  
ttgcgcaacgttggccattgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcgtttggtatggcttaccagctccgggtc  
ccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctcctcggctcccgatcgttga  
gaagtaagttggccgagtgattatcactcatggtatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaaga  
tgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttcccggc  
gtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaac  
tctcaaggatcttaccgctgttgatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttact  
ttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtg  
aatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgaat  
gtatttagaaaaataaacaataagggggtccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattat  
atcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacaggcccttctgctcgcgcgttccgggtgatgacggtgaaaacct  
ctgacacatgcagctccgggagacgggtcacagctgtctgtaagcggatccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgt

cagcgggtgttggcgggtgctgggctggcttaactatcgccatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagcgg  
tgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcacagcagcattcgccattcagcctgcgcaactgttggga  
agggcgcagcggcggcctctcgtattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagtgggtaa  
cgccaggggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagt

## 5. pCAT/kontrol plazmiti

tcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggat  
gccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgctggggctgcttaactatcgccatcaga  
gcagattgtactgagagtgcaccatagcgggtgtaaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcacagcgc  
attcgccattcagcctgcgcaactgttgggaagggcgcagcggcctctcgtattacgccagcctggcgaaaggg  
ggatgtgctgcaaggcgattaagtgggtaacgccaggggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgaatt  
ccagatctgcatctcaattagtcgcaacctatgcccgccctaactccgccatcccgccctaactccgccagttc  
cgcccattctccgcccatggctgactaattttttatgacagaggccgagccgctcggcctctgagctattcc  
agaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcctttgcaaaaagcctggcgagatttcaggagctaaaggaagctaa  
aatggagaaaaaatcactggatataaccaccgttgatatacccattggcctgtaaaagacattttgagcatttcagt  
cagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggccttttaagaccgtaaaagaaaataagcac  
aagttttaccggcctttattcacattctgccgctgatgaatgctcaccggaattccgtatggcaatgaaagacgg  
tgagctggtgatagggatagtggtcaccctgttacaccgtttccatgagcaaacgtaaacgtttcatcgctctgga  
gtgaataccacgacgattccggcagtttctacacatattcgaagatgtggcgtgttacgggtgaaaacctggcctat  
ttccctaaaggggtttattgagaatattttctcagccaatccctgggtgagttcaccagtttgatttaaacgt  
ggccaatatggacaactcttcgccccgtttccatgggcaaatattatacgaaggcgacaaggctgatgccgc  
tggcgattcaggtcatcatgccgtctgtgatggcctccatgctggcagaatgcttaatgaattacaacagtactcgat  
gagtggcagggcggggcgtaatttttaaggcagttattggtgccctaaacgcctggtgctacgctgaataagtgat  
aataagcggatgaatggcagaaattcggcgatctttgtgaaggaaaccttactctgtggtgtgacataattggacaaac  
tacctacagagattaaagctctaaggtaaatataaaatttttaagtgtataatgtttaactactgattctaattgtt  
tgtgatttttagattccaacctatggaactgatgaatgggagcagtggtggaatgccttaatgaggaaaacctgtttg  
ctcagaagaaatgccatctagtatgatgaggctactgctgactcacaactctactctccaaaaagaagagaaggg  
tagaagacccaaggacttccctcagaattgctaagttttgagtcacgtgtgtttagtaataactctgtctgctg  
ttgtattttaccacaaaaggaaaagctgactgctatacaagaaaattatgaaaaatattctgtaacctttataag  
taggcataacagttataatcatacactgtttttctactccacacagcagcagatgctgctgctattaataactatg  
ctcaaaaattgtgtaccttttagcttttaattgtaaaggggttaataaggaatattgatgtatagtccttgactaga  
gatcataatcagccataccacattgtagaggtttactgctttaaaaaacctcccacacctcccctgaacctgaaac  
ataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgcacttataatggttacaataaagcaatagcatcaaat  
ttcaaaaataaagcatttttactgcattctagtgtggtttgtccaaactcaatgtatcttatcatgtctggat  
ctgaacctggagcggagaatgggcggaactgggcggagtaggggcgggatgggcggagtaggggcgggactatggt  
tgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctggtgctgacta  
attgagatgcatgctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctaaactgacacacattccaca  
gcagatcctctagagtcgacctgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
tccgctcacaatccacacaacatacagccggaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
cattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgc  
gcgggggagagcgggtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgtcactgactgctgctgctgctgctgctgctgctg  
gcgagcgggtatcagctcactcaagggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgag  
caaaagggcagcaaaagggcaggaaccgtaaaaagggcgcgttgcgtggcgttttccataggctccgccccctgacgag  
catcaaaaaatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagcgtttccccctggaag  
ctccctcgtgctcctctgtccgacctgccgctaccggataactgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgc  
tttctcaatgctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcaagctgggctgtgtgcacgaaccccc  
gttcagcccagcctgctgccttatccgtaactatgctttagtccaaccggtaagacacgacttatccactggc



agcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcgggtgctaagagttcttgaagtggggcctaactacgg  
ctacactagaaggacagtatttggatctgcgctctgctgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgat  
ccggcaaaacaaccaccgctggtagcgggtggttttttggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatcctcaag  
aagatcctttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggcatgagatta  
tcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaactg  
gtctgacagttaccaatgctaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctattcgttcacatagttgcctgac  
tccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggcccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgc  
tcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgc  
ctccatccagtctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagtaaatagttgcaaacgttggcca  
ttgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcgtttggtatggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcgagtt  
acatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggttagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtt  
gttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtactgggt  
agtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccgctcaatacgggataatacc  
gcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaactcctcaaggatcttaccgct  
gttgagatccagttc gatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggt  
gagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcactactctcctt  
ttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaca  
aataggggtccgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctata  
aaaatagcgtatcacgaggcccttctcgtc

## 6. pCAT/ELAM-1pro plazmit sekansı

Plazmit dizaynı Prof. Dr. H. Barbaros ORAL tarafından tasarlanmıştır. Bkz. Kaynakça  
(Oral H B. 1997).

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: MEHMET KARAÇAY
Doğum Yeri ve Tarihi	: ANTAKYA, 1989
Yabancı Dili	: İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	
Lise	: Necmi Asfuroğlu Lisesi(YDA) /2004-2007
Lisans	: Uludağ Üni. F.E.F. Biyoloji B. / 2009-2013
Yüksek Lisans	: U.Ü. F.B.E. Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D Moleküler Genetik B.D /2014-2017
İletişim (e-posta)	: mehmetkrcy@gmail.com
Yayınları	: <b>Karaçay, M., Barazi, A.Ö., Pashazadeh, M., Güvenç, F., Ersoy, F., Oral H.B. 2015.</b> Expression of indoleamine-2,3-dioxygenase only during inflammation state: Initial study to develop novel strategy for the treatment of rheumatoid arthritis, 4 th European Congress of Immunology, 6-9 Eylül, 2015, Viyana, Avusturya.
Burslar	: TÜBĞTAK Araştırma Projesi Yüksek Lisans Öğrenci Bursu, <i>SRP72</i> ve <i>CAS</i> Genlerinin Arpa Homologlarının Arpada Külleme Hastalığına Karşı Dirençlilikte Fonksiyonlarının Belirlenmesi, Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY, 110T984, 2014-2015  : TÜBĞTAK Araştırma Projesi Yüksek Lisans Öğrenci Bursu, Fare Artrit Modellerinde Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Toleran Dendritik Hücrelerle Artrit Tedavisi Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. H. Barbaros ORAL 114S354, 2015-2016