

**Proteomik Yaklaşım: Bakteriyel Isı Şoku Proteini
GroEL'e Cevaben T Lenfosit Sitokin
Profillerinin Çıkarılması**

Proje No: 106T417

Yrd.Doç.Dr. Ayten NALBANT

Prof.Dr. Günnur EMİNGİL

OCAK 2009
İZMİR

ÖNSÖZ

Diş eti hastalıkları (gingivitis, periodontal hastalıklar) kronik enfeksiyon hastalıkları olup hem ülkemizde hemde dünyada yaygın olarak görülmektedir. Diş eti hastalıklarının patolojisinde birden fazla bakteri rol oynamaktadır. Diş eti hastalıklarının patolojisinde patojen varlığının yanında host tarafından patojene karşı oluşturulan yıkıcı ve/veya baskılayıcı immun yanıtta patolojide rol oynamaktadır (SEYMOUR 2007). Dolayısıyla, ağızda yaşayan bir bakteri olan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* tarafından üretilen GroEL proteininin enflamasyondaki rolünün bir bakteri spesifik virulans faktör olarak patolojiye katkısının bilinmesi gereklidir.

Bu projede *A. actinomycetemcomitans* model patojen olarak seçilmiştir. Gram negatif, anaerobik olan bu bakterinin LTX, CDT gibi birden fazla virulans faktörü tanımlanmıştır. *A. actinomycetemcomitans* tarafından üretilen ve ısı şoku proteinleri ailesinden olan GroEL (AaGroEL) proteininin periodontal hastalıkların patoloji açısından T hücreleri üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Son iki yıl içinde TÜBİTAK tarafından desteklenen ve grubumuzun yaptığı deneysel çalışmalar AaGroEL proteininin T hücreleri üzerinde antijenik etkisinin olduğu, bu etkinin CD4+T hücrelerini hedef olarak seçtiği, CD4+ T hücrelerinin CD25 ve CD69 gibi aktivasyon markörlerini ekspres ettiklerini, sitokin profillerine göre CD4+T hücrelerinin Th1 fenotipine polarize olduklarını göstermektedir. Ayrıca, elde edilen veriler AaGroEL proteininin T hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin apoptoz aracılığı ile oluştuğunu ve bu apoptotik etkinin aktivasyonu takiben seçici olarak belirli T hücre altgruplarında olabileceğini ortaya koymuştur.

Bakteriyel ısı şoku proteinleri farklı mikroorganizmalarda ve aynı zamanda da ökoryotik ısı şoku proteinleri ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir (STEWART ve YOUNG, 2004). Bu nedenle enfeksiyon hastalıkları, otoimmün hastalıklar gibi patolojilerde önemli bir role sahip olabileceği ileri sürülmektedir. Aynı zamanda kronik enfeksiyon hastalıklarının değişik kanser türlerine olan duyarlılığı arttırmasının da son zamanlarda deneysel olarak da gösterilmesi (MICHAUD *ve ark.*, 2008; MEİRA *ve ark.*, 2008; SANDHU 2008) ile ısı şoku proteinlerinin kronik enflamasyonda oynadıkları rolün ortaya çıkarılması önemlidir.

İÇİNDEKİLER

Özet (Türkçe)	9
Özet (İngilizce)	10
Giriş.....	11
Genel Bilgiler.....	11
Gereç ve Yöntem	15
Bakteri Kültürü	15
AaGroEL Proteinin ATP Affinite Kromatografi ile Purifikasyonu	15
AaGroEL Proteinin Elektroelute Edilmesi.....	16
AaGroEL Proteinin Karakterizasyonu ve Western Blot ile Doğrulanması	16
PCR ile Gen Bölgesinin Çoğaltılması	16
TA Klonlanması	17
Ekspresyon Vektörüne Klonlama	17
Rekombinant Protein Ekspresyonunun İndüklenmesi	17
Rekombinant Protein Saflaştırılması	17
LPS Tayin Deneyi	18
Periferik Kandan Beyaz Kan Hücrelerinin (PBMC) İzolasyonu	18
Hücre Kültürü	18
Apoptozun Annexin V ve 7AAD ile Ölçülmesi	18
T Hücre Apoptozunun Aktif-Kaspaz-3 ile Ölçülmesi	19
T Hücre Apoptozunun DNA Fragmentasyon ile Ölçülmesi	19
T Hücre Aktivasyonun Farklı T Hücre Altgruplarında tayini.....	19
T Hücre Sitokinlerinin Hücre İçi Sitokin Boyama Metodu ile Tespiti	20
CBA Tekniği ile Hücre Süpernatantlarının Sitokin Profillerine Bakılması.....	20
Regülatör T Hücrelerinin Tespiti Amacıyla CD4, CD25 ve Foxp3 İşaretlemesi	20
T Hücrelerinin TLR-2 ve TLR-4 Ekspresyonlarının Ölçülmesi.....	21
Bulgular	21
A. <i>A.Actinomycescomitans</i> GroEL Proteininin İzolasyonu, Purifikasyonu ve Doğrulanması	21

A1. AaCE Hazırlanışı ve Fonksiyonun Ölçülmesi	21
A2. AaGroEL Proteininin ATP Affinite Kromatografi ile Purifikasyonu	23
A3.ATP Affinite Kromatografiden Elde Edilen AaGroEL İçeren Fraksiyondan Elektroelution ile AaGroEL'in Purifikasyonu	24
A4.AaGroEL Proteininin Doğrulanması	25
A4a. AaGroEL Proteininin Western Blot ile Doğrulanması	25
A4b.AaGroEL Proteininin Kütle Spektrometresi ile Doğrulanması	25
B. Rekombinant <i>A.actinomcetemcomitans</i> GroEL Proteininin Üretilmesi	25
B1.Rekombinant <i>A.actinomcetemcomitans</i> GroEL Proteininin Klonlanması ve Sentezlenmesi	25
B1a. PCR Yardımıyla <i>A.actinomcetemcomitans</i> Bakterisinin Doğrulanması	25
B1b. <i>A.actinomcetemcomitans</i> GroEL Geninin PCR ile Çoğatılması	26
B1c. <i>A.actinomcetemcomitans</i> GroEL Geninin pGEM Vektörüne Klonlanması	26
B1d. <i>A.actinomcetemcomitans</i> GroEL Geninin pET28a Vektörüne Klonlanması.....	27
B2.rAaGroEL Proteininin Western Blot ile Doğrulanması ve Protein Ekspresyon İndüksiyon Zamanının Belirlenmesi	27
B3.rAaGroEL Proteininin Saflaştırılması ve Doğrulanması.....	28
B4.LPS Tayin Deneyi	29
C. AaGroEL Proteininin T Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Araştırılması.....	30
C1.T Hücre Apoptozunun Annexin V ve 7AAD ile Ölçülmesi.....	30
C2.T Hücre Apoptozunun Aktif-kaspaz 3 ile Ölçülmesi	37
C3.T Hücre Apoptozunun DNA Fragmantasyon ile Ölçülmesi	39
D. AaGroEL Proteinine Yanıt Oluşturan T Hücre Fenotipinin Belirlenmesi....	40

D1.T Hücre Altgruplarının ve Aktivasyon Markörlerinin Belirlenmesi	40
D2.Regülatör T Hücre Fenotipinin Belirlenmesi	43
D3.T Hücrelerinin TLR-2 ve TLR-4 Ekspresyonlarının Ölçülmesi	43
D4.rAaGroEL Proteininin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Ölçülmesi ..	45
E. AaGroEL proteinine yanıt olarak ekspres Edilen Sitokinlerin Tayini	45
E1.Cytometric Bead Assay (CBA) Tekniği ile Hücre Süpernatantlarının Sitokin Profiline Bakılması.....	45
E2.T Hücre Sitokinlerinin Hücre İçi Sitokin Boyama Metodu ile Tespiti	48
Tartışma/Sonuç	58
Referanslar	63
Tablolar	67
Proje Özet Bilgi Formu.....	75

ŞEKİL VE TABLO LİSTELERİ

<u>Sekiller</u>	<u>Sayfa no</u>
Figür 1a. AaCE SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü	22
Figür 1b. AaCE'in western blot görüntüsü.....	22
Figür 2. AaCE fraksiyonunun Jurkat T hücreleri üzerinde doza bağlı apoptotik etkisi.....	23
Figür 3a. ATP Affinite kromatografi fraksiyonlarının SDS jel görüntüsü.....	24
Figür 3b. ATP Affinite kromatografi fraksiyonlarının western blot görüntüsü	24
Figür 4. Elektroelüsyon ile elde edilen AaGroEL proteinin (EE-AaGroEL) SDS jel görüntüsü	24
Figür 5. EE-AaGroEL proteinin western blot ile doğrulanması.....	25
Figür 6. <i>A.actinomycetemcomitans</i> bakterisinin 2 farklı primer kullanılarak PCR ile doğrulanması ve GroEL geninin PCR ile çoğaltılması	26
Figür 7. Bakteri doğrulanması yapıldıktan sonra GroEL geninin PCR ile çoğaltılması	26
Figür 8. Klonlama vektörü olan pGEM içerisine AaGroEL geninin klonlandığını gösteren jel sonucu	27
Figür 9. Ekspresyon vektörü olan pET28a içerisine AaGroEL geninin klonlandığını gösteren jel sonucu	27
Figür 10a. 1Mm IPTG kullanılarak indüklenen protein ekspresyonunun zamana bağlı artışı	28
Figür 10b. rAaGroEL proteininin western blot yöntemi ile doğrulanması	28

Figür 11.	Metal affinite yöntemi kullanılarak 6x His tag içeren rAaGroEL proteininin hücre lizatından saflaştırılması	29
Figür 12.	LPS tayini	29
Figür 13a.	EE-AaGroEL proteinin PBMC hücreleri üzerindeki doza bağlı apoptotik etkisi.....	30
Figür 13b.	AaGroEL dozuna bağlı lenfosit apoptozunun akım sitometri datası	31
Figür 14a.	EE-AaGroEL proteinin zamana bağlı lenfosit apoptozu	32
Figür 14b.	EE-AaGroEL proteinin lenfositler üzerindeki zamana bağlı apoptoz etkisinin akım sitometri datası.....	33
Figür 15.	EE-AaGroEL proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki doza bağlı apoptotik etkisi.....	34
Figür 16.	EE-AaGroEL proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki doz ve zamana bağlı apoptotik etkisi.....	34-35
Figür 17.	EE-AaGroEL, <i>E.coli</i> -rGroEL ve BSA proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.....	36
Figür 18a.	EE-AaGroEL, <i>E.coli</i> -rGroEL proteinlerinin Jurkat T hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.....	36
Figür 18b.	Farklı proteinlerin Jurkat T hücrelerindeki apoptozunun akım sitometri datası	37
Figür 19a.	AaGroEL proteinin T hücrelerindeki apoptozunun Aktif-Kaspaz-3 miktarı ile ölçülmesi	38
Figür 19b.	AaGroEL'in T hücre apoptozunun Aktif-Kaspaz-3 ile ölçümünün akım sitometri datası	38

Figür 20a.	AaGroEL proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki etkisinin Aktif-Kaspaz-3 ile ölçülmesi.....	39
Figür 20b.	Jurkat T hücrelerinde AaGroEL antijenine bağımlı Aktif-Kaspaz-3 miktarını gösteren akım sitometri datası.....	39
Figür 21.	DNA fragmantasyonun agaroz jel görüntüsü	40
Figür 22.	CD4 ⁺ T hücrelerinde CD25 ve CD69 ekspresyonu	40
Figür 23.	CD8 ⁺ T hücrelerinde CD25 ve CD69 ekspresyonu	41
Figür 24.	rAaGroEL proteinine yanıt oluşturan CD4 ⁺ T hücre altgrupları (24 Saat)	42
Figür 25.	rAaGroEL proteinine yanıt oluşturan CD4 ⁺ T hücre altgrupları (48 Saat)	42
Figür 25a.	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T hücrelerinin dot blot görüntüleri.....	43
Figür 26.	Lenfositlerin TLR2 Ekspresyonu	44
Figür 27.	Lenfositlerin TLR4 Ekspresyonu.....	44
Figür 28.	Hücre döngüsü değişimlerinin akış sitometrisi sonuçları	45
Figür 29.	rAaGroEL ile indüklenmiş sitokin ekspresyonunun zamana bağlı değişimi.....	46
Figür 30.	rAaGroEL ile indüklenmiş sitokin salınımının zamana bağlı değişimi	47
Figür 31.	Hücre içi sitokin boyaması ile IFN γ tespiti.....	49
Figür 32.	Hücre içi sitokin boyaması ile IL-2 tespiti.....	50
Figür 33.	Hücre içi sitokin boyaması ile IL-4 tespiti.....	51
Figür 34.	Hücre içi sitokin boyaması ile IL-10 tespiti.....	52

Figür 35.	Hücre içi sitokin boyaması ile IL-17 tespiti.....	53
Figür 36.	Hücre içi sitokin boyaması ile TNF α tespiti	54
Figür 37.	Hücre içi sitokin boyaması ile TGF- β tespiti.....	55
Figür 38.	Lenfosit haricindeki lökositlerin IFN γ üretimini gösteren data	56
Figür 39.	Lenfosit haricindeki lökositlerin IL-10 üretimini gösteren data	56
Figür 40.	Lenfosit haricindeki lökositlerin IL-17 üretimini gösteren data	57
Figür 41.	Lenfosit haricindeki lökositlerin TGF- β üretimini gösteren data	57
Figür 42.	Lenfosit haricindeki lökositlerin TNF- α üretimini gösteren data	58
Figür 43.	AaGroEL tarafından indüklenen immun yanıt modeli	62

Tablolar

Tablo 1.	EE-AaGroEL proteinin kütle spektrometresi ile doğrulanması	68
Tablo 2.	rAaGroEL proteinin kütle spektrometresi ile doğrulanması	69
Tablo 3.	<i>A.actinomycescomitans</i> bakterisinin rekombinant AaGroEL proteininin Sekans sonuçları	70

ÖZET

Actinobacillus (Aggregatibacter) *actinomycetemcomitans* diş eti hastalıklarının patolojisinde rol oynayan bakteridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar AaGroEL proteininin periodontal hastalıkların patolojisiyle ilişkisini düşündürmekle beraber, bu proteininin T lenfositlerini nasıl etkilediği ve AaGroEL'e karşı oluşan T lenfosit immun yanıtının profili henüz bilinmemektedir.

Proje kapsamında, AaGroEL bakteriden izole edilmiş ve rekombinant olarak üretilmiştir. Elde edilen AaGroEL proteininin etkileri periferal kanındaki naif T lenfositleri ve Jurkat T hücrelerinde araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, AaGroEL proteininin T lenfositlerini proliferere ve aktive ettikleri CD25 ve CD69 moleküllerinin ekspresyonuyla tespit edilmiştir. AaGroEL proteini CD4+T hücrelerini etkilemiş, bu hücrelerde zamana bağlı CD25 ve CD69 ekspresyonunu arttırmıştır. Ayrıca CD4+CD25+T hücrelerinin Foxp3+ olduğu da gösterilmiştir.

Aktif hale geçen CD4+T hücrelerinin ürettikleri sitokin profilleri çalışılmıştır. PBMC hücrelerinin kültür süpernatantına salgıladığı sitokinler saptanmıştır ve IL-6, IL-10, IFN γ , TNF α sitokinlerinin AaGroEL stimülasyonunu takiben üretildikleri tespit edilmiştir. Hücre içi sitokin işaretlemesinde ise bu sitokinlerin CD4+T hücrelerinden geldiği saptanırken CD8+T hücreleri ve/veya B hücreleri ile lenfosit olmayan bir popülasyonun da bu sitokokinleri sentezlediği tespit edilmiştir. Bunlara ilave olarak da IL-2'nun CD4+T hücreleri tarafından üretildiği de gösterilmiştir. Bu bulgular naif CD4+T hücrelerinin Th1 fenotipine polarize oldukları yönündedir.

AaGroEL proteinin T hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkisi de hem PBMC'ler hemde Jurkat T hücreleri üzerinde apoptoz ölçümü ile araştırılmıştır. AaGroEL proteininin T hücrelerini zamana ve doza bağlı olarak öldürdüğü ve lethal dozun 100 ng olduğu ortaya konulmuştur. T hücreleri üzerindeki apoptotik etki Aktif-kaspaz-3 ölçümü ve DNA fragmentasyonun gösterilmesiyle de desteklenmiştir.

Sonuç olarak, AaGroEL proteininin T lenfositleri üzerinde antijenik etkisi olduğu, immun yanıtı regüle edebileceği ve peridontal patolojide rol oynayacağı açıktır.

Anahtar Kelimeler:

Bakteriyel ısık şoku proteinleri, GroEL, *A.actinomycetemcomitans*, ısık şoku proteini 60, T Lenfositleri, Sitokinler, immün yanıt, immün düzenleme, kronik enflamasyon, çoklu boncuk testleri, akım sitometrisi, proteomik

ABSTRACT

Aggregatibacter actinomycetemcomitans plays important role in periodontal diseases. Recent publications suggest a role for AaGroEL protein in periodontal pathologies however, the effects of this protein on T lymphocytes and profile of T lymphocytes' immune response, are not reported yet.

In this project, AaGroEL is obtained as its native form and recombinant form. The effects of AaGroEL have been investigated on Jurkat T cells and naïve T lymphocytes from peripheral blood. To find AaGroEL responsive T cell phenotype CD4, CD8, CD25 and CD69 markers were measured. Data showed that AaGroEL targets CD4+T lymphocytes and increases CD25 and CD69 expression with time and CD4+CD25+T cells were also Foxp3+ suggesting involvement of Tregs.

To dissect CD4+T cells mediated immune response, CD4+T lymphocytes cytokines were profiled. Soluble cytokines released by PBMC in culture supernatant of AaGroEL were determined as IL-6, IL-10, IFN- γ ve TNF- α . Intracellular cytokine staining was applied to determine the cells' source of cytokines. It was found that CD4+T cells produced IL-2, IL-10, IFN γ and TNF α . Nonlymphocytes (B or/and CD8+ cells) also secrete them except IL-2. Data suggest that AaGroEL polarizes naïve CD4+T cells towards Th1 phenotype.

Moreover, AaGroEL also mediates apoptotic effects on naïve and Jurkat T cells in a time and dose dependent manner and lethal dose was 100ng. AaGroEL induced active-caspase 3 and DNA fragmentation data further confirmed the apoptotic effects of the protein. In conclusion, AaGroEL has antigenic properties that effect T lymphocytes by regulating immune response that would play important role on periodontal pathology.

Keywords:

Bacterial heat shock proteins, GroEL, *A.actinomycetemcomitans*, heat shock protein 60, T lymphocytes, cytokines, immune response, immune regulation, chronic inflammation, multiplex bead arrays, flow cytometry, proteomics

GİRİŞ

Periodontal hastalıklar bir grup hastalık olup kronik diş eti hastalıkları olarak tanımlanır ve yaygın olarak görülürler. Kısa zaman önce, araştırmalar diş eti hastalığı hikayesi olan kişilerin akciğer, böbrek, pancreas ve kan kanserlerine yakalanma riskinin yüksek olduğunu göstermiştir (MICHAUD *ve ark.*, 2008). Ayrıca, peridontal enfeksiyonlar ile kalp hastalığı, şeker ve kemik erimesi gibi kronik sistemik hastalıklar arasındaki ilişkinin varlığından bahsedilmekte ancak bu ilişkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (SEYMOUR *ve ark.*, 2007). Periodontal hastalıklar birden fazla enfeksiyöz ajanın rol oynadığı kronik enflamasyonlardır. Patojen varlığının yanında host tarafından patojene karşı oluşturulan yıkıcı ve/veya baskılayıcı immun yanıtta patolojide rol oynamaktadır. Dolayısıyla, ağızda yaşayan bir bakteri olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tarafından üretilen GroEL'nin spesifik bir virulans faktör olarak enfeksiyonel patolojiye katkısının bilinmesi önemlidir. Bu bağlamda, proje kapsamında *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ın ürettiği ısı şoku ailesine ait GroEL proteininin neden olduğu T hücre immun yanıtının moleküler mekanizması araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Periodontal hastalıklar adı verilen diş eti hastalıkları dünyada en yaygın olarak görülen kronik enflamasyonlardır. Ülkemizde yapılan ağız ve diş sağlığı taramalarında, insanlarımızın %85'inin ağız ve diş sağlığının bozuk olduğu ortaya çıkmıştır. Periodontal hastalıklar dişeti iltihabı (gingivitis) ile başlar. Tedavi edilmezse hastalık periodontitise dönüşür. Periodontitis diş destekleyici dokuların, bağ dokusunun ve kemiklerin harabiyetine ve sonuçta da diş kaybına neden olur (PAGE *ve* SCHROEDER, 1976).

Peridontal enfeksiyonlar ile kalp hastalığı, şeker ve kemik erimesi gibi kronik sistemik hastalıklar arasındaki ilişkinin varlığından bahsedilmekte ancak bu ilişkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (SEYMOUR *ve ark.*, 2007). Ancak bireylerin genetik duyarlılığı, sistemik enflamasyon ile birlikte artan sitokin ve diğer mediyatörlerin ekspresyonu, oral bakterilerin ve/veya bakteriyel ürünlerinin direk enfeksiyonu ve bakteriyel ve doku antijenleri arasındaki benzerlik ile oluşan moleküler mimikri (molecular mimicry ve/veya cross reactivity) gibi değişik hipotezler ortaya atılmaktadır. Ayrıca kısa zaman önce yayınlanan bir makalede diş eti hastalıkları ile çeşitli kanser türleri arasında da sıkı bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir (MICHAUD *ve ark.*, 2008; PARKİN DM, 2006).

Periodontal hastalıkların patolojisinde farklı mikroorganizmaların hastalıklı dokularda varlığının yanında bu mikroplara karşı oluşturulan yıkıcı ve/veya baskılayıcı immün yanıtın da rolü büyüktür. Gram negatif bir bakteri olan *Actinobacillus* (*Aggregatibacter*) *actinomycetemcomitans* (*Aa*) kronik enflamasyona neden olan ve periodontal hastalıkların patolojisinde rol oynayan en önemli patojenlerden biridir. *A. actinomycetemcomitans* gençlerde Juvenile periodontitis hastalığına neden olur (PAGE *ve* SCHROEDER, 1976). Ayrıca, *A. actinomycetemcomitans* ağız dışındaki enfeksiyonlarda da kardiyovasküler, intrakraniyal, torasik ve cilt enfeksiyonları gibi pek çok hastalıkta gözlenen patojen bir bakteridir (VAN WINKELHOFF *ve* SLOTS, 2000).

A.actinomycetemcomitans bakterisinin patolojiye nasıl neden olduğu tam olarak bilinmemekle beraber, insan hücrelerine karşı sitolitik etkileri olduğu bilinen iki toksin üretmektedir. Bunlar lökotoksin (Ltx) ve sitoletal distending toksin (CDT) dir.

Lökotoksin 116-kDa'luk por oluşturan proteinler ailesinin 'Repeats in Toxins (RTX)' üyesidir. *A.actinomycetemcomitans*'ın tüm suşları lökotoksin kodlayan genleri içerir ve bu lökotoksin ifadesi (BLANK ve SHILOH, 2007; SPITZNAGEL ve ark.,1991) çeşitlilik göstermektedir. Bakterinin ürettiği bu lökotoksin hem lenfoid hem de myeloid lökositlerin ölmesine neden olmaktadır (SCHULTZ ve HARRINGTON,2003; SEYMOUR ve ark., 2007; MANGAN ve ark.,1991; OHTA ve ark.,1993; TAICHMAN ve ark.,1980). Lökotoksinin insan T hücrelerini (MANGAN ve ark.,1991), promyelositik HL-60 hücrelerini (SCHULTZ ve HARRINGTON,2003) ve B hücrelerini (SEYMOUR ve ark., 2007) apoptoz yolu ile öldürdüğü gösterilmiştir.

CDT, *cdtABC* adı verilen üç gen kümesi tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genlerin ürünlerinin her birinin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 25-35 kDa'dır. CDT, *A.actinomycetemcomitans* (SHENKER ve ark.,1999; SHENKER ve ark.,2000; SHENKER ve ark.,2001; SUAGI ve ark.,1998;), *Haemophilus ducreyi* (KOGA ve ark.,1993), *Campylobacter jejuni* (KOGA ve ark.,1993;WHITEHOUSE ve ark.,1998), *Escherichia coli* (PERES ve ark., 1997; PICKETT ve ark.,1996; SCOTT ve KAPER, 1994), *Shigella* (OKUDA ve ark., 1995) ve *Helicobacter spp* (KIRBY ve ark.,1995) gibi birçok gram-negatif mikroorganizma tarafından ifade edilmektedir. CDT proteininin etkisini anlamak için yapılan çalışmalar bu proteininin hücrelerin G₂ fazında durmasına ve bunu takiben hücre ölümüne vesile olduğunu göstermiştir. *A. actinomycetemcomitans* ve *Haemophilus ducreyi*'nin CDT'lerinin T hücre apoptozunu indüklediği de gözlenmiştir (SHENKER ve ark., 2001).

Ayrıca, başka çalışmalarla da *A. actinomycetemcomitans*'ın LTX ve CDT dışında da farklı virulans faktörleri olabileceği üzerinde durulmuştur. Örneğin, *A. actinomycetemcomitans*'ın Gro-EL benzeri molekülünün epitel hücrelerinde sitotoksisiteyi arttırdığını öne sürmüştür (PAJU ve ark., 2000) fakat Gro-EL benzeri molekülün sitotoksitesinin apoptoz aracılığı ile olup olmadığı henüz belirlenmemiştir. Ayrıca GroEL'in bu etkisi T-lenfositleri üzerinde de çalışılmamıştır. *A. actinomycetemcomitans*'ın sitolitik ve sitostatik etkisine CDT, lökotoksin ve diğer aday moleküllerin etkisi *cdt*, *ltxA* ve *cdt/ltx* gen lokuslarının delesyonu ile oluşturulan izojenik mutantlarla araştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar *cdt* ve *ltxA* genlerinin kısmi olarak *A. actinomycetemcomitans*'un neden olduğu apoptozu indükledikleri gösterilmiş ancak *cdt* ve *ltxA* genlerinin olmadığı izojenik suşlarda hala etkin bir apoptoz kapasitesinin olduğu tespit edilmiştir. Apoptozun indüklendiği kültürlerle eklenen Aa-fraksiyonlarında GroEL benzeri proteinlerin varlığından söz edilmiştir (NALBANT ve ark., 2003). Dolayısıyla, CDT ve lökotoksinden başka sitolitik özellik gösteren diğer moleküllerin *A. actinomycetemcomitans* tarafından ekspres edilmesi olasıdır ve *A. actinomycetemcomitans* -GroEL proteini bu olasılık içerisinde ve bu protein ısı şoku proteinleri ailesindedir. AaGroEL proteininin insan T hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması bu bakterinin patolojiye neden olan mekanizmalarının açığa çıkarılması bakımından oldukça önemlidir. Bu konunun araştırılması bu projenin içerik ve kapsamını oluşturmuştur.

Isı şoku proteinleri bütün hücrelerde normal şartlarda bulunan ve stres koşulları altında sentezi artan proteinlerdir. Hsp sentezi, sıcaklığın artması, hipoksia, radyasyon, enfeksiyon ve toksik kimyasallarla temasa geçme gibi stres koşullarına maruz kalan hücrelerde artmaktadır. Bu proteinler bütün prokaryotik ve ökaryotik hücreler tarafından sentezlenmektedir. Isı şoku proteinlerinin hücre içindeki görevleri; proteinlerde meydana

gelebilecek ısı ve stres hasarını en aza indirmek, protein çökmesi ve diğer yanlış katlanmaları önleyerek protein katlanmasını kolaylaştırmak, oluşmaya başlayan polipeptitlere bağlanarak erken katlanmayı engellemek, proteinlerin organellerin zarlarından geçmeden önce katlanmasını önlemek, çok proteinli komplekslerin toplanmasını ve ayrılmalarını kolaylaştırmak olarak özetlenebilir (BRAIG, 1998).

Isı şoku proteinleri gerek prokaryot gerekse ökaryot hücrelerde moleküler ağırlığına bağlı olarak yapısal temelde birbirleriyle ilintili birkaç ana grupta toplanmaktadır: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve küçük Hsps'ler (MACARIO, 2001). Son yıllarda yapılan çalışmalarla mikrobiyal ısı şoku proteinlerinin tuberkuloz, periodontal hastalıklar gibi enfeksiyon hastalıklarının patolojisinde rol oynayabilecekleri önemle vurgulanmaktadır (ZÜGEL ve KAUFMANN, 1999). Ayrıca prokaryotik ısı şoku proteinleriyle ökaryotik ısı şoku proteinlerinin dizilerinin benzerliğinin otoimmünite ve doku hasarına sebep olabileceği üzerinde durulmaktadır.

Yapılan çalışmalarda farklı enflamatuvar hastalık modellerinde, bakteriyel ısı şoku proteinleri ve ısı şoku proteini kökenli peptitlerin anti-inflamatuvar özellikler sergilediklerini göstermiştir. Bazı çalışmalar hsp'lerin direkt olarak antijen sunan hücrelerle etkileşime girdiğini gösterirken diğerleri bakteriyel hsp'lerin regülatör fenotipli spesifik T hücrelerini indükleyebildiğini bildirmiştir. Bu bağlamda, *Chlamydia trachomatis* bakterisinin ürettiği ısı şoku proteini 60 (cHSP60) örnek olarak verilebilir. invitro bir çalışmada chlamydia ısı şoku proteini 60'ın (cHSP60) insan primer trofoblastlarında, plesantal fibroblastlarda ve JEG3 hücre hattında apoptozu indüklediği ve apoptozun TLR-4'ün üzerinden açığa çıktığı gösterilmiştir. Bu bilgiler, TLR-4 stimülasyonunun plesentada apoptozu indüklediğini ve bu sonucun kadınlarda düşük yapma ve hamilelikte sorunlara yol açan dirençli chlamydia enfeksiyonunun patolojisini anlamak için yeni bir mekanizmayı ortaya çıkarabileceğini göstermektedir (Equils ve ark., 2006).

Bir başka örnekte *Chlamydia pneumoniae*'nin ürettiği chlamydia HSP60'tur. Her ne kadar atherosclerosisdeki enflamasyonu neyin tetiklediği tam olarak anlaşılmış olmasa da hiperkolestrolemia, modifiye lipoproteinler, *Chlamydia pneumoniae* gibi organizmalar sonucu ortaya çıkan enfeksiyonların sebepleri arasında olduğu düşünülmektedir. Isı şoku proteini 60 (hsp60), bakteriyel LPS ve moleküler mimikrinin atherosclerosis enfeksiyonu ile ilişkili potansiyel mediatörler oldukları düşünülmektedir (TABETA ve ark., 2001). LDL'nin (low density lipoprotein) atherogenik lipoproteine oksidasyonu, düz kas ve makrofajlardan köpük hücrelerinin oluşumu atherosclerotik lezyonların başlamasının ve gelişmesinin iki önemli işaretidir. Daha önceki çalışmalar chlamydia LPS'nin ve chlamydia HSP60(cHsp60)'ın bu olayları indüklediğini göstermiştir. *C. pneumoniae*'nin köpük hücre oluşumuna sebep olan bileşeni LPS'si ve LDL'nin oksidatif modifikasyonuna sebep olan bileşeni ise cHSP60'dır (ZÜGEL ve KAUFMANN, 1999). cHSP60'nın insan chlamydia enfeksiyonlarında deleteryöz immun yanıtın indüksiyonunda rol aldığı ve atheroma lezyonlarına nüfuz eden makrofajlarla birlikte lokalize olduğu bulunmuştur (Bulut ve ark., 2002).

Campylobacter rectus, gram-negatif, asakkarolitik bir bakteridir ve ilerlemiş periodontitis lezyonlarından izole edilmektedir. *C. rectus* virulens faktörü olarak kabul edilen bir yüzey tabakası proteini üretmektedir. Antijenik determinantların periyodik asit ve proteolitik enzimler kullanılarak biyokimyasal doğalarının keşfedilmesi ile *C. rectus*'un GroEL-benzeri proteininin hem peptit hem de karbonhidrat zincirlerinde

bulunan immunodominant epitoplara sahip olduğu görülmüş ve bu 150-kDa'luk proteininin immunoreaktif determinantlarının karbohidratlara ait olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar *C.rectus*'un GroEL benzeri proteininin ve S-tabaka proteininin aynı karbohidrat epitoplarını paylaşabileceğini göstermektedir (HINODE ve ark., 2002).

Son yıllarda yayınlanan birkaç çalışmada *A. actinomycetemcomitans* GroEL proteininin patolojide rol oynayabileceği, epitel hücreleri ve keratinositler üzerinde antijenik özellik taşıdığı gösterilmiştir (ZHANG ve ark., 2001, PAJU ve ark., 2000). Ancak T lenfositleri kazanılmış immün yanıtta görev alan ve onu düzenleyen immün sistemin en önemli hücreleri olmaları nedeniyle, bu hücreler üzerindeki etkileri ile ilgili veriler mevcut değildir. Isı şoku proteinleri ailesine ait, *A.actinomycetemcomitans*'ın 64kDa büyüklükteki "GroEL" adı verilen proteini bu projenin odak noktası olmuştur. Çünkü *A. actinomycetemcomitans*'ın ürettiği GroEL ısı şoku proteininin periodontal hastalıkların patolojisinde nasıl rol oynadığı henüz tam olarak bilinmemektedir (HINODE ve ark., 1996; ZHANG ve ark., 2001, PAJU ve ark., 2000) ve bu sözü edilen proteininin T lenfosit immün yanıtını ve immün yanıtın düzenlenmesini nasıl etkilediği ve açığa çıkan immün yanıtın patolojideki yerinin ne olduğu konusunda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Goulhen ve arkadaşlarının çalışmalarına göre *A. actinomycetemcomitans* GroEL'inin düşük konsantrasyonları epitel hücrelerde çoğalmayı sağlarken yüksek konsantrasyonları toksik etkilere yol açar (GOULHEN ve ark., 1998). *A. actinomycetemcomitans* GroEL'i ayrıca ERK1 ve MAP kinazlarının aktivasyonunu yoluyla insan derisi keratinositlerinin (HaCaT hücre hattı) çoğalmasını artırır (ZHANG ve ark. 2001). Hücre çoğalmasının bakteriyel GroEL proteinine özgü olduğunu kanıtlamak için rekombinant insan Hsp60'ı aynı hücre hatlarına uygulanmış fakat MAP kinaz fosforilasyonu gözlenmemiştir. Böylece çoğalmayı kolaylaştırma etkisinin korunmuş protein dizisinden kaynaklanmadığı gösterilmiştir (ZHANG ve ark. 2001).

A. actinomycetemcomitans GroEL'i 10 sağlıklı bireyden alınan serum ile tepkimeye girmemiş, ancak periodontitis hastalığına sahip 29 hastadan dokuzunun serumuna karşı şiddetle tepki vermiştir (KOGA ve ark., 1993). Ayrıca Ando ve arkadaşları 1995'te periodontitis hastalığına sahip bir hastanın serumunun, *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Prevotella nigrescens* HSP60 ve/veya HSP70'leriyle tepkimeye girdiğini göstermiştir ve bu proteinlerin belki de periodontitis'in patogeneğinde rol oynadığını öne sürmüştür (ANDO ve ark., 1995).

A.actinomycetemcomitans'ın ses dalgalarıyla parçalanmış hücre sıvıları ile bağışıklık kazandırılan farelerin akraba nesilleri, muhtemelen GroEL olan 65-kDa proteinine karşı öncül bir bağışıklık tepkisi göstermiştir. Bu protein ayrıca Juvenile Periodontitis hastalarından alınan seruma karşı şiddetli bir tepki vermiştir (NITTA ve ISHIKAWA, 1993). Lokalize Juvenile Periodontitis hastalığına sahip hastaların *A. actinomycetemcomitans* (GroEL içeren) yüzey bağlantılı maddeye karşı yüksek antikor titrasyonuna sahip oldukları görülmüştür (MEGHJI ve ark., 1993). Ayrıca *A. actinomycetemcomitans* GroEL'i insan fibronektinine karşı-tepki verdiği (YOSHIOKA ve ark., 2004) öne sürülmüştür. Dolayısıyla, otoimmünite ve doku hasarı *A. actinomycetemcomitans* GroEL'i ile fibronektin arasındaki bu benzerlik nedeniyle ortaya çıkabilir, ancak olası ilişkinin detayları bilinmemektedir.

Mevcut durumda literatürdeki veriler *A. actinomycetemcomitans* GroEL'inin periodontal hastalıkların patolojisiyle ilişkisini düşündürmekle beraber bu ilişkinin

mekanizmasını açığa çıkarmamıştır. Özetle, GroEL proteininin antijen olarak kullanıldığında, naif T lenfositlerinin fenotipinde ne gibi bir değişikliğe neden olduğu, T lenfositlerinin üzerinde ne tür immün yanıtı indüklediği ve düzenleyici T lenfositlerinin nasıl etkilendiği bilinmemektedir. Bu nedenlerle, proje kapsamında GroEL proteinini hem bakteriden izole ederek hem de rekombinant olarak üreterek, bu proteinin antijenik etkileri hem periferal kandan saflaştırılarak elde edilen naif T lenfositleri hem de Jurkat T hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Dolayısıyla, raporun bulgular ve tartışma/sonuç bölümlerinde *A. actinomycetemcomitans* GroEL proteininin T hücrelerinin immün yanıtının düzenlenmesinde nasıl bir rol oynadığı ve GroEL'nin kronik periodantal hastalıkların patolojisindeki rolü elde ettiğimiz deneysel verilerle ortaya konulmuştur.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri Kültürü

Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans (Aa) (29522) bakteri hattı American Type Cell Culture (ATCC)'den alınmıştır. Aa bakterisinin üretilmesi için seçici bir besiyeri olan TSBV besiyeri basitrasin (75 µg/ml) ve vankomisin (5 µg/ml) antibiyotikleri kullanılarak hazırlanmıştır. Aa bakterisi öncelikle tryptic soy agar üzerine ekilmiş, büyüyen kolonilerden seçilerek tryptic soy broth sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Aa kolonileri ışık mikroskopunda incelenerek morfolojilerine göre seçilmiş ve seçilen koloninin Aa olup olmadığı gram boyama, katalaz testi ve PCR ile doğrulanmıştır (KİM ve ark, 2005). Doğrulanmış kolonilerden alınan örnekler 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde sıvı besiyerinde genellikle 48 saat büyütülmüştür. Kültür sonunda bakteriler harvest edilmeden önce 1 saat 43°C'de su banyosunda ısı şoku uygulanarak ısı şoku proteinlerini ekspresyonu artırılmıştır. Kültürlerin bir kısmı ısı şokuna tabi tutulmayıp kontrol olarak hazırlanmıştır. Kültür sonucunda, sıvı bakteri kültürleri +4°C'de 7500 rpm hızı ile 1 saat santrifüjlenerek çöktürülmüştür ve supernant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan bakteri pelletleri 1xPBS'te çözüldükten sonra sonifikasyon (Bandelin sonifikatör) ile hücre membranları parçalanmıştır. Parçalanmış hücreler +4°C'de 7500 rpm hızı ile 1 saat santrifüjlenerek oluşan supernant alınmış ve bu bakteri fraksiyonuna 'Aa-sonik hücre ekstrakt (AaCE) adı verilmiştir ve bu fraksiyon natif GroEL proteininin elde edilmesinde kullanılmıştır. Bu fraksiyonlardaki protein konsantrasyonları Bradford protein assay ile ölçülmüştür. Gerek Aa-37°C gerekse Aa-43°C büyütülen bakteri hücrelerinden yapılan hücre ekstraktları gerekli miktarlarda bölünüp dondurma tüplerinde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

AaGroEL Proteinin ATP Affinite Kromatografi ile Purifikasyonu

Isı şoku protein ailesinden olan GroEL proteinin ATP ile olan affinitesinden yararlanılarak purifikasyon prosesinin ilk aşamasında ATP affinite kromatografi methodu kullanılmaya karar verilmiştir. ATP affinite resini (Aplichem) gravite kolonuna doldurularak dH₂O ile yıkanmış ve equilibration buffer (20mM Hepes-NaOH, 2mM MgAc, 25mM KCl, 10 mM Ammonium sulfate, 0,8mM DDT pH 7,0) ile dengelenmiştir. Kolon hazırlandıktan sonra, resin ile 1 ml AaCE 2 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda ATP resini equilibration buffer ile yıkandıktan sonra, 5mM-ATP içeren elution buffer ile proteinler fraksiyonlara ayrılmıştır. Tüplere toplanan fraksiyonların protein

konsantrasyonu bradford protein assay ile ölçülmüş ve SDS PAGE jel elektroforezi ile saflığı ve kalitesi gözlenmiştir. Fraksiyonlarda bulunan 64kDa GroEL proteinin spesifikliği monoklonal *E.coli* GroEL antikoru (stressgen) kullanılarak western blot ile doğrulanmıştır.

AaGroEL Proteinin Elektroelute Edilmesi

ATP Affinite kromatografi fraksiyonlarında GroEL proteini saf olarak elde edilemediği için purifikasyon aşamalarına daha spesifik bir method olan SDS jel elektroforezinden GroEL protein bantının elektroelute edilmesi ile devam edilmiştir. ATP fraksiyonları SDS örnek yükleme solusyonu (62,5 mM Tris-HCl, 1% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0,05 % bromophenol blue) ile 5 dk kaynatıldıktan sonra SDS jelde yürütülmüştür. Yürütme işleminin sonunda, jel 5 dk dH₂O ile yıkandıktan sonra protein bantları CuCl₂ (300 mM) ile boyanmıştır. İlgili bantlar, yani 64 kDa GroEL içeren bant jelden kesilmiş ve CuCl₂ destain solusyonu (250 mM Tris-250 mM EDTA buffer pH 9.0) ile jelden uzaklaştırılmıştır. Jel parçaları elektroelution için kullanılan buffer (25mM Tris, 125mM glycine, 0,1% SDS) ile yıkandıktan sonra 3 saat 50 V elektroelute edilmiştir. Elektroelutionun son yarım saatinde elution buffer SDS içermeyen buffer ile değiştirilmiştir. Elektroelute edilen AaGroEL proteini (EE-AaGroEL) gece boyunca Tris-HCl buffer (10 mM pH 7,0) ve 1 saat boyunca 1xPBS ile diyaliz edilmiştir. EE-AaGroEL proteini snake skin diyaliz tübüne konularak (Pierce) concentration buffer (Pierce) içinde konsantre edilmiştir. Elde edilen AaGroEL proteinin protein miktarı ölçülmüş ve SDS PAGE jel elektroforezi ile saflığı ve kalitesi bir daha gözden geçirilmiştir. 64 kDa AaGroEL proteinin doğruluğu poliklonal *E.coli* GroEL antikoru (stressgen) antikoru kullanılarak western blot ile doğrulanmıştır.

AaGroEL Proteinin Karakterizasyonu ve Western Blot ile Doğrulanması

Western blot yapmak için kısaca, AaGroEL proteini %8 SDS poliakrilamid jele yüklenmiştir. PVDF membrana transfer edilmiş (Biorad), transfer sonrası membran % 5'lik süt tozu ile bloklanmış ve monoklonal yada poliklonal *E.coli* GroEL antikoru (stressgen) ile gece boyu inkübe edilmiştir. TTBS ile yıkama sonrası, anti-mouse HRP konjuge ikincil antikor (Biorad) ile 2 saat inkübe edilmiştir. Yıkamalardan sonra membrandaki ışımaya Luminol/enhancer ve peroxide buffer (Biorad) ile 5 dk inkübasyon sonunda gözlenmiş ve filme (Kodak) yansıtılmıştır. Ayrıca, Elektroelute edilen AaGroEL proteini %8'lik SDS poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 64 kDa bantı kesilerek %5 asetik asit solusyonu içinde Proteome Factory'e (Berlin) gönderilmiştir ve EE-AaGroEL proteini Kütle Spektrometresi analizi ile doğrulanmıştır

PCR ile GroEL Gen Bölgesinin Çoğaltılması

A.actinomycescomitans GroEL bakterisinin üretmiş olduğu GroEL proteinin klonlanmasında ilk olarak D28817 GenBank kod numaralı dizi baz alınarak, forward ve reverse primerler dizayn edilmiştir; primerler sırasıyla (5' → 3'): GGCATATGGCAGCAAAGACGT ve GGAATTCTTACATCATCCCCGCCA şeklindedir. Primerler MWG – Biotech firması tarafından sentezlenmiştir. Kalın karakterli bölgeler sırasıyla NdeI/EcoRI restriksiyon enzim kesim bölgeleridir ve klonlamayı gerçekleştirebilmek için primerlere eklenmiştir. Bu primerler kullanılarak PCR şu koşullarda gerçekleştirilmiştir (belirtilen rakamlar son konsantrasyonlardır): 10X

PCR buffer, 1X; dNTP karışımı, 0,2 mM her birinden; MgCl₂, 1,5 mM; Primer karışımı: 0,5 µM her birinden; DNA: 100ng; Taq DNA Polymerase: 1,0 ünite.

TA Klonlaması

PCR sonucunda oluşan 1644bp uzunluğundaki parça jelden izole edilmiş (Fermentas, DNA Gel Extraction Kit) ve daha sonra pGEM (Promega) klonlama vektörü kullanılarak, TA klonlama prensibi ile klonlanmıştır. Kısaca bu prensip, taq polimeraz enziminin uçlara A nükleotidi eklemesine dayanır ve ona uygun hazırlanmış olan ve uçlarında T bulunan klonlama vektörleri kullanılarak klonlama gerçekleşir.

Ekspresyon Vektörüne Klonlama

Pozitif kolonilerden elde edilen pGEM/AaGroEL rekombinant vektörü NdeI/EcoRI enzimleri (Fermentas) ile kesilmiş ve kesilen parça, yine aynı enzimlerle kesilmiş pET28a ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Bu aşamada 1:3 vektör:insert oranı izlenmiş ve T4 DNA ligaz (Fermentas) enzimi kullanılmıştır. Pozitif hücrelerden elde edilen pET28/AaGroEL rekombinant vektörünün gen dizisi sekanslanmış ve herhangi bir mutasyon olmadığından emin olunduktan sonra ekspresyonuna geçilmiştir.

Rekombinant Protein Ekspresyonunun İndüklenmesi

Bunun için pET28/AaGroEL rekombinant vektörü BL21(DE3) *E. coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Daha sonra bir gece boyunca üremiş olan doymuş kültür, 10 katı kadar fazla hacimdeki taze besiyerine aktarılmış ve orta-log fazı olması için OD₆₀₀ ~ 0,6 oluncaya kadar büyütülmüştür. Kültürlerde kullanılan kanamisin (Applichem) 30µg/ml olacak şekilde kullanılmıştır. Daha sonra son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde IPTG (Applichem) eklenmiş ve daha önce belirlenen indüklenme zamanı olan 4 saat kültürün protein ekspres etmesi beklenmiştir. 4 saat sonunda bakteriler 5000g hızında 15 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Bakteri büyütme için kullanılan besiyeri LB (Gibco) dir. Ayrıca pGEM ve pET vektörlerini içeren *E.coli* hücrelerini seçici büyütme amacıyla sırasıyla 100 µg/ml Ampicillin (Applichem) ve 30 µg/ml Kanamycin (Applichem) antibiyotikleri LB besiyerinin içine eklenmiştir. *E.coli* hücreleri sıvı LB besiyerinde 200rpm çalkalama hızında 37 C çalkalayıcıda, katı LB besiyerinde ise yine 37°C inkübatörde 16-20 saatleri arasında inkübe edilmişlerdir.

Rekombinant Protein Saflaştırılması

Sodyum fosfat tamponu ile çözülen bakteriler protein saflaştırma aşamasından önce sonikasyon yöntemi ile parçalanmıştır. Hücre artıkları yine santrifüj ile 3000g hızında 30 dakika +4 derecede çöktürülmüştür ve süpernatant protein saflaştırılması için kullanılmıştır. Talon Cellthru Resin (Clontech) içerdiği kobalt metal iyonları sayesinde, 6x-histidine ile taglenmiş proteinleri tutma kabiliyeti yüksek olduğundan tercih edilmiştir. Saflaştırma işlemi, önerilen protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca, santrifüj sonrasında oluşan süpernatant, kolona yüklenmiş ve çalkalamalı olarak 1 saat +4°C derecede bekletilmiştir. Daha sonra bağlanmayan proteinler kolondan akıtılmış ve kolon 2 defa 10 dakika süreyle sodyum fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Son olarak daha sert koşullarda yıkamak için içinde 10mM imidazol(Applichem) bulunan tampon ile yıkama yapılmış olup, 150mM imidazol içeren tampon kullanılarak his tag içeren proteinlerin kolondan akıtılması sağlanmıştır. Elde edilen ürünün saflığı 8%'lik SDS

PAGE ile gösterilmiş ve proteininin konsantrasyonu Bradford ile tespit edilmiştir. Western blot (yukarıda tanımlanmıştır) ve Kütle spektrometresi kullanılarak rAaGroEL proteinin doğruluğu kanıtlanmıştır.

LPS Tayin Deneyi

Rekombinant formda üretilen GroEL proteininde LPS, endotoxin miktarı LAL Chromogenic Endpoint Assay Kit (Hycult biotechnology) ile tespit edilmiş olup üretici firmanın protokolü izlenerek uygulanmıştır. Bu deneydeki prensip endotoksin ile iletişime geçtiğinde sarı renk vererek spektrofotometrik bir değer verebilen LAL maddesinin kullanılmasıdır. Kit miktarı belli Endotoxin standardı içerir. Standardın 7 adet dilüsyon değeri kullanılarak Standard eğri çıkartılır. Endotoksin miktarı belli olmayan örnekler dilüsyonlar yapılarak koyulur ve oluşturulan standard eğri ile ana örnekteki endotoksin oranı tayin edilir.

Periferel Kandan Beyaz Kan Hücrelerinin (PBMC) İzolasyonu

Sağlıklı gönüllülerden İYTE-Sağlık Hizmetleri personeli tarafından, Heparinli kan alma tüplerinin (BD) içerisine alınan kandan, “*Ficoll–Hypaque Density Gradient Centrifugation*” yöntemi kullanılarak PBMC izolasyonu yapılmıştır (BÖYUM, 1968).

Hücre Kültürü

Kullanılan antijenin T hücreleri üzerindeki in vitro etkisinin bakılması için antijen ile PBMC hücreleri kontroller eşliğinde kültür ortamına konulmuştur. Buna göre, U şekilli hücre kültür tüplerinde hazırlanan kültürler 10^6 hücre içerecek şekilde hazırlanmıştır. Negatif kontrol seti sadece RPMI/10% FBS(Invitrogen) ile PBMC içerirken, pozitif kontrol seti ise RPMI/10% FBS, PBMC ile PMA (Sigma) /Ionomycin (Sigma) karışımı ve Kamptotesin ($4\mu\text{M}$) içermektedir. Bir phorbol ester olan PMA ve bir Ca^{++} ionoforu olan Ionomycin kombinasyonu güçlü bir mitojen olmasından dolayı pozitif kontrol olarak tercih edilmiştir ve son konsantrasyonları sırasıyla 25 ng/ml ve 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak ayarlanmıştır. Deney setinde ise antijen olarak kullanılan rAaGroEL veya EEAaGroEL istenilen konsantrasyonlarda hazırlanıp PBMC ve RPMI/10% FBS eşliğinde kültüre konulmuştur. Hücreler 37°C de ve %5 CO_2 bulunan ortamda inkübe edilmiş ve kültür bitimini takiben boyamaya geçilmiştir. Ayrıca gerekli olan durumlarda AaGroEL proteinin antijenik yanıtının belirlenmesi için Jurkat T hücreleri de (Jurkat T cell lymphoma cell line) kullanılmıştır. Jurkat T hücreleri American Type Cell Culture'den (ATCC) alınmıştır. Jurkat T hücreleri %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri (Invitrogen) ile 37°C ve %5 CO_2 ortamda optimum şartlar sağlanarak yetiştirilmiştir. Kültür bitimini takiben hücreler ilgili fonksiyon deneyleri için kullanılmıştır. İstatiksel analizlerin yapılabilmesi adına her bir örnek üçlü set halinde hazırlanmıştır.

Apoptozun Annexin V ve 7AAD ile Ölçülmesi

Apoptozun erken evrelerinde hücre membranında iç yüzeyde bulunan fosfatidilserin dış yüzeye çıkmaktadır. Annexin V antikorumun fosfatidilserine bağlanması ile apoptotik hücreler analiz edilir. 7AAD ise apoptozun ileri evrelerinde membran yapısında oluşan porlardan içeri girerek DNA'ya bağlanmaktadır. Dolayısıyla, AnnexinV ve 7AAD kombinasyonun kullanıldığı bir boyamada sadece Annexin V+ hücreler preapoptotik, AnnexinV+7AAD+ hücreler apoptotik ve sadece 7AAD+ hücreler ise ölü hücrelerdir.

PBMC ile yapılan deneylerde sadece T hücrelerinin apoptozunun ölçülmesi adına hücrelere ayrıca T hücre markörü olan CD3 ile de boyanmışlardır. AnnexinV/7AAD boyaması kısaca şöyle özetlenebilir; kültür sonlandırılması için hücreler 1xPBS ile 2 defa yıkanır ve sonra hücreler Ca^{++} içeren buffer (BD) varlığında AnnexinV (BD) ve 7AAD (BD) ile 30 dk inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler akım sitometrisinde okutulur ve data analizi yapılır.

T Hücre Apoptozunun Aktif-Kaspaz 3 ile Ölçülmesi

Apoptozun son evresinde hem ölüm reseptörleri hemde mitokondriyal yolak ile aktifleşen kaspaz-3 enziminin varlığı EE-AaGroEL proteinin indüklediği T hücre apoptozunda akım sitometrisi ile ölçülmüştür. Antijen, pozitif ve negatif kontrol varlığında kültüre konan hücreler kültürün sonunda 1400 rpm 4° C santifüjlenerek pellet oluşturulduktan sonra supernant uzaklaştırmıştır. Daha sonra hücreler 2 kez yıkama solusyonu ile yıkanmıştır. Eğer deneyde PBMC'ler kullanılmış ise T hücrelerini tanımlamak için hücreler öncelikle CD3 antikoru kullanılarak işaretlenmiştir. CD3 gibi hücre yüzeyi işaretlemesinden sonra, yıkanan hücrelerden hücre pelleti oluşturulur ve bu hücreler fiksasyon solusyonu (% 5,5 formaldehit içeren 1XPBS) 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek fiks edilmiştir. Sonrasında hücreler tekrar yıkanmıştır. Yıkama sonunda oluşan hücre pelleti bu kezde perm solusyonu (1XPBS, saponin, % 0,1 NaN_3) ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek hücre membranında porlar oluşturulmuştur. Bunu takiben hücreler aktif-kaspaz-3 antikoru (BD) ile 15 dk inkübe edilmiştir. Hücreler yıkama solusyonu ile yıkandıktan sonra, süpernatant ile bağlanmamış antikolar uzaklaştırılmıştır. Hücreler % 0,5 formaldehit içeren 1X-PBS solusyonu ile çözüldükten sonra akım sitometrisi ile okutulmuş ve data analiz edilmiştir.

T Hücre Apoptozunun DNA Fragmentasyonu ile Ölçülmesi

Apoptozun ileri aşaması DNA fragmentasyon ile ölçülür (Lİ ve DARZYŃIEWICZ, 1995). Jurkat T hücreleri AaGroEL, pozitif ve negatif varlığında 48 saat boyunca %5 CO_2 ve 37°C' da inkübe edilmiştir. Kültür sonunda hücreler yıkanıp NP40 deterjanı ihtiva eden çözme tamponu ile muamele edilmiş ve 1600g de santrifüjlendikten sonra süpernatantlara sırasıyla SDS, RNase ve proteinase K eklenmiştir. RNase ile 2 saat boyunca 56°C su banyosunda, proteinase K ile 2 saat boyunca 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir. Karışımlara amonyum asetat ve %100'lük etil alkol eklendikten sonra maksimum hızda 10-20 dk arası santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet %70'lik etil alkol ile yıkanmıştır. Maksimum hızda 10-20 dk arası santrifüjlenmiş ve süpernetant uzaklaştırıldıktan sonra pellet kurutulmaya bırakılmıştır. Pellet 1X-TE buffer içinde çözülmüştür. Sonuçlar Nanodrop Spektrofotometre'de okunup eşit miktarlarda DNA %1.7'lik agaroz jelde elektroforezlenmiştir. Jel görüntüleme sistemi ile jelin görüntülemesi yapılmıştır.

T Hücre Aktivasyonun Farklı T Hücre Altgruplarında Tayini

Kültür bitimine müteakip hücreler 300g hızında 5 dakika çöktürülüp süpernatantları vakum yardımıyla çekilmiştir. 1XPBS/2%FBS içeren solüsyon eklenen hücreler yine aynı hızda çöktürülerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücrelerin üzerine

hücre yüzey markörlerine karşı hazırlanan florasan kuyruklu antikordardan gereken kombinasyonlarda konulmuştur. CD4, CD8, CD25, CD69 kullanılan hücre yüzeyi markörleridir (BD). 30 dakika karanlık bir ortamda inkübe edilen hücreler yine yukarıda anlatıldığı gibi 2 kez yıkanmış ve daha sonra 1XPBS/2%FBS içerisinde çözülerek BD Facsarray akış sitometre cihazında okutulularak analiz edilmişlerdir.

T Hücre Sitokinlerinin Hücre İçi Sitokin Boyama Metodu ile Tespiti

Sitokin boyaması, hücre yüzeyinden ziyade hücre içine yönelik olduğundan dolayı biraz farklıdır. Öncelikle sitokinlerin hücre dışına salınımını engellemek için kültür bitiminden 4 saat öncesinden son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde protein transport inhibitörü olarak bilinen BFA (Brefeldin A, Applichem) eklenmiştir. Kültür bitimini takiben yine yukarıda anlatıldığı gibi yıkanan hücrelere gerekli hücre yüzeyi markörleri (CD4 ve CD25) eklenerek boyama işlemi yapıldıktan sonra hücre fiksasyonu için gerekli 4% Paraformaldehid (Applichem) eklenerek karıştırılmıştır ve 10 dakika arada karıştırarak inkübe edilmiştir. Fix edilen hücreler iki defa yıkanmıştır. Sonrasında hücrelerin zarlarını geçirgen hale getirmek için 0,5 Triton-X (Applichem) içeren 1X-PBS hücrelere eklenmiştir. Karıştırılan hücreler santrifüj ile çöktürülerek dibinde yaklaşık 50 µl solüsyon kalacak şekilde süpernatantları alınarak bırakılmıştır. Sitokin antikordarı hücrelerin üzerine eklenerek 30-45 dakika oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Kullanılan sitokinler, IL-2, IL-4, IFNg (Beckman Coulter), IL-10 (BD), IL-17, TGFb (R&D) den oluşmaktadır. Daha sonra hücreler 0,5 Triton-X içeren PBS ile yıkanarak yine aynı tampon içerisinde çözülerek BD Facsarray akış sitometre cihazında okutulup analiz edilmişlerdir.

CBA Tekniği ile Hücre Süpernatantlarının Sitokin Profiline Bakılması

Kültür bitimini takiben ortama salınan sitokinleri incelemek adına BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II adı verilen kit kullanılmıştır. Bu kit ile IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFNg sitokinlerine bakılmış olup üretici firmanın protokolü izlenmiştir. Kısaca her bir sitokinden eşit miktarlarda içeren standard için 9 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Standartların ve örneklerin üzerine sitokinleri tutmak için tasarlanmış boncuk karışımı eklendikten sonra son olarak sitokinlere tutunup ışığa veren florasan kuyruklu sitokin antikordarı eklenerek 3 saat oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında yıkanan boncukların analizi yine BD Facsarray cihazında yapılmıştır. Data analizi ise FACScap yazılımında gerçekleştirilmiştir.

Regülator T Hücrelerinin Tespiti Amacıyla CD4, CD25 ve Foxp3 İşaretlemesi

Regülator T hücrelerinin (Treg) günümüz literatüründe kabul edilen hücre markörleri CD4 ve CD25 yüzey reseptörleri ile bir transkripsiyon faktörü olan Foxp3 tür. FoxP3 bir transkripsiyon faktörü olduğundan dolayı bu molekülün akım sitometrisinde analizi için özel olarak hazırlanan Human FoxP3 Buffer Seti (BD) kullanılmıştır ve üretici firmanın protokolü izlenmiştir. Kısaca hücreler öncelikle hücre yüzeyi reseptörleri ile (CD4 ve CD25) işaretlendikten sonra hücreler fix edilip hem hücre zarını hem de hücre çekirdeğini çevreleyen zarı geçirgen hale getirecek tampon kullanılmıştır. Sonrasında Foxp3 antikoru eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücreler yıkandıktan sonra da BD Facsarray cihazında okutulup analiz edilmişlerdir.

T Hücrelerinin TLR-2 ve TLR-4 Ekspresyonlarının Ölçülmesi

Kültür bitimini takiben hücreler 1400 RPM'de 5 dk 4⁰C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Oluşan pelletler 2 kez yıkanmış ve oluşan süpernetantlar vakum pompası yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Son yıkamayı takiben oluşan hücre peletlerinin üzerine florasanla işaretlenmiş hücre yüzeyi işaretçileri eklenmiş ve 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. TLR2, TLR4 (e-Bioscience) ve CD4, CD8, CD69 (BD) hücre yüzeyi işaretçileri çeşitli kombinasyonlarda kullanılmıştır. İnkübasyon sonucunda hücreler üzerine 1X-PBS eklenerek yıkamaları yapılmış, yıkama sonucunda hücreler üzerine yeterli miktarda 1X-PBS+%2 FBS eklenip FacsArray akış sitometre cihazında okutulup analizleri yapılmıştır.

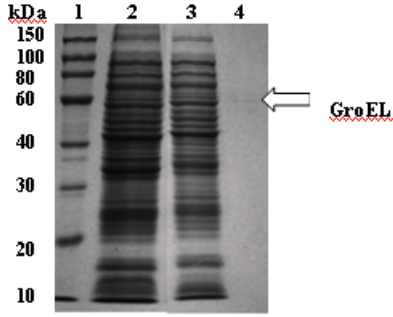
BULGULAR

A. *A.actinomycetemcomitans*-GroEL Proteininin İzolasyonu, Purifikasyonu ve Doğrulanması

A1. AaCE Hazırlanışı ve Fonksiyonunun Ölçülmesi

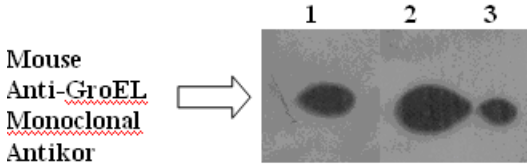
Method kısmında ifade edildiği gibi Aa bakteri kültürü tamamlandıktan sonra bakterilerin bir kısmı 1 saatlik ısı şokuna tabi tutulurken bir kısmı sadece 37 °C de bekletilmiştir. Bu işlemi takiben bütün bakteriler eş zamanlı olarak harvest edilmiş ve elde edilen bakteri peleti PBS'te çözülerek elde edilen karışımdaki bakteriler sonike edilmiştir. Santrifüj işlemi takiben süpernatant debrilerden uzaklaştırılarak Aa-hücre-extraktları (AaCE) olarak adlandırılmıştır.

Elde edilen AaCE'nin öncelikle SDS-PAGE jel elektroforezi ile protein profili ve kalitesi gösterilmiştir. Figure 1a'da da görüldüğü gibi 64kDa ağırlığındaki AaGroEL protein ekspresyonunu arttırmak için uygulanan 1 saatlik ısı şoku sonunda elde edilen Aa-43°C gelen AaCE'deki GroEL miktarı ısı şokuna uğratılmamış Aa-37°C gelen AaCE'takinden fazla olduğu gibi diğer proteinlerin profillerinin de farklılığı gözlenmektedir. Kısaca 43°C'de 1 saat inkübe edilen bakterilerden elde edilen AaCE'deki ısı şoku proteinlerinde artış olmuştur (Figür 1a). Daha sonra AaCE ve pozitif kontrol olarak *E.coli*-GroEL SDS jelde tekrar yürütülerek, bantlar PVDF membrana aktarılıp gerekli olan birincil ve ikincil antikorlarla inkübe edilerek purifikasyonda kullanılacak AaCE fraksiyonunda GroEL varlığı western blot ile tespit edilmiştir (Figür 1b). Aa-43 ve Aa37 kültürlerinden gelen AaCE'lerin western blot sonuçları da Aa-43 kültürlerinden gelen AaCE'de daha fazla GroEL olduğunu göstermektedir.



FİĞÜR 1a: AaCE SDS-PAGE jel elektroforez görüntüsü.

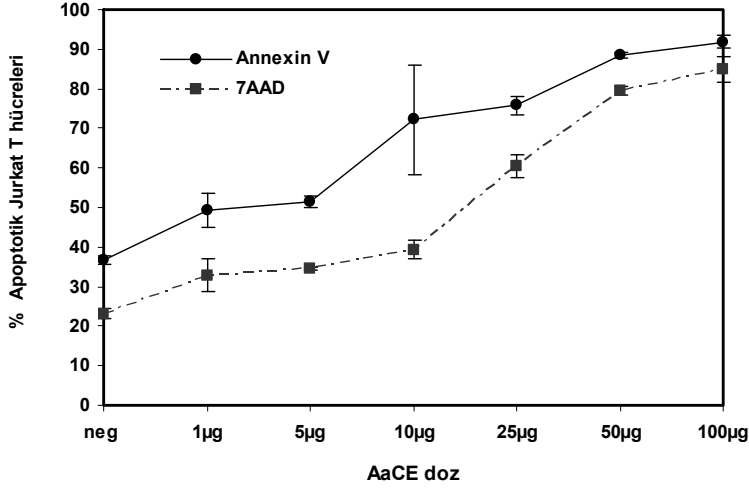
AaCE %8 SDS jelde 30dk 56V'ta ve 1 saat 105V'ta yürütülmüştür. Yüklenen örnekler sırasıyla 1;Marker, 2;AaCE 43°C (50µg), 3;AaCE 37°C (50µg), 4;*E.coli* rGroEL (100ng). SDS jel Coomassie brilliant blue R-250 ile boyanmış ve Jel dokümantasyon cihazında fotoğrafı çekilmiştir.



FİĞÜR 1b:AaCE'tın Western Blot görüntüsü.

AaCE %8 SDS jelde 30dk 56V, 1 saat 105V yürütülmüş, yüklenen örnekler sırası ile 1;AaCE 37°C (50µg), 2;AaCE 43°C (50µg), 3;*E.coli* rGroEL (100ng) ve örnekler PVDF membrana aktarılmıştır. PVDF membran %5 süt tozu ile 1 saat ve ardından mouse monoklonal GroEL antikoru (1:5000) ile 2 saat inkübe edilmiştir. İkincil antikor olarak anti-mouse-HRP conjugate (1:20000) kullanılmıştır. Yıkamalardan sonra, membran Luminol/enhancer ve peroxide buffer ile muamele edilmiş ve membranda gözlenmiş ve kodak filme yansıtılmıştır.

AaCE preparasyonları SDS jelde gözlemlendikten sonra, bu fraksiyonun antijenik özellikleri olup olmadığına tespit etmek amacıyla belli dozlarda T hücreleri ile birlikte kültüre konmuş ve apoptotik etkisinin olup olmadığı Annexin V ve 7AAD ile boyanarak akım sitometrisinde okutulmuş ve data analizi yapılmıştır (Figür 2). 48 saatlik kültür sonunda AaCE fraksiyonu ile kültürde kalan hücrelerde doza bağlı artan bir apoptoz ölçülmüştür. AaCE fraksiyonunun 10µg kullanıldığı kültürde apoptoz oranı %70 iken, 100µg kullanılan kültürde apoptoz oranı %90 civarına ulaşmış ve RPMI olan kültürlerde apoptoz oranı %40 civarında kalmıştır.



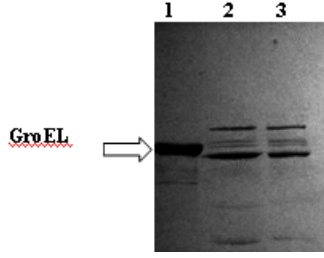
FİĞÜR 2: AaCE fraksiyonunun Jurkat T hücreleri üzerinde doza bağlı apoptotik etkisi.

AaCE belli dozlarda (1-100µg) Jurkat T hücreleri ile 48 saat boyunca kültürde bırakılmıştır. Sadece RPMI negatif kontrol ve Kamptotesin ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kültür sonunda hücreler AnnexinV-7AAD antikoları ile işaretlenmiş ve hücreler akım sitometrisinde okutulmuş ve data analiz edilmiştir.

AaCE fraksiyonunun içinde literatürde şu ana kadar bilinen LTX, CDT gibi belli virulans faktörleri vardır, ancak projemizde spesifik olarak ilgilendiğimiz bir ısı şoku proteini olan AaGroEL proteinin antijenik aktivitesi şu ana kadar kanıtlanmamıştır. Hazırlanan AaCE'nin kalitesi her yönden kontrol edildikten sonra bu fraksiyondan AaGroEL proteininin purifikasyonun aşamalarına geçilmiştir.

A2. AaGroEL proteinin ATP Affinite Kromotografi ile Purifikasyonu

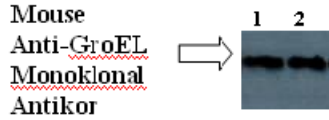
Isı şoku protein ailesinden olan GroEL proteinin ATP ile olan affinitesinden yararlanılarak purifikasyon prosesinin ilk aşamasında ATP affinite kromatografi methodu kullanılmıştır. Öncelikle ATP affinite resini içeren gravite kolonu hazırlanmıştır ve kolonun üzerine 1ml AaCE eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda kolon equilibration buffer ile yıkandıktan sonra, 5mM-ATP içeren elution buffer ile proteinleri içeren fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların protein konsantrasyonu Bradford protein assay ile ölçülmüş ve SDS-PAGE jel elektroforezi ile saflığı ve kalitesi gözlenmiştir (Figür 3a). Figür 3a'da görüldüğü gibi 2 ve 3 nolu kuyucuklara yüklenen ATP fraksiyon örneklerinde pozitif kontrol olarak E.coli GroEL proteini civarında AaGroEL bandı gözlenmektedir. Ayrıca ATP fraksiyonlarının birden fazla bant içerdiğide görülmektedir. Çünkü *A. actinomycetemcomitans* bakterisi birden fazla ısı şoku ailesine ait protein üretmektedir bunlara hsp70, hsp45 ve hsp27 de dahildir. Bu sözü edilen ısı şoku proteinlerinin hepsinde ATP'ye bağlanmak için ilgili kısım olduğundan 64kDa AaGroEL proteinini tek başına ATP affinite kromatografi yöntemiyle izole etmek mümkün değildir. Bu nedenle de GroEL proteinini tek başına izole etmek için elektroelution yöntemi ile purifikasyon işlemine devam edilmiştir.



FİĞÜR 3a: ATP Affinite kromatografi fraksiyonlarının SDS jel görüntüsü.

ATP affinite kromatografi fraksiyonları %8 SDS jelde 30dk 56V, 1 saat 105V yürütülmüştür. Yüklenen örnekler sırasıyla 1; *E.coli* rGroEL (500ng), 2;ATP fraksiyon (5µg), 3;ATP fraksiyon (5µg). SDS jel Coomassie brilliant blue R-250 ile boyanmış ve Jel dokümantasyon cihazında fotoğrafı çekilmiştir.

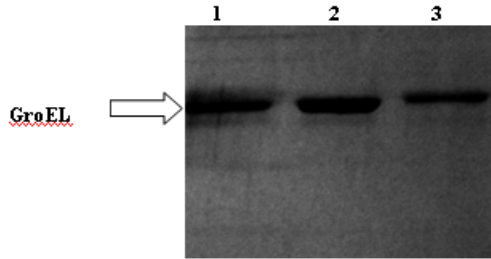
Fraksiyonlarda bulunan 64 kDa GroEL proteinin varlığı ve spesifikliği monoklonal *E.coli* GroEL antikoru kullanılarak western blot ile doğrulanmıştır (Figür 3b).



FİĞÜR 3b: ATP Affinite kromatografi fraksiyonlarının western blot görüntüsü. Fraksiyonlar %8 SDS jelde 30dk 56V, 1 saat 105V yürütülmüş, yüklenen örnekler sırası ile 1;ATP fraksiyon (5µg), 2;ATP fraksiyon (5µg) ve örnekler pvdf membrana aktarılmıştır. PVDF membran %5 süt tozu ile 1 saat ve ardından GroEL antikoru (1:5000) ile 2 saat inkübe edilmiştir. İkincil antikor olarak Anti mouse HRP conjugate (1:20000) kullanılmıştır. Membrandaki ışımaya Luminol/enhancer ve peroxide buffer ile gözlenmiş ve kodak filme yansıtılmıştır.

A3. ATP Affinite Kromatografiden Elde Edilen AaGroEL İçeren Fraksiyondan Elektroelution ile AaGroEL'in Purifikasyonu

ATP kromatografiden toplanan fraksiyonlarda birden fazla ısı şoku proteini olması nedeniyle fraksiyonlar istenilen saflıkta değildir ve çok daha spesifik bir purifikasyon methodu kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle ATP kromatografiden toplanan fraksiyonlarda gözlenen AaGroEL proteini SDS jelden kesilerek elektroelute edilmiştir (Figür 4).

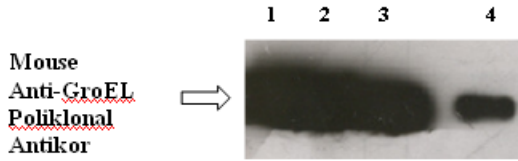


FİĞÜR 4: Elektroelution ile elde edilen AaGroEL proteinin (EE-AaGroEL) SDS jel görüntüsü. Elektroelute edilen AaGroEL proteini %8 SDS jelde 30dk 56V, 1 saat 105V yürütülmüştür. Yüklenen örnekler sırasıyla 1; EE-AaGroEL (200ng), 2; EE-AaGroEL (100ng), 3; rAaGroEL (100ng). SDS jel Coomassie brilliant blue R-250 ile boyanmış ve Jel dokümantasyon cihazında fotoğrafı çekilmiştir.

A4. AaGroEL Proteinin Doğrulanması

A4a. AaGroEL proteinin Western Blot ile doğrulanması

Isı şoku (43°C) uygulanmış AaCE'tan GroEL proteini içeren fraksiyonlar ATP Affinite kromatografiden toplandıktan sonra ilgili fraksiyonlardan elektroelution yöntemi kullanılarak izole edilmiş AaGroEL proteini (EE-AaGroEL) elektroelution sonrasında konsantrasyonunun az olması ve elution işleminde kullanılan solusyonu uzaklaştırmak için aseton ile presipite edildi ve AaGroEL proteini western blot ile doğrulandı (Figür 5). Kısaca, elektroelute edilmiş AaGroEL proteini önce SDS poliakrilamid jele yüklendi ve PVDF membrana transfer edildi. Transfer sonrası membran % 5'lik süt tozu ile inkübe edildi ve GroEL poliklonal antibody ile gece boyu inkübe edildi. TTBS ile yıkama sonrası, HRP conjugate antibody ile 2 saat inkübe edildi, yıkamalardan sonra membrandaki ışımaya Luminol/enhancer ve peroxide buffer ile 5 dk inkübasyon sonunda gözlemlendi ve filme (Kodak) yansıtıldı (Figür 5).



FIGÜR 5: EE-AaGroEL proteinin western blot ile doğrulanması. Elektroelute edilen AaGroEL proteini %8 SDS jelde 30dk 56V, 1 saat 105V yürütülmüştür. Yüklenen örnekler sırasıyla 1;AaCE (10µg), 2; *E.coli* rGroEL (100ng), 3; rAaGroEL (100ng), 4; EE-AaGroEL (200ng). Örnekler PVDF membrana aktarılmıştır. PVDF membran %5 süt tozu ile 1 saat ve ardından mouse poliklonal GroEL antikoru (1:5000) ile 2 saat inkübe edilmiştir. İkincil antikör olarak anti-mouse-HRP conjugate (1:20000) kullanılmıştır. Membrandaki ışımaya Luminol/enhancer ve peroxide buffer ile eklenmesinden sonra gözlenmiş ve ışımaya kodak filme yansıtılmıştır.

A4b. AaGroEL Proteinin Kütle Spektrometresi ile Doğrulanması

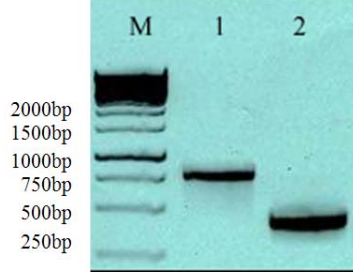
Elektroelute edilmiş AaGroEL (EE-AaGroEL) proteini SDS jelde yürütüldükten sonra ilgili bant kesilerek Almanya'daki Proteom Factory adlı firmaya NanoLC-ESI-MSMS analizi yapılmak üzere gönderilmiştir ve ilgili banttaki proteinin AaGroEL proteini olduğu Kütle spektrometresi ile doğrulanmıştır. Data analiz sonucu Tablo-1' de verilmiştir.

B. Rekombinant *A.actinomycetemcomitans*-GroEL Proteininin Üretilmesi

B1. rGroEL proteininin klonlanması ve sentezlenmesi

B1a. PCR Yardımıyla *A.actinomycetemcomitans* Bakterisinin Doğrulanması

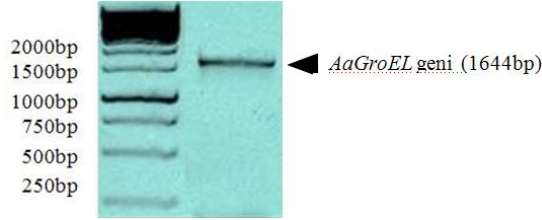
GroEL gen sekansı çok çeşitli bakteriler ve hatta organizmalar arasında korunmuş olduğundan dolayı (GroEL geni çeşitli bakteriler arasında %70 e varan homoloji içermektedir.) ilk olarak kullanılan DNA kaynağının bakteri olduğunun doğrulanması için bakteriyel ribozomal 16S primerleri kullanılmıştır. Bununla beraber *A.actinomycetemcomitans* bakterisinin PCR yoluyla tanımlanması için tasarlanan 16S primerleri de kullanılmıştır (KİM ve ark., 2005). Jel %1 agaroz jeli olup, 90V, 30 dakika yürütülmüştür. UV altında jelin fotoğrafı çekilmiştir (Figür 6).



FIGÜR 6: *A.actinomycetemcomitans* bakterisinin 2 farklı primer kullanılarak PCR ile doğrulanması ve GroEL geninin PCR ile çoğaltılması

Jel %1 agaroz jeli olup, 90V, 30 dakika yürütülmüştür. UV altında jelin fotoğrafı çekilmiştir. M: 1kb DNA marker, 1: Bakteriyeel 16s primer (~780bp), 2: *A.actinomycetemcomitans* spesifik 16s primer (~425bp).

B1b. *A.actinomycetemcomitans* GroEL Geninin PCR ile Çoğaltılması

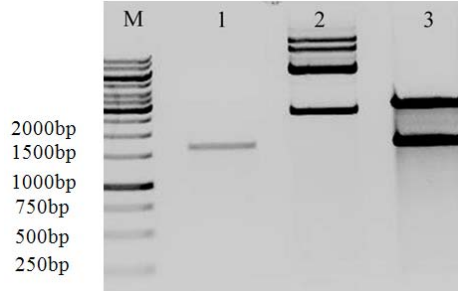


FIGÜR 7: Bakteri doğrulanması yapıldıktan sonra GroEL geninin PCR ile çoğaltılması.

Jel %1 agaroz jeli olup, 90V, 30 dakika yürütülmüştür. UV altında jelin fotoğrafı çekilmiştir.

B1c. *A.actinomycetemcomitans* GroEL Geninin pGEM Vektörüne Klonlanması

PCR sonucunda oluşan 1644bp uzunluğundaki parça jelden izole edilmiş ve daha sonra pGEM klonlama vektörü kullanılarak, TA klonlama prensibi ile klonlanmıştır. Kısaca bu prensip, taq polimeraz enziminin uçlara A nükleotidi eklemesine dayanır ve ona uygun hazırlanmış olan ve uçlarında T bulunan klonlama vektörleri kullanılarak klonlama gerçekleşir. TA kloning prensibi ile PCR ürünü ile pGEM vektörü ligaz enzimi ile birleştirilmiş ve *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Klonlama sonrasında pozitif kolonilerden izole edilen plasmid, EcoRI ve NdeI ile kesilmiş ve kesim reaksiyonu jelde yürütülmüştür. Şekilde bu iki enzimle kesilen vektörden ayrılan fragman ve PCR ürünü aynı hizada olduğundan, klonlamanın başarıyla gerçekleştiği görülmektedir (Figür 8).

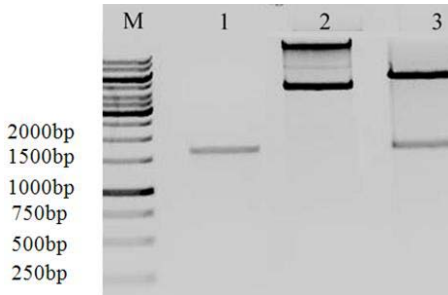


FIGÜR 8: Klonlama vektörü olan pGEM içerisinde *AaGroEL* geninin klonlandığını gösteren jel sonucu:

M: 1kb DNA marker, 1: *AaGroEL* geni (1644bp), 2: pGEM/*AaGroEL* vektörü, 3: pGEM/*AaGroEL* EcoRI & NdeI ile kesilen vektör.

B1d. *A.actinomycetemcomitans GroEL* Geninin pET28a Vektörüne Klonlanması

pGEM vektöründen yukarıda belirtilen iki enzim ile kesilen fragman pET28a vektörü ile ligaz enzimi yardımıyla birleştirilmiş ve *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Klonlama sonrasında pozitif kolonilerden izole edilen plasmid, yine EcoRI ve NdeI ile kesilmiş ve kesim reaksiyonu jelde yürütülmüştür. Şekilde bu iki enzimle kesilen vektörlerden ayrılan fragman ve PCR ürünü ile aynı hizada olduğundan, klonlamanın başarıyla gerçekleştiği görülmektedir (Figür 9). Pozitif hücrelerden elde edilen pET28/*AaGroEL* rekombinant vektörünün gen dizisi sekanslanmış ve herhangi bir mutasyon olmadığından emin olunduktan sonra ekspresyonuna geçilmiştir (Tablo-3).



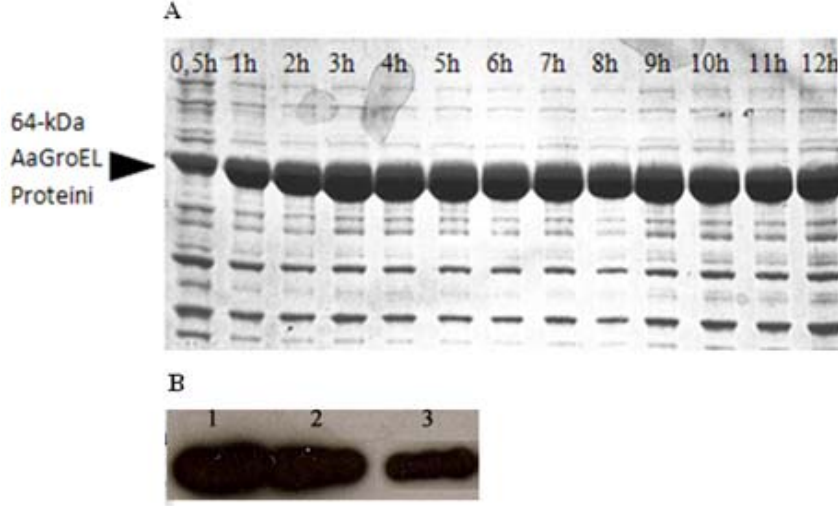
FIGÜR 9: Ekspresyon vektörü olan pET28a içerisinde *AaGroEL* geninin klonlandığını gösteren jel sonucu:

M: 1kb DNA marker, 1: *AaGroEL* geni (1644bp), 2: pET28a/*AaGroEL* vektörü, 3: pET28a/*AaGroEL* EcoRI & NdeI ile kesilen vektör.

B2. rAaGroEL Proteininin Western Blot ile Doğrulanması ve Protein Ekspresyon İndüksiyon Zamanının Belirlenmesi

E.coli BL21(DE3) bakterilerini LB sıvı besiyerinde büyürken log fazında ($OD_{600} \sim 0,6$) 1mM IPTG eklenmiş ve daha sonra her bir kuyucuğun üzerinde de yazdığı gibi 12 saate kadar her saat örnek toplanmıştır. Toplanan bakteriler 2x SDS yükleme boyasının içinde kaynatılarak eşit miktarlarda (10 μ l) %10 SDS PAGE jeline yüklenmiştir. Jel yürütmesini takiben Commasie Blue boyaması yapılmış ve jelin fotoğrafı çekilmiştir. Bantların kalınlığı hemen hemen 4 saatten sonra değişmediğinden dolayı 4. Saat protein indüksiyonu için yeterli ve gerekli zaman olarak belirlenmiştir (Figür 10a). *AaGroEL* varlığını western blot ile doğrulamak için *AaGroEL* proteini % 8 SDS poliakrilamid jele

yüklenmiştir. PVDF membrana transfer edilmiş, transfer sonrası membran monoklonal *E.coli* GroEL antikoru ve anti-mouse HRP konjuge ikincil antikor ile inkübe edilmiştir. Yıkamalardan sonra membrandaki ışığa Luminol/enhancer ve peroxide buffer ile inkübasyon sonunda gözlenmiş ve filme yansıtılmıştır (Figür 10b).



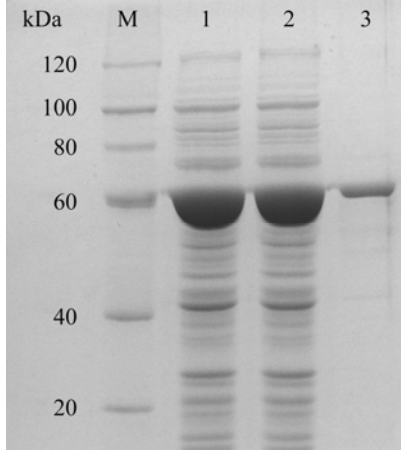
FIGÜR 10: A- 1mM IPTG kullanılarak indüklenen protein ekspresyonunun zamana bağlı artışı.

B: rAaGroEL Proteininin Western Blot yöntemi ile doğrulanması.

1- *A.actinomycescomitans* bakterisinin ısı şokuna uğratıldıktan sonra yapılan hücre lizati, 2- rEcoli GroEL proteini (StressGen), 3- rAaGroEL proteini.

B3. rAaGroEL Proteininin Saflaştırılması ve Doğrulanması

Sodyum fosfat tamponu ile çözülen bakteriler protein saflaştırma aşamasından önce sonikasyon ile parçalanmıştır ve elde edilen süpernatant protein saflaştırılması için kullanılmıştır. Talon Cellthru Resin içerdiği kobalt metal iyonları sayesinde 6x-histidine ile taglenmiş proteinleri tutma kabiliyeti yüksek olduğundan tercih edilmiştir. Saflaştırma işlemi, önerilen protokol (methot kısmında açıklandı) izlenerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünün saflığı 8%'lik SDS PAGE ile gösterilmiş (Figür 11) ve proteininin konsantrasyonu Bradford ile tespit edilmiştir. Figür 23'te 3 nolu kuyucukta görüldüğü gibi 60kDa civarındaki AaGroEL proteini tek bir bant halinde görülmektedir. Ayrıca elde edilen bantta Western Blot (yukarıda tanımlanmıştır; Figür 10b) ve Kütle Spektrometresi kullanılarak rAaGroEL proteinin var olduğunun doğruluğu kanıtlanmıştır (Tablo-2).

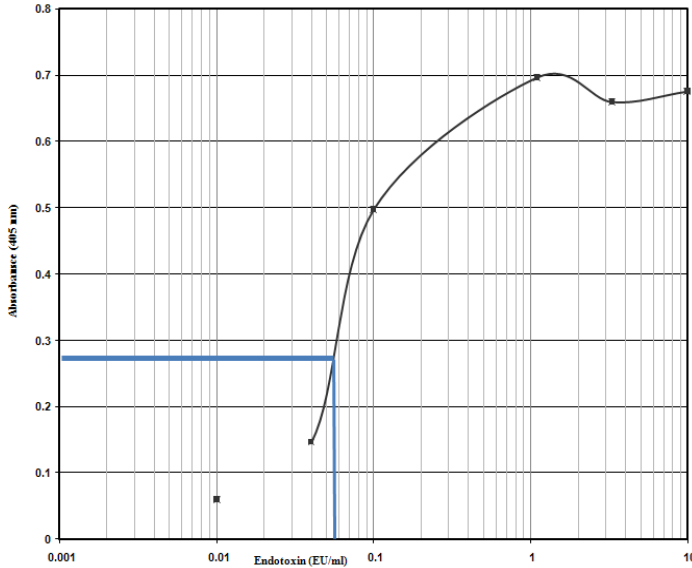


FİGÜR 11: Metal affinite yöntemi kullanılarak 6x His tag içeren rAaGroEL proteininin hücre lizatından saflaştırılması.

M: Protein marker, 1: rAaGroEL proteinini üreten *E.coli* Hücre lizatı. 2: Kolondan geçirilen hücre lizatı. 3: Kolondan toplanan saf rAaGroEL proteini.

B4.LPS Tayin Deneyi

Gerek elektroelute edilen gerekse rekombinant formda üretilen GroEL proteininde LPS, endotoksin miktarı LAL Chromogenic Endpoint Assay Kit (Hycult biotechnology) ile tespit edilmiş olup üretici firmanın protokolü izlenerek uygulanmıştır. Bu deneydeki prensip endotoksin ile iletişime geçtiğinde sarı renk vererek spektrofotometrik bir değer verebilen LAL maddedesinin kullanılmasıdır. Kit miktarı belli Endotoksin standardı içerir. Standardın 7 adet dilüsyon değeri kullanılarak Standard eğri çıkartılır. Endotoksin miktarı belli olmayan örnekler dilüsyonlar yapılarak koyulur ve oluşturulan standart eğri ile ana örnekteki endotoksin oranı tayin edilir (Figür12). LAL deneyine göre mikrogramdaki LPS miktarı 8EU olarak hesaplanmıştır.



FİGÜR 12: LPS tayini

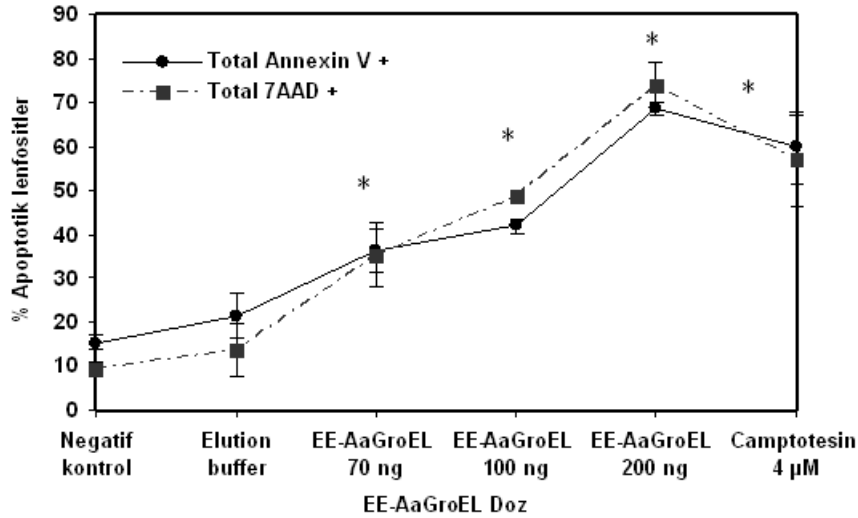
C. AaGroEL Proteinin T Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Araştırılması

C1. T Hücre Apoptozunun AnnexinV ve 7AAD ile Ölçülmesi

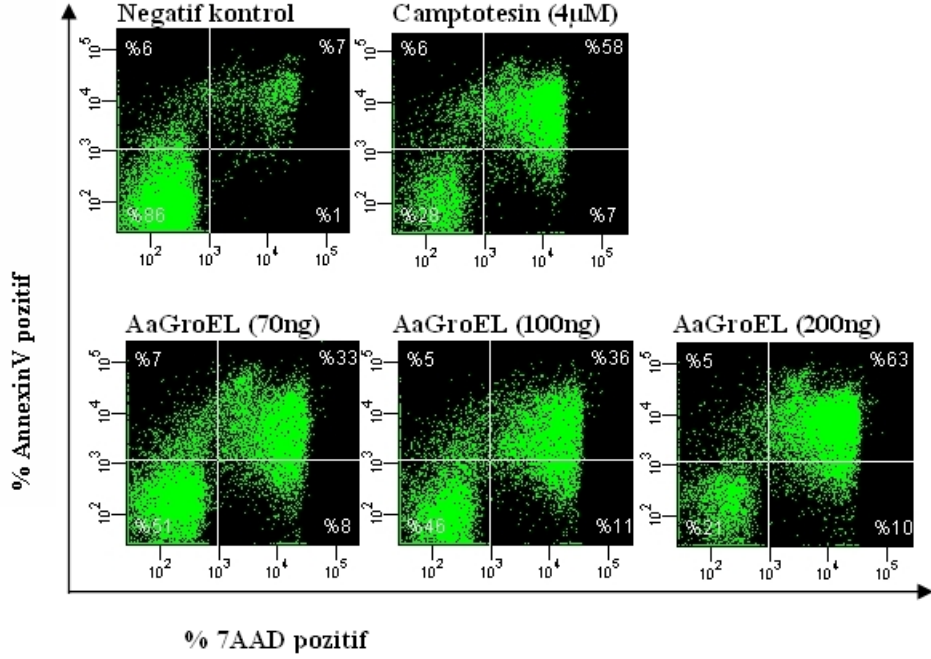
AaGroEL proteinin antijenik yanıtının belirlenmesi için periferik kandan izole edilen T lenfosit hücreleri ve Jurkat T hücreleri (Jurkat T cell lymphoma cell line) kullanılmıştır.

Apoptozun analizi için hücreler kültür sonunda Annexin V-7AAD antikoru ile boyanarak akım sitometrisinde okutulup data analizi yapılmıştır. Literatürde şu ana kadar yapılan çalışmalarda AaGroEL proteinin T hücrelerinde ya da herhangi bir diğer hücre hattında apoptotik etkisi gösterilmemiştir. Sadece epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olabileceği belirtilmiştir.

Yapılan deneylerde AaGroEL proteininin doza bağımlı olarak hem periferik kandan izole edilen T lenfosit hücreleri (Figür 13a ve 13b) ve Jurkat T hücreleri apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Figür 14). Figür 13a’te görüldüğü gibi; PBMC hücreleriyle yapılan kültürlerde 72 saat sonunda, negatif kontrolün (sadece RPMI) kullanıldığı yerde apoptoz oranı yani hücrelerin %15 AnnexinV+ olduğu halde, EE-AaGroEL proteininin (200ng) eklendiği kültürlerde apoptoz oranı %68’e ulaşmıştır. Aynı deney seti içinde elektroelutionda kullanılan elution buffer’ın (EB) eklenmesi ile %20 AnnexinV+ hücreler görülürken bu oranın negatif kontrollerdeki kadar olduğu kullanılan solusyonun antijen varlığındaki apoptoz oranını etkilemediği görülmüştür. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan Kamptotesinin varlığında ise hücreler % 59 AnnexinV pozitifdir. AaGroEL antijeninin apoptoz etkisi oldukça etkindir. Figür 13b’de AaGroEL dozuna bağlı lenfosit apoptozunun akım sitometrisinde elde edilen analiz datasını göstermektedir.



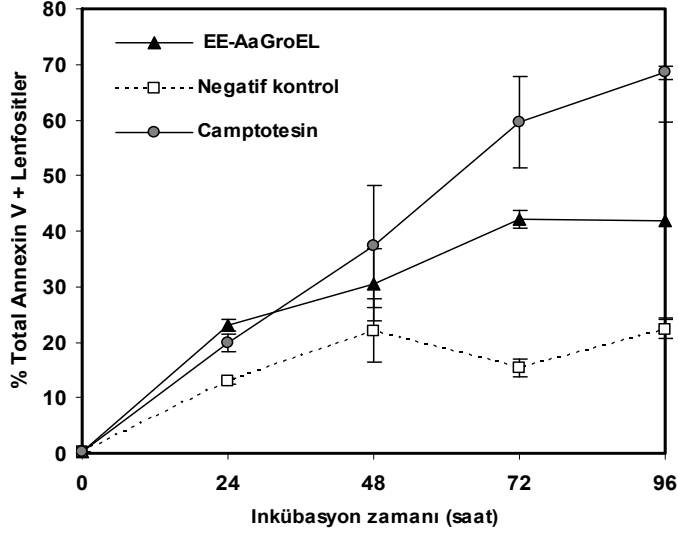
FIGÜR 13a : EE-AaGroEL proteinin PBMC hücreleri üzerindeki doza bağlı apoptotik etkisi. Periferik kandan izole edilmiş PBMC’ler EE-AaGroEL ve Kamptotesin ile 72 saat kültüre alınmıştır, negatif kontrol olarak yalnızca RPMI ve elektroelution buffer kullanılmıştır. 72 saat sonunda hücreler AnnexinV-7AAD ile boyanarak Akım sitometrisinde okutulmuş ve lenfosit popülasyonu seçilerek analiz edilmiştir. Herbir gruptaki antijen ile kültüre konan hücreler üç set halinde yapılmıştır. Negatif kontrol kültürlerindeki apoptoz ile antijenin var olduğu kültürlerdeki apoptoz miktarı Student T-test kullanılarak karşılaştırılmış ve T-testin istatistiksel açıdan önemli olduğu yerler asterik ile gösterilmiştir (* p<0.05).



FİĞÜR 13b: AaGroEL dozuna bağlı lenfosit apoptozunun akım sitometri datası.

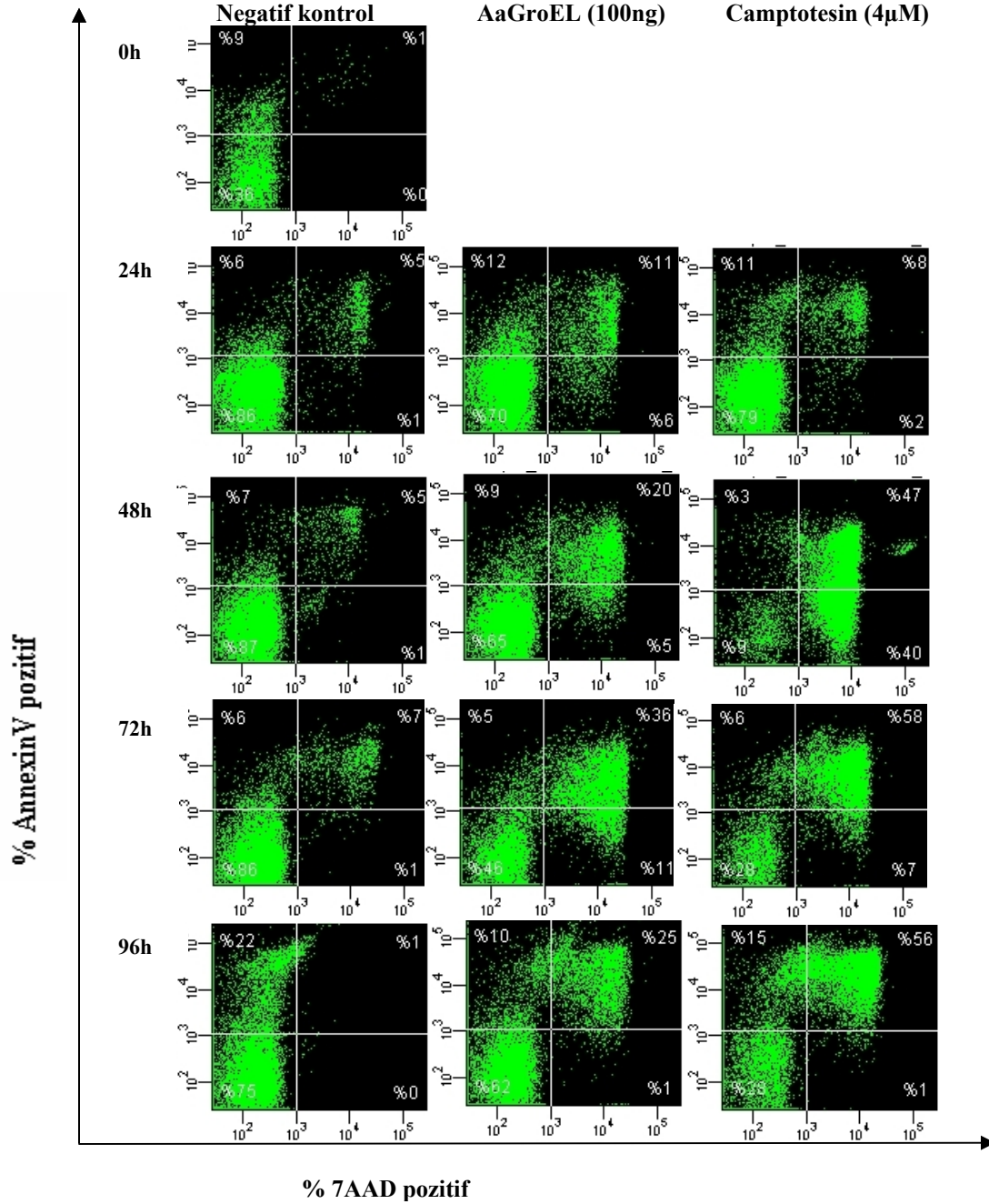
PBMC hücreleri EE-AaGroEL (70ng-100ng-200ng) ile 72 saat kültüre koyulmuştur. Negatif kontrol olarak yalnızca RPMI, pozitif kontrol olarak Camptotesin (4µM) kullanılmıştır. Kültür sonunda hücreler AnnexinV-7AAD ile işaretlenmiş ve akım sitometrisi ile analiz edilmiştir.

Ayrıca EE-AaGroEL (100ng) proteininin zamana bağlı olarak apoptotik etkisini göstermek için PBMC'ler 0 ile 96 saatlik zamanda diliminde kültüre konularak apoptoz miktarı ölçülmüştür (Figür 14a ve 14b). Belirlenen zaman aralıkları ile kültürün sonlandırılmasının ardından Annexin V ve 7AAD markörleri ile hücreler işaretlenmiş ve akım sitometrisinde okutularak data analiz edilmiştir. Figür 15a'de görüldüğü gibi aynı dozdaki antijenik stimulasyonu takiben zamana bağlı olarak apoptoz miktarında artış gözlenmiş ve apoptoz oranı 72 saatte %40'a ulaşmıştır. 96 saatte AnnexinV pozitif olan hücrelerin miktarında 72 saate göre değişiklik olmamıştır. Kültür süresince negatif kontrollerde apoptoz oranı çok değişmeyip yaklaşık olarak %20'nin altında kalmıştır. Kamptotesinin pozitif kontrol olarak kullanıldığı kültürlerde zamana bağlı artış devam etmiş olup 96 saatte %70 civarına ulaşmıştır (Figür 14a).



FİĞÜR 14a : EE-AaGroEL proteinin zamana bağlı lenfosit apoptozu.

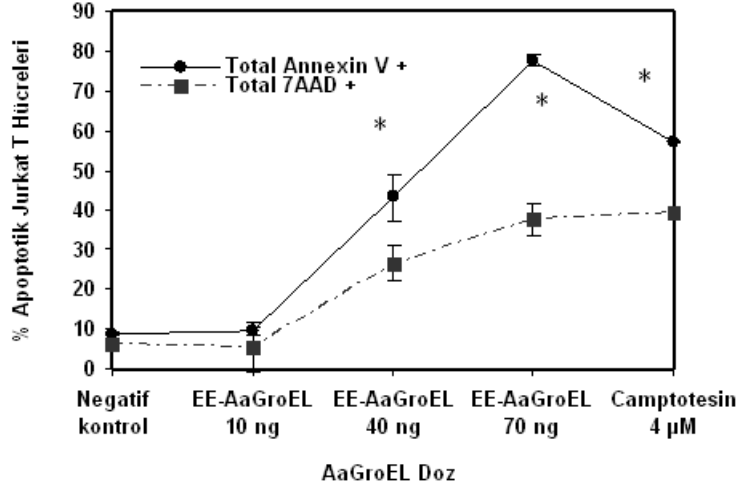
Periferik kandan izole edilen PBMC'ler kullanılarak EE-AaGroEL proteini (100ng), kamptotesin (4 μ M) ve negatif kontrol olarak sadece RPMI kültüre alınmıştır. Zaman bağımlı olarak lenfosit hücrelerindeki apoptoz oranı AnnexinV-7AAD ile işaretlenerek akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Datanın istatistiksel analizini yapmak için örnekler üç set yapılmıştır. Datanın istatistiksel olarak önemli olduğu yerlere asterik konulmuştur (* p<0,05).



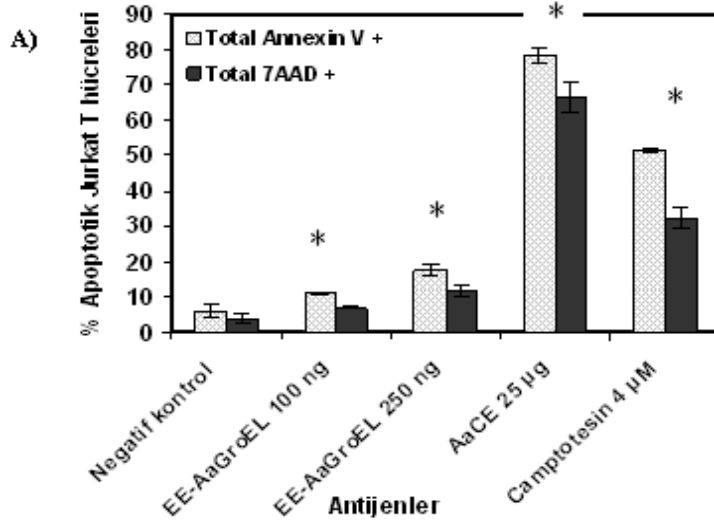
FIGÜR 14b: EE-AaGroEL proteinin lenfositler üzerindeki zamana bağlı apoptoz etkisinin akım sitometri datası

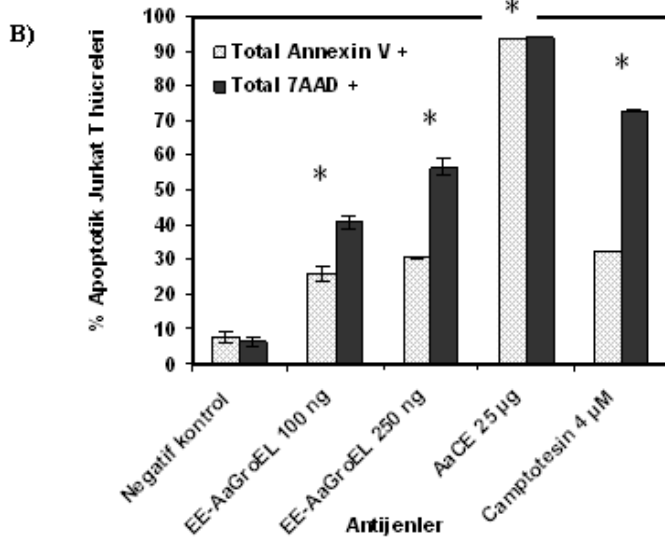
EE-AaGroEL proteini Jurkat T hücreleri ile 48 saat kültüre alındığında, hücrelerin AnnexinV ve 7AAD boyamasıyla ölçülen apoptoz miktarı %77 AnnexinV ve %37 7AAD pozitifdir, negatif kontrollerdeki hücreler ise % 8 AnnexinV pozitif ve % 6 7AAD pozitif olarak kalmıştır (Figür 15a). AaGroEL tarafından indüklenen apoptoz sadece periferal kandaki lenfositlerde değil Jurkat T hücrelerinde de görülmektedir. Jurkat T

hücrelerinde gözlenen apoptoz miktarı hem AaGroEL miktarına hem de zamana bağlıdır (Figür 16a ve 16b).



FIGÜR 15 : EE-AaGroEL proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki doza bağlı apoptotik etkisi. Jurkat T hücreleri EE-AaGroEL ve Kamptotesin ile 48 saat kültüre alınmıştır ve sadece RPMI ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat sonunda hücreler AnnexinV-7AAD ile boyanarak akım sitometrisinde okutulup data analizi yapılmıştır. Datanın standart sapma (SD) ve T-testinin hesaplanması için örnekler üç set halinde kültüre konulmuştur. Datanın istatistiksel olarak önemli olduğu yerlere asterik konulmuştur (* p<0,05).

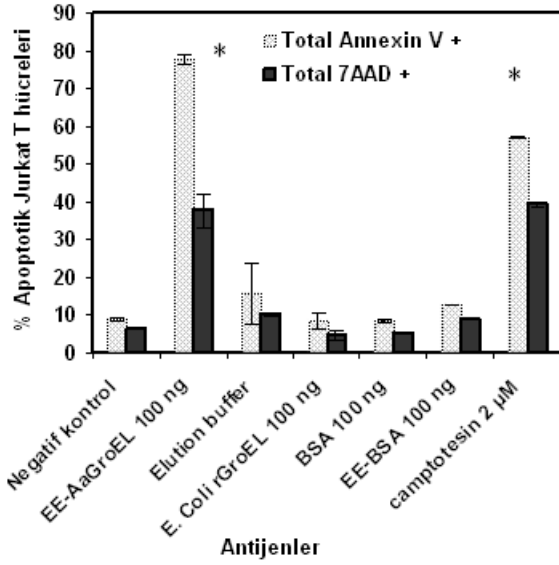




FIGÜR 16: EE-AaGroEL proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki doz ve zamana bağlı apoptotik etkisi.

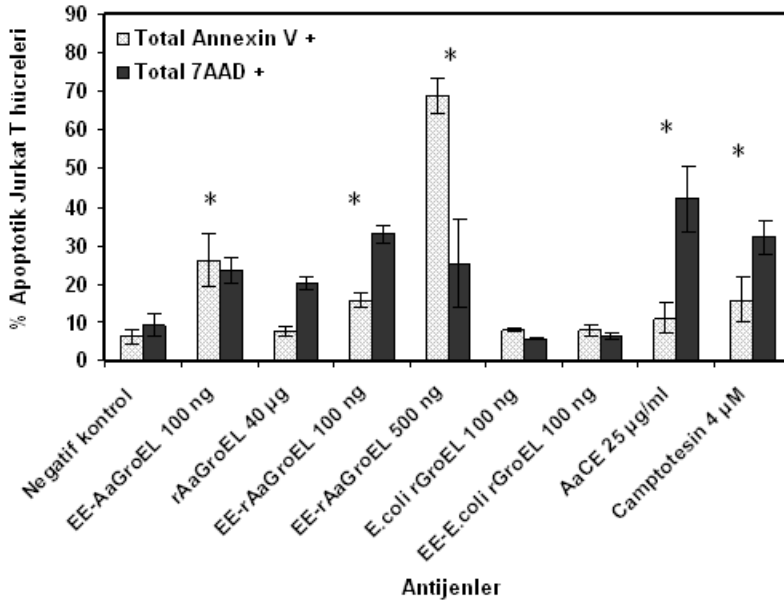
Jurkat T hücreleri EE-AaGroEL proteini (100 ng, 250 ng), Aa CE (25µg), pozitif kontrol olarak camptotesin (4 µM) kullanılarak kültüre koyulmuştur. Hücreler 24 saat (Figür 16A) ve 48 saat (Figür 16B) kültür sonunda Annexin V-7AAD ile işaretlenerek akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Datanın istatistiksel analizini yapmak için örnekler üç set yapılmıştır. Datanın istatistiksel olarak önemli olduğu yerlere asterik konulmuştur (* p<0.05).

Elektroelute edilen AaGroEL proteinin apoptotik aktivitesinin olduğu bu apoptotik etkinin hem zamana hemde doza bağlı olarak arttığı yukarıdaki figürlerde gösterilmiştir. Ayrıca gözlenen bu apoptozun negatif kontrollerdeki hücrelerin apoptozu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ölüm olduğu yapılan T-testi sonuçları ile ortaya konmuştur. EE-AaGroEL proteinin apoptotik yanıtının ve antijenik aktivitesinin purifikasyon aşamalarından kaynaklanan bir kontaminasyon sonucu olup olmadığını anlamak adına da yapılan deneyler apoptozun AaGroEL antijen varlığında indüklendiğini göstermiştir (Figür 17, Figür 18a ve 18b). Purifikasyon aşamalarının etkisini anlamak için, AaGroEL proteinin izolasyonuna eş zamanlı olarak antijenik etkisi olmadığı bilinen *E.coli* rGroEL ve BSA proteinide SDS jelden elektroelute edilmiş ve hücre kültüründe Jurkat T hücreleri üzerindeki etkileri ölçülmüştür (Figür 17, Figür 18a ve 18b). Figürlerde görüldüğü gibi Elektroelute edilmiş gerek *E.coli*-GroEL gerekse BSA proteinin fonksiyonunda bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Bu da elektroelution işlemlerinin ve bu işlemler sırasında kullanılan solusyonların apoptotik bir etkisi olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla apoptotik etki AaGroEL proteininden kaynaklanmaktadır.



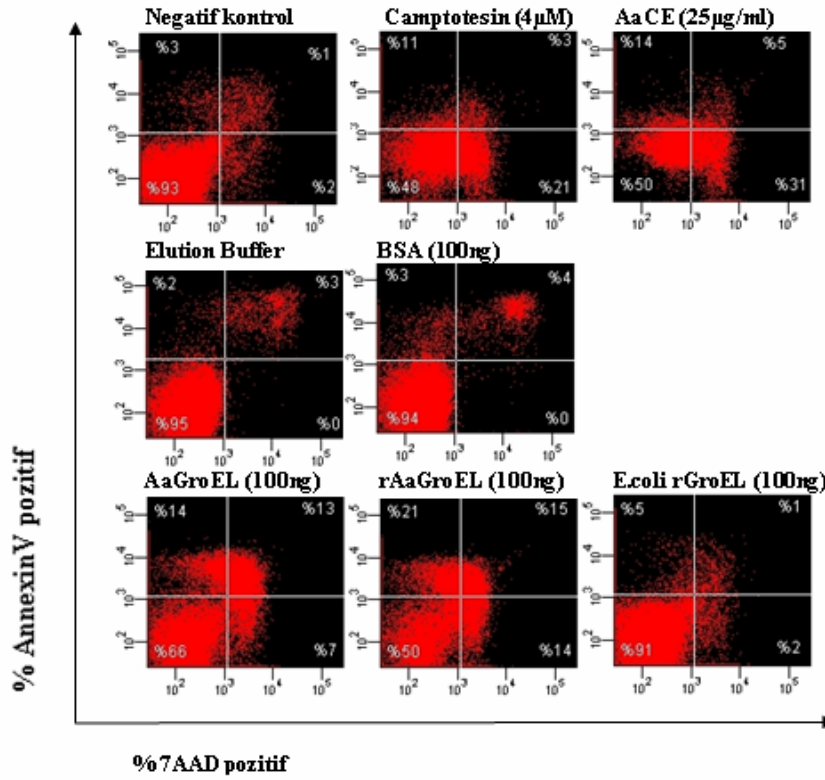
FIGÜR 17 : EE-AaGroEL, E.coli-rGroEL ve BSA proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.

Jurkat T hücreleri EE-AaGroEL (100ng), Elution buffer, E.coli rGroEL (100 ng), BSA (100ng), Elektroelute edilmiş BSA (100 ng) ve Campptotesin (2µM) ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler kültür sonunda Annexin V-7AAD ile işaretlenerek akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Datanın istatistiksel analizini yapmak için örnekler üç set yapılmıştır. Datanın istatistiksel olarak önemli olduğu yerlere asterik konulmuştur (* p<0,05).



FIGÜR 18a: EE-AaGroEL, E.coli-rGroEL proteinlerinin Jurkat T hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.

Jurkat T hücreleri EE-AaGroEL (100ng), rAaGroEL (40µg), Elektroelute edilmiş rAaGroEL (100 ng, 500 ng), *E.coli* rGroEL (100 ng), Elektroelute edilmiş *E.coli* rGroEL (100 ng), AaCE (25µg) ve Camptotesin (4µM) ile 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve hücreler kültür sonunda Annexin V-7AAD ile işaretlenerek akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Datanın istatistiksel analizini yapmak için örnekler üç set yapılmıştır. Datanın istatistiksel olarak önemli olduğu yerlere asterik konulmuştur (* p<0,05).



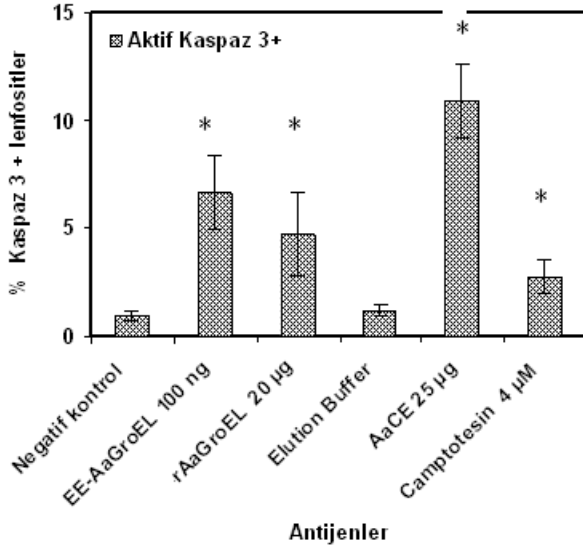
FIGÜR 18b: Farklı proteinlerin Jurkat T hücrelerindeki apoptozunun akım sitometri datası

Jurkat T hücreleri antijenler ile 48 saat kültüre koyulmuştur. Negatif kontrol olarak yalnızca RPMI, pozitif kontrol olarak camptotesin (4μM) ve antijen olarak; AaGroEL (100ng), rAaGroEL (100ng) kullanılmıştır. Yapılan deneyde Elution buffer, EE-BSA (100ng) ve EE-*E.coli* rGroEL (100ng) antijenlerimizin negatif kontrolü olarak kullanılmıştır. 48 saatin sonunda hücreler AnnexinV-7AAD ile işaretlenmiş ve akım sitometrisi ile analiz edilmiştir.

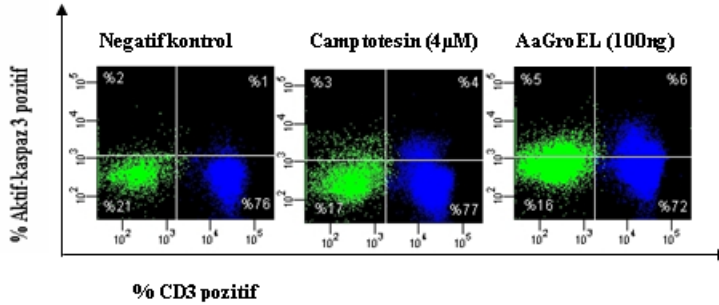
C2. T Hücre Apoptozunun Aktif-Kaspaz 3 İle Ölçülmesi

Apoptozun deneysel olarak ölçülmesinde aktif-kaspaz 3 varlığının tespit edilmesi önemli bir veridir. Bu bağlamda apoptozun ileri aşamalarında hem ölüm reseptörleri hemde mitokondriyal yolak ile aktifleşen kaspaz-3 enziminin varlığı, EE-AaGroEL proteininin indüklediği T hücre apoptozunda akım sitometrisi ile ölçülmüştür. Antijen, pozitif ve negatif kontrol varlığında kültüre konan hücreler kültür zamanının bitiminde önce hücre yüzey markörleriyle işaretlenmiştir (örneğin T hücreleri için CD3 antikoru kullanılmıştır). Bunu takiben hücreler fix ve perm edilerek aktif-kaspaz 3 eklenmiştir daha sonra hücreler akım sitometrisi ile okutulmuş ve data analiz edilmiştir. 48 saatlik PBMC kültürlerinde EE-AaGroEL varlığında T hücrelerinin %7'si aktif-kaspaz-3 pozitif olurken bu miktar negatif kültürlerdeki T hücrelerinde %1'de kalmıştır. Aynı şekilde EE-rAaGroEL de T hücrelerindeki aktif-kaspaz 3 miktarını %5 çıkarmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan kamptotesinli kültürlerde ise aktif-kaspaz-3 miktarı %3 civarında kalmıştır. Antijen varlığında ölçülen aktif-kaspaz-3 miktarı negatif kontrollerle karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak önemlidir ve bu farkın önemli olduğu yerler asterik ile gösterilmiştir (Figür 19a ve 19b). EEAAgroEL veya rAaGroEL

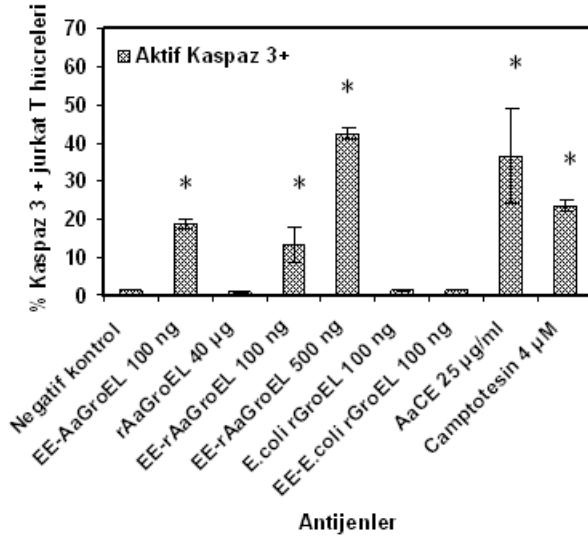
antijenleri tarafından indüklenen apoptozda aktif-kaspaz-3 varlığı Jurkat T hücre hattında da gösterilmiştir (Figür 20a ve 20b).



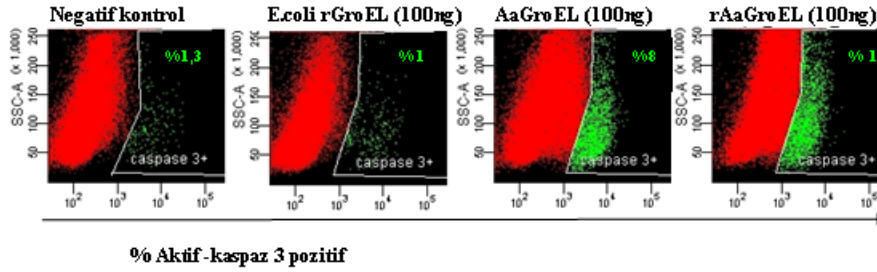
FIGÜR 19a: AaGroEL proteinin T hücrelerindeki apoptozunun Aktif-kaspaz 3 miktarı ile ölçülmesi. Periferik kandan izole edilen PBMC'ler EE-AaGroEL (100ng), rAaGroEL (40µg), Elektroelute edilmiş rAaGroEL (100 ng, 500 ng), *E.coli* rGroEL (100 ng), Elektroelute edilmiş *E.coli* rGroEL (100 ng), AaCE (25µg) ve Camptotesin (4µM) ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnızca RPMI kullanılmış ve elution buffer da purifikasyon aşamalarının kontrolü olarak kullanılmıştır. Kültür sonunda hücreler önce T hücre yüzey markörü CD3 ile boyanmış ve akabinde hücreler fix ve perm edildikten sonra aktifkaspaz-3 eklenmesi ile boyamaya devam edilmiş ve hücreler akım sitometrisinde okutulup data analiz edilmiştir. Datanın istatistiksel analizini yapmak için örnekler üç set yapılmıştır. Datanın istatistiksel olarak önemli olduğu yerlere asterik konulmuştur (* p<0,05).



FIGÜR 19b: AaGroEL'in T hücre apoptozunun Aktif-kaspaz 3 ile ölçümünün akım sitometri datası. Periferik kandan izole edilmiş PBMC hücreleri AaGroEL protein (100ng) ile 48 saat kültüre koyulmuştur. Kültür sonunda hücreler CD3, Aktif-kaspaz 3 antikorları ile boyanmış ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir.



FİĞÜR 20a: AaGroEL proteinin Jurkat T hücreleri üzerindeki etkisinin Aktif-Kaspaz 3 ile ölçülmesi
Jurkat T hücreleri EE-AaGroEL (100ng), rAaGroEL (40µg), Elektroelute edilmiş rAaGroEL (100 ng, 500 ng), *E.coli* rGroEL (100 ng), Elektroelute edilmiş *E.coli* rGroEL (100 ng), AaCE (25µg) ve Camptotesin (4µM) ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnızca RPMI kullanılmıştır. Kültür sonunda hücreler aktif-kaspaz 3 ile boyanarak akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Deneyin istatistiksel olarak anlamlı olması için örnekler üç set yapılmıştır (* p<0,05).

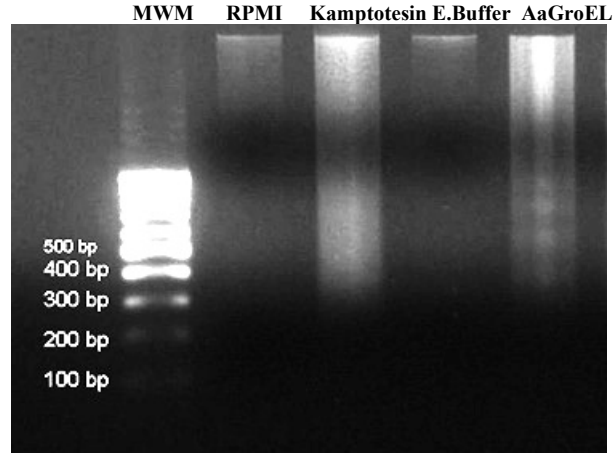


FİĞÜR 20b: Jurkat T hücrelerinde AaGroEL antijenine bağımlı Aktif-kaspaz 3 miktarını gösteren akım sitometri datası.

Jurkat T hücreleri AaGroEL (100ng), rAaGroEL (100ng) proteinini ile 48 saat kültüre koyulmuştur. Negatif kontrol olarak yalnızca RPMI, antijenlerin kontrolü olarak ise EE-*E.coli* rGroEL (100ng) kullanılmıştır. Kültür sonunda hücreler CD3, Aktif-kaspaz 3 antikorları ile boyanmış ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

C3. T Hücre Apoptozunun DNA Fragmentasyonu ile Ölçülmesi

DNA fragmentasyonu apoptotik proseste en ileri aşamadır. Apoptoza birbirine bağlı biyokimyasal olaylar zincirinin oluşumu olarak bakıldığında, DNA'nın parçalanması en önemli sonuçtur. Aktif-kaspaz 3 aktivasyonunu tabiken aktifleşen endonükleazların DNA'nın yaklaşık her bir 180bp dan bir parça oluşmasına neden olurlar ve bu olayda agoroz jelde görüntülenebilir. Bu deneyde Jurkat T hücrelerini hazırladığımız antijenlerle 48 saatlik kültüre koyuldu, kültür sonunda DNA izolasyon prosedürünü izleyerek DNA izole edildi ve jelde yürütüldü ve EtBr eklenip jel dökümantasyon cihazıyla görüntüledi (Figür 21). Figür 21'de görüldüğü gibi AaGroEL'in bulunduğu kültürden gelen DNA'da parçalanma gözlenmektedir.



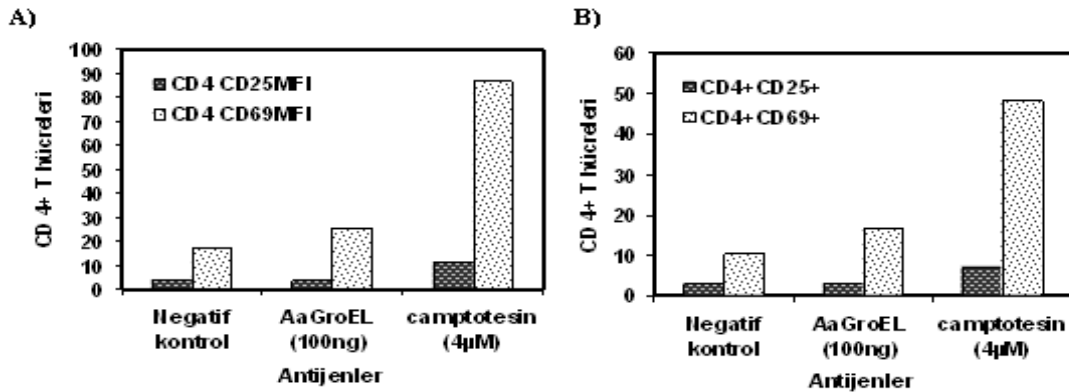
FİĞÜR 21: DNA fragmentasyonun agaroz jel görüntüsü.

Jurkat T hücreleri 48 saat boyunca antijenlerle kültüre koyulmuştur. DNA parçalanmasının ölçülmesi için kültürlerin sonlandırılmasının ardından hücrelerden DNA izole edilmiş, DNA miktarları Nanodrapta ölçülmüş ve eşit miktarda DNA kuyucuklara yüklenmiş ve örnekler % 1,7 Agaroz jelde 50V 60 dk yürütülmüş ve jel görüntülenmiştir. Yüklenen örnekler sırasıyla 1; Markör, 2; Negatif kontrol (yalnızca RPMI), 3; Camptotesin (1 μ M), 4; Elusyon buffer, 5; EE-AaGroEL (100 ng)

D. AaGroEL Proteinine Yanıt Oluşturan T Hücre Fenotipinin Belirlenmesi

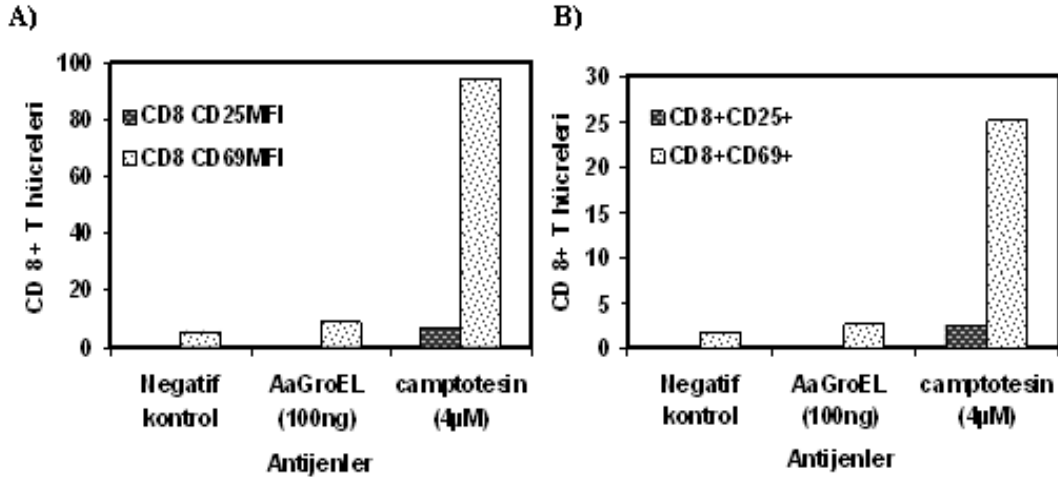
D1. T Hücre Altgruplarının ve Aktivasyon Markörlerinin Belirlenmesi

EE-AaGroEL proteininin hangi T hücre altgrubu üzerinde etkili olduğunu göstermek için CD4+ veya CD8+T hücrelerinde CD25 (IL-2 reseptörü) ve CD69 (erken aktivasyon markörü) moleküllerinin ekspresyonu ölçülmüştür. Figür 22’de görüldüğü gibi AaGroEL proteini ile stimüle edilen kültürlerde CD4+T lenfositlerinin CD69 ekspresyonunun %20 lere ulaşırken CD8+T hücrelerinde ise %2 civarında kalmıştır. CD25 markörünün CD4+ T hücreleri tarafından az miktarda ekspresyonu yanında bu markör CD8+T hücrelerinde saptanmamıştır (Figür 22 ve 23).



FİĞÜR 22: CD4+ T hücrelerinde CD25 ve CD69 ekspresyonu

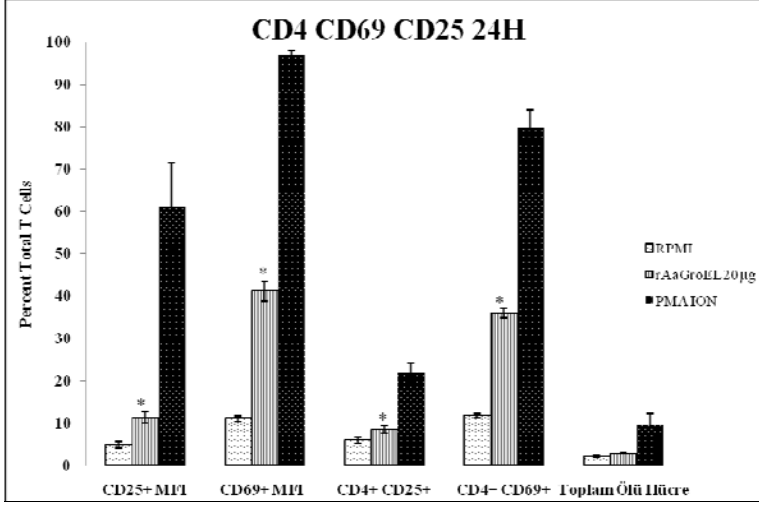
Periferik kandan izole edilen PBMC’ler AaGroEL proteini (100ng) ile 48 saat kültüre koyulmuştur. Kültür sonunda hücreler CD4, CD25 ve CD69 fenotip antikorları ile işaretlenmiş ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir. Figür A, antikorun floresan yoğunluğunu, Figür B ise % pozitif hücre popülasyonunu göstermektedir.



FIGÜR 23: CD8+ T hücrelerinde CD25 ve CD69 ekspresyonu

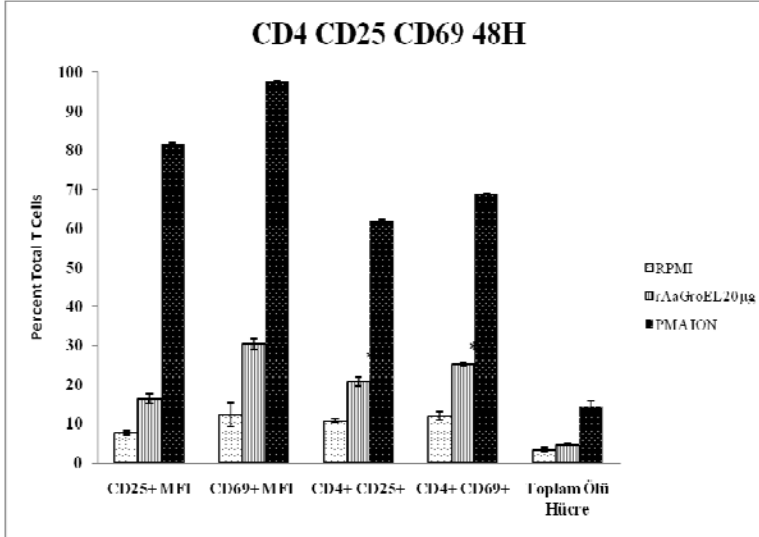
Periferik kandan izole edilen PBMC'ler AaGroEL proteini (100ng) ile 48 saat kültüre koyulmuştur. Kültür sonunda hücreler CD8, CD25 ve CD69 fenotip antikorları ile işaretlenmiş ve akım sitometrisinde analiz edilmiştir. . Figür A, antikorun floresan yoğunluğunu, Figür B ise % pozitif hücre popülasyonunu göstermektedir.

EE-AaGroEL ile elde edilen sonuçlardan sonra, rAaGroEL protein ile PBMC hücreleri kültüre konmuş ve kültürün tamamlanmasını takiben CD4, CD8, CD25 ve CD69 gibi hücre yüzey markörleri ile işaretlenen hücreler FACSarray akış sisteminde okutulup data analiz edilmiştir. Bu deneylerde, RPMI negatif kontrol olarak PMA ve Ionomycin ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Figür 24'te görüldüğü gibi, 24. saatte CD4+T hücrelerinde hem CD69 (%35) hem de CD25 (%10) markörlerinin ifadesi rAaGroEL ile artmıştır (Figür 24). rAaGroEL ile stimüle edilmiş 48 saatlik kültürlerde CD4+T lenfositlerinin CD69 miktarı %20'ye düşerken CD25 markörünün ifadesi %20'nin üzerine çıkmıştır (Figür 25).



FIGÜR 24: rAaGroEL proteinine yanıt oluşturan CD4+T hücre altgrupları (24 Saat)

rAaGroEL proteinini (20µg/ml) PBMC hücreleri ile 24 saatlik kültüre konulmuştur. Kültür sonunda hücreler CD4, CD25 ve CD69 hücre yüzey markörleri ile işaretlenerek FACSarray akış sitometri cihazında okutulup analiz edilmiştir. Hücre kültürü besiyeri olan RPMI negatif kontrol olarak kullanılırken PMA ve Ionomycin ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (* p< 0.05).

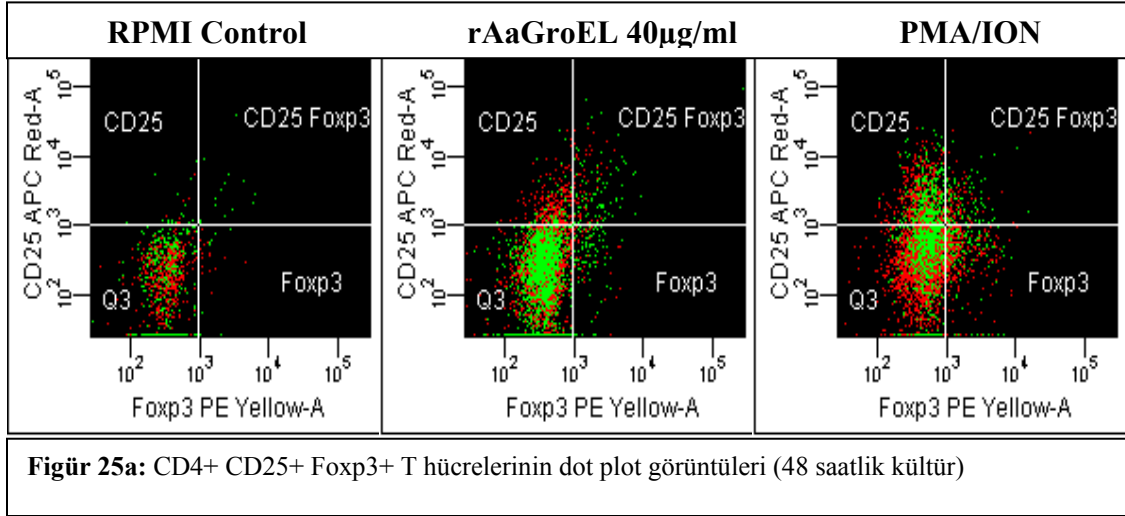


FIGÜR 25: rAaGroEL proteinine yanıt oluşturan CD4+T hücre altgrupları (48 Saat)

rAaGroEL proteinini (20µg/ml) PBMC hücreleri ile 48 saatlik kültüre konulmuştur. Kültürü takiben CD4, CD25 ve CD69 hücre yüzey markörleri ile işaretlenen hücreler akım sitometrisinde okutulup data analiz edilmiştir. Negatif kontrol olarak RPMI pozitif kontrol olarak da PMA/Ionomycin kombinasyonu kullanılmıştır. (* p<0.05)

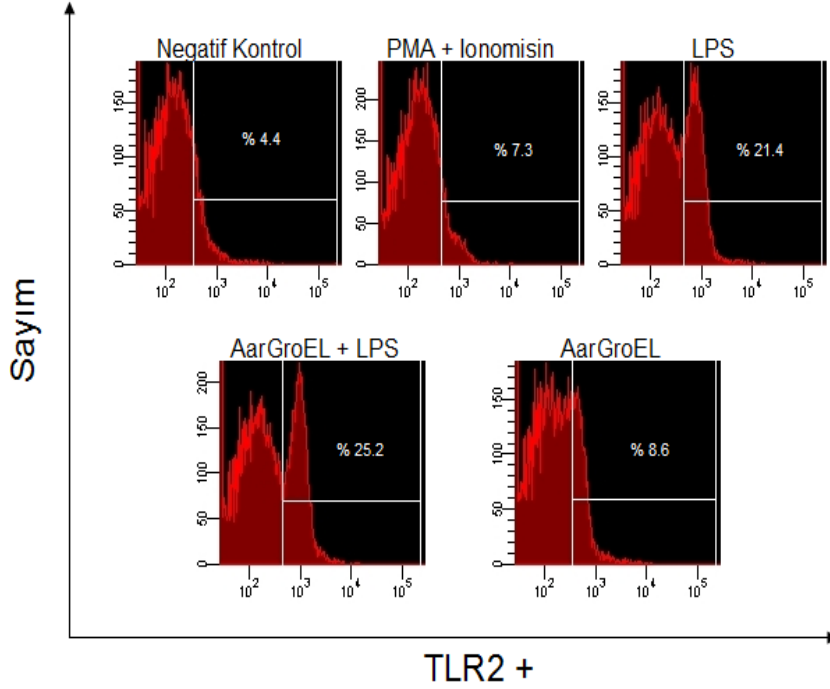
D2. Regülatör T Hücre Fenotipinin Belirlenmesi

Rekombinant AaGroEL proteininin CD4 pozitif T hücrelerini aktif hale getirdiği CD69 ve CD25 ekspresyonunu artırdığını tespit ettikten sonra, aktif hale gelen T hücrelerinin düzenleyici T hücreleri (Treg) olup olmadığını anlamak için hücre yüzey markörleri ile birlikte hücreler foxp3 transkripsiyon markörü ile de boyandı. AaGroEL ile stimüle edilen CD4+CD25+T hücrelerinin aynı zamanda da Foxp3 pozitif olduğu görülmüştür (Figür 25a).



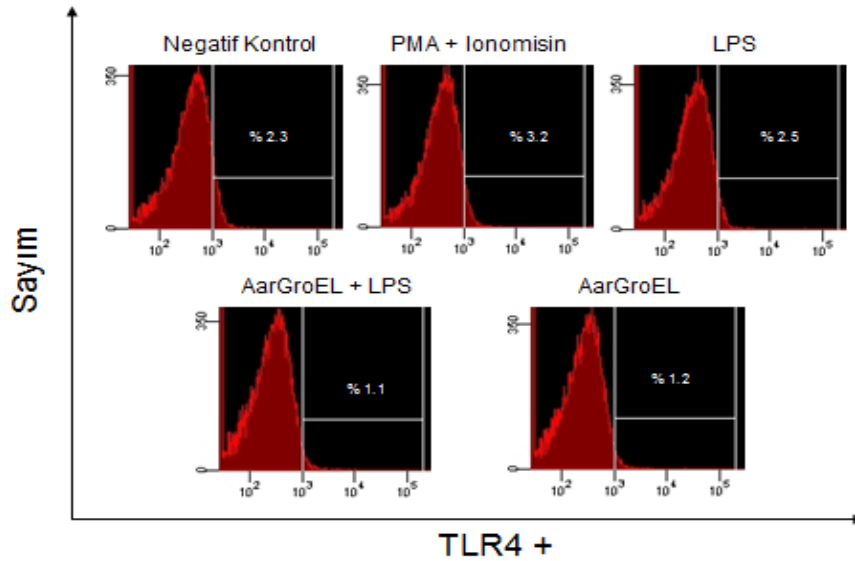
D3. T Hücrelerinin TLR-2 ve TLR-4 Ekspresyonlarının Ölçülmesi

PBMC'ler antijen, negatif ve pozitif kontrol varlığında kültüre konmuş ve kültür bitimini takiben hücreler yıkanmış ve oluşan hücre pelletlerinin üzerine değişik kombinasyonlarda florasanla işaretlenmiş TLR2, TLR4, CD4, CD8 ve CD25 antikolar eklenmiş boyama prosedürü gerçekleştirilip hücreler akım sitometri cihazında okutulup data analizleri yapılmıştır. AaGroEL ile stimüle edilen lenfositlerin TLR2 ekspresyonunun negative kültürlerde %4 civarında olmasına rağmen %8.6' da kalmıştır. LPS varlığında bu molekülün ekspresyon miktarı %21 iken LPS ile AaGroEL birlikte kültüre konduğunda bu miktarda %25' e ulaşmıştır (Figür 26). AaGroEL proteinin TLR2 aracılığı ile T hücrelerini aktive etme olasılığını düşündürmektedir. Ancak TLR2 miktarının T hücre altgruplarında bakılması da gerekmektedir. Aynı kültürlerde AaGroEL proteinin varlığında lenfositler üzerinde TLR4 ekspresyonu açısından herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Figür 27).



Figür 26. Lenfositlerin TLR2 Ekspresyonu

PBMC'ler rAaGroEL (5µg) ve LPS (100ng) ile 72 saat boyunca RPMI 1640 kültür ortamında inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnız RPMI 1640, pozitif kontrol olarak da Ionomisin (1µg/ml) ve PMA (25ng/ml) kullanılmıştır. Hücreler inkübasyondan sonra CD4 ve TLR2 moleküler antikorlarıyla işaretlenmiş ve FACsArray'de analizleri yapılmıştır.

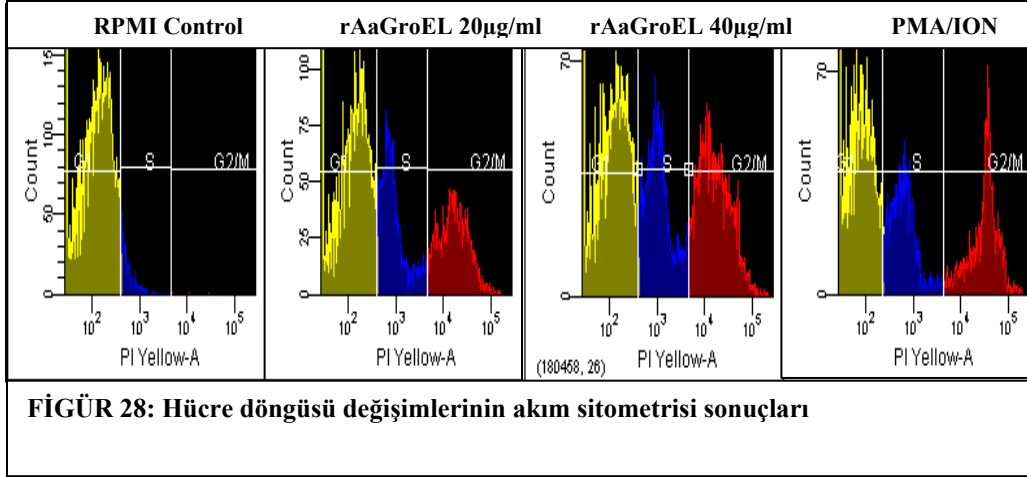


Figür 27. Lenfositlerin TLR4 Ekspresyonu .

PBMC'ler rAaGroEL (5µg) ve LPS (100ng) ile 72 saat boyunca RPMI 1640 kültür ortamında inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak yalnız RPMI 1640, pozitif kontrol olarak da Ionomisin (1µg/ml) ve PMA (25ng/ml) kullanılmıştır. Hücreler inkübasyondan sonra CD4 ve TLR4 moleküler antikorlarıyla işaretlenmiş ve FACsArray'de analizleri yapılmıştır.

D4. rAaGroEL Proteininin Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Ölçülmesi

rAaGroEL proteininin T hücrelerinin proliferasyonuna neden olup olmadığını anlamak için antijen varlığında PMBC'ler kültüre konulmuştur. Kültür sonunda hücreler hem CD3 hemde PI ile boyanarak hücrelerin 48 saat kültür sonunda ulaştıkları hücre döngüsü evreleri ölçülmüştür. rAaGroEL ile stimüle edilen kültürlerde çok sayıdaki hücrelerin negatif kontrol kültürlerine göre S ve G2/M fazına geçtikleri ve bunun da doza bağlı olduğu gözlenmiştir (Figür 28).



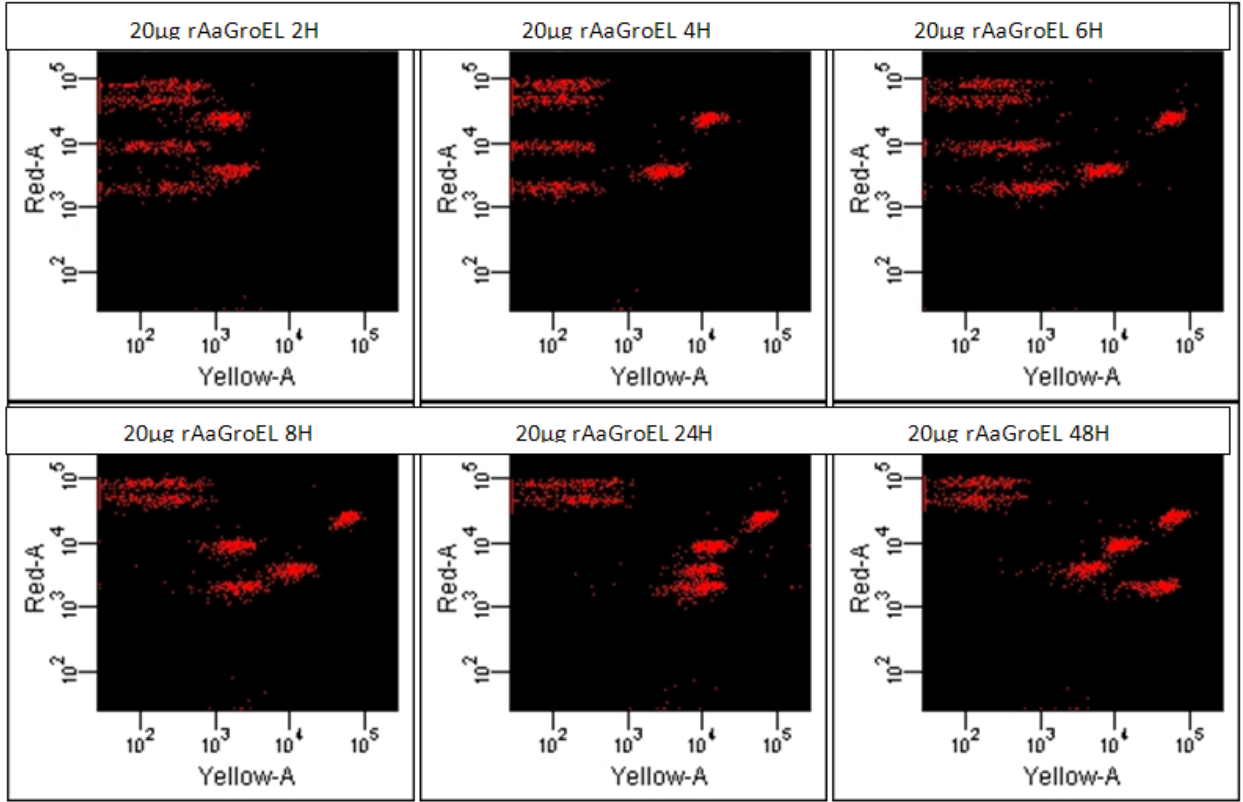
E. AaGroEL proteine yanıt olarak ekspres edilen sitokinlerin tayini

E1. Cytometric Bead Array (CBA) Tekniği ile Hücre Süpernatantlarının Sitokin Profiline Bakılması

Yukarıdaki sonuçlardan görüldüğü gibi AaGroEL varlığında kültüre konulan PMBC'lerde T hücreleri proliferasyon göstermiş CD69 ve CD25 molekül ekspresyonunu arttırmıştır. Dolayısıyla antijene verilen immun yanıtta proliferasyon ve aktivasyonu takiben hücreler farklılaşarak sitokin ekspresyonunu ederek immun yanıtı regüle edebilirler. AaGroEL proteininin T hücreleri üzerindeki etkilerini anlamak için sitokin profillemesi oldukça önemlidir.

Bu bağlamda, kültür bitimini takiben ortama salınan sitokinleri ölçmek için BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II adı verilen kit kullanılmıştır. Bu kit ile IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFNγ sitokinlerine bakılmıştır. CBA deneyinde farklı floresan şiddete sahip 6 boncuk popülasyonunun her birinin yüzeyinde farklı sitokin antikoru yer almaktadır. Bu antikolar aşağıdan yukarıya sırasıyla; IFNγ, TNFα, IL-10, IL-6, IL-4 ve IL-2 sitokinlerine spesifiktir. Bu altı boncuk popülasyonu kültür süpernatanı ile inkübe edildikten sonra sarı dalga boyunda (PE) ışımaya veren antikor ile işaretlenerek akım sitometrisinde analiz edilir. Dolayısıyla ortamda ne kadar çok sitokin var ise boncuklar o derecede daha şiddetli sarı dalga boyunda ışımaya vermektedir. Figür 29'da 20µg/ml rAaGroEL proteini ile stimüle edilmiş PMBC hücre süpernatantlarındaki sitokin miktarları gözükmektedir. Özellikle ilk saatlerde (6 saate kadar) TNFα ve IL-6 diğerlerine göre çok miktarda olup daha sonraki saatlerde (24 ve 48 saat) IL-10 ve IFNγ

sitokinlerinin de ortama salındıkları tespit edilmiştir. IL-2 ve IL-4 sitokinleri ise kültür süpernatantlarında tekrar edilen deneylerde de ölçülememiştir (Figür 29).



FIGÜR 29: rAaGroEL ile indüklenmiş sitokin ekspresyonunun zamana bağlı değişimi

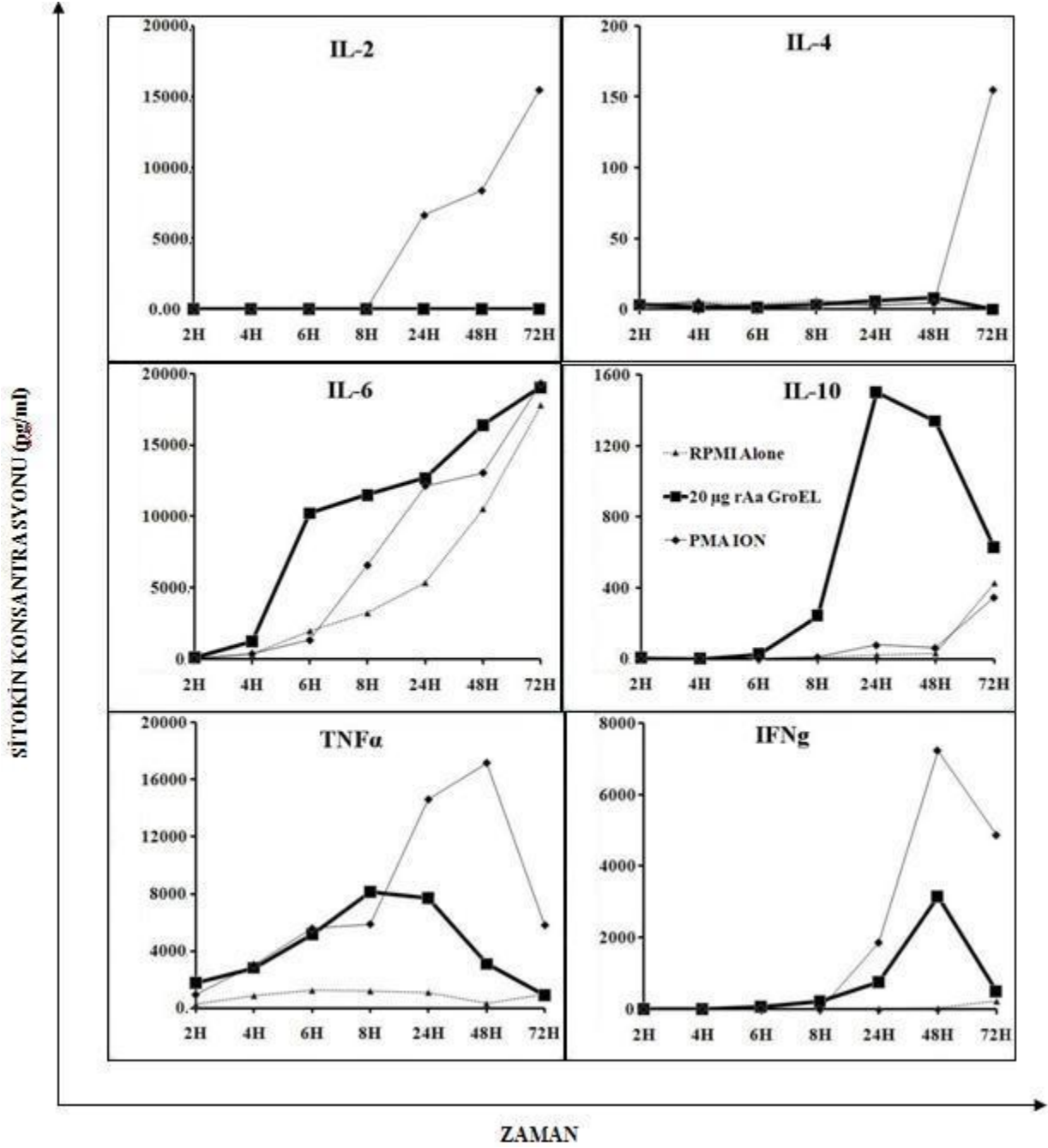
20µg/ml rAaGroEL proteini ile stimüle edilmiş PBMC hücre süpernatantlarında CBA ile ölçülen sitokin miktarlarını gösteren akım sitometri datası. Yukarıdaki sonuçlardaki boncuk populasyonu yukarıdan aşağıya şu şekildedir: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα ve IFNγ

AaGroEL proteine yanıt olarak ekspres edilen sitokinlerin zamana bağlı değişimi

CBA deneyi ile bakılabilen sitokinler olan IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNFα ve IFNγ konsantrasyonları, rAaGroEL ile indüklenmiş PBMC hücre süpernatantında 2 saat ile 72 saat arasında olarak analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak PMA ve Ionomycin karışımı, negatif kontrol olarak da RPMI kullanılmıştır (Figür 30).

Figür 30'da görüldüğü gibi IL-2 ve IL-4 miktarında AaGroEL ile stimüle edilmiş kültürlerde hiç bir değişiklik olmamış iken PMA/I ile stimüle edilmiş kültürlerde bu sitokinlerin varlığı gözlenmiştir. IL-6 ekspresyonu AaGroEL ile stimüle edilen kültürlerde zamanlı bağlı olarak artmış ve 72 saat sonunda 20000pg/ml'e ulaşmıştır. IL-6 ekspresyonu negatif kontrol kültürlerinde de artmıştır ancak bu artış AaGroEL ile stimüle edilen kültürlerinkinden daha azdır. AaGroEL ile stimüle edilen kültürlerde IL-10 miktarı 8.inci saatten sonra artmaya başlamış 24 saatte en yüksek miktara ulaşmış (1600pg/ml) ve sonra da azalmaya başlamış ve 72. saatte en düşük düzeye ulaşmıştır (500pg/ml). AaGroEL ile stimüle edilen hücrelerde TNFalfa miktarı 2.inci saatten itibaren artmaya başlamış ve 8.inci saatte en yüksek değere ulaşmış (8000pg/ml) ve daha sonra düşerek 72 saatte en düşük değere ulaşmıştır. TNFalfa miktarı negatif kontrol kültürlerinde ise zamana bağlı

olarak artmaya devam etmiştir. IFN γ miktarı ise AaGroEL ile inkübe edilen hücrelerin süpernatantında 48 saatte 3000pg/ml'e ulaşmıştır. Bu sonuçlara göre, rAaGroEL proteinini IL-6, IL-10, TNF α ve IFN γ sitokinlerinin salınımını tetiklemektedir (Figür 30).



FİGÜR 30: rAaGroEL ile indüklenmiş sitokin salınımının zamana bağlı değişimi.

CBA deneyi ile bakılabilen sitokinler olan IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α ve IFN γ konsantrasyonları, rAaGroEL ile indüklenmiş PBMC hücre süpernatantında 2-72 saat arasında analiz edilmiştir. PMA (25ng/ml) ve Ionomycin (1ug/ml) karışımı pozitif kontrol ve RPMI negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

E2. T Hücre Sitokinlerinin Hücre İçi Sitokin Boyama Metodu ile Tespiti

CBA deneyi ile ölçülen sitokinlerin hangi hücrelerden geldiği bilinmediğinden hücre içi sitokin boyaması ile hücre yüzey markörlerinin boyamasının birleştirilmesi gerekmektedir ki üretilen sitokinin hangi hücre tipinden geldiği tespit edilebilsin. Hücrede üretilen sitokin miktarını ölçmek için öncelikle sitokinlerin hücre dışına salınımını engellemek gerekmektedir. Bunun için kültürler kültür bitiminden 4 saat önce son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde protein transport inhibitörü olarak bilinen Brefeldin A eklenmiştir. Kültür bitimini takiben yıkanan hücrelere gerekli hücre yüzeyi markörleri (CD4 ve CD25) eklenerek boyama işlemi yapıldıktan sonra hücreler fiks ve perm edilmiş ve sitokin antikoları hücrelerin üzerine eklenerek inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Daha sonra hücreler akış sitometre cihazında okutulup data analiz edilmiştir. Hücre içi sitokinleri IL-2, IL-4, IFN γ , IL-10, IL-17 ve TGF β 'dan oluşmaktadır. Data analizi yapılırken herbir sitokin için önce CD4+T hücreleri arasında CD25+ olanların ekspres ettikleri sitokin miktarına bakılmış ve akabinde sitokin ekspresyonu lenfositler arasında değerlendirilmiştir.

Bu sonuçlara göre;

IFN γ : CBA deneylerinde ölçülen IFN γ , rAaGroEL ile stimüle edilen kültürlerin hücre içi sitokin boyama deneyi ile de doğrulanmış ve IFN γ üretimine T hücrelerinin katkısının ne olduğu anlaşılmıştır. IFN γ salınımının kaynağı CD4+T hücreleridir ve bu CD4+T hücreleri CD25 negatiftir. Ayrıca CD4+T hücrelerini içermeyen lenfositlerin (bunlar B hücreleri ve/veya CD8+T hücreleri olabilirler) CD+CD25-T hücrelerinden daha fazla IFN γ yaptıkları gözlenmiştir (Figür 31).

IL-2: Özellikle CD4+ lenfositlerinin, rAaGroEL ile IL-2 sentezlediği görülmüştür ve bu hücreler CD25- dir. (Figür 32).

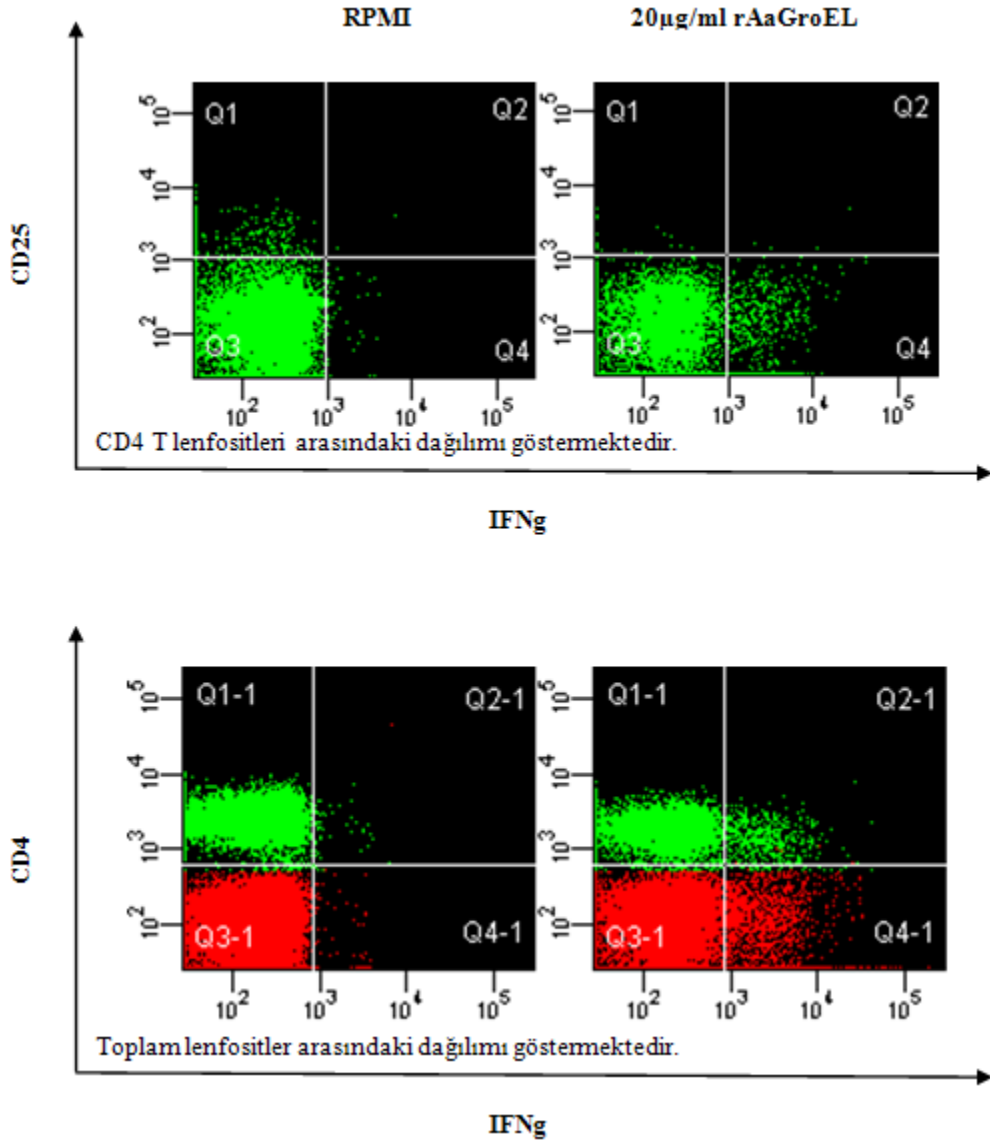
IL-4: rAaGroEL proteininin, IL-4 üretiminde herhangi bir katkısı bulunmamaktadır (Figür 33).

IL-10: rAaGroEL ile IL-10 üretiminin tetiklenmesi arasında CBA ile kurulan bağlantı bu deneyde de doğrulanmış olup bu bilgiye ilave olarak da şu sonuca ulaşılmıştır: IL-10 salınımının kaynağı hem CD4+ lenfositler hem de CD4- lenfositlerdir fakat bu hücreler CD25- dir (Figür 34).

IL-17: Yoğun miktarda üretilen IFN γ 'nın IL-17 sitokinini inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu yüzden IL-17 saptanamamıştır (Figür 35).

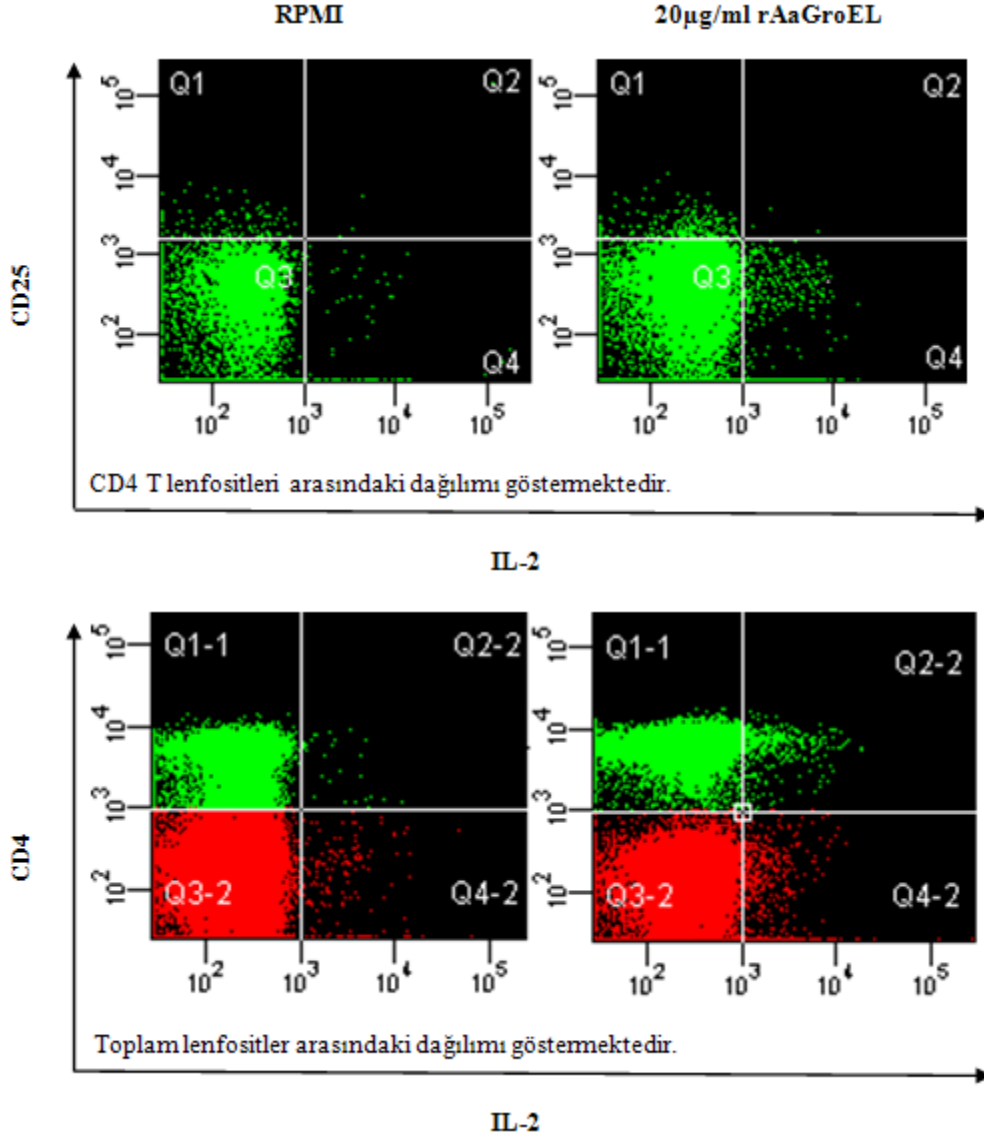
TNF α : rAaGroEL ile TNF α üretiminin tetiklenmesi arasında CBA ile kurulan bağlantı bu deneyde de doğrulanmış olup bu bilgiye ilave olarak da şu sonuca ulaşılmıştır: TNF α salınımının kaynağı hem CD4+T hücreleri hem de CD4- lenfositlerdir ve bu hücrelerin bazıları aynı zamanda CD25+ dir (Figür 36 ve Figür 42).

TGF β : rAaGroEL proteininin, hem lenfositler hemde lenfositlerin haricindeki lökositlerin de TGF- β üretiminde herhangi bir katkısı olmadığı görülmektedir (Figür 37).



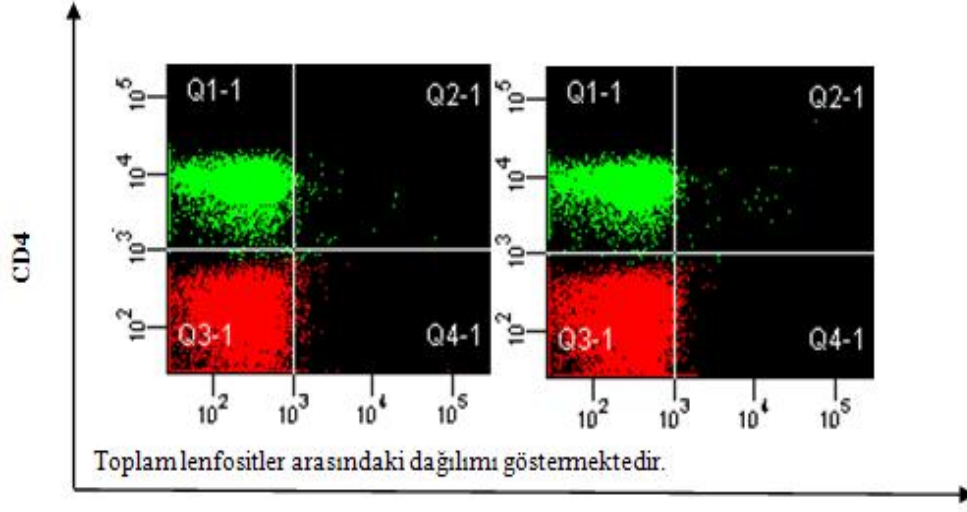
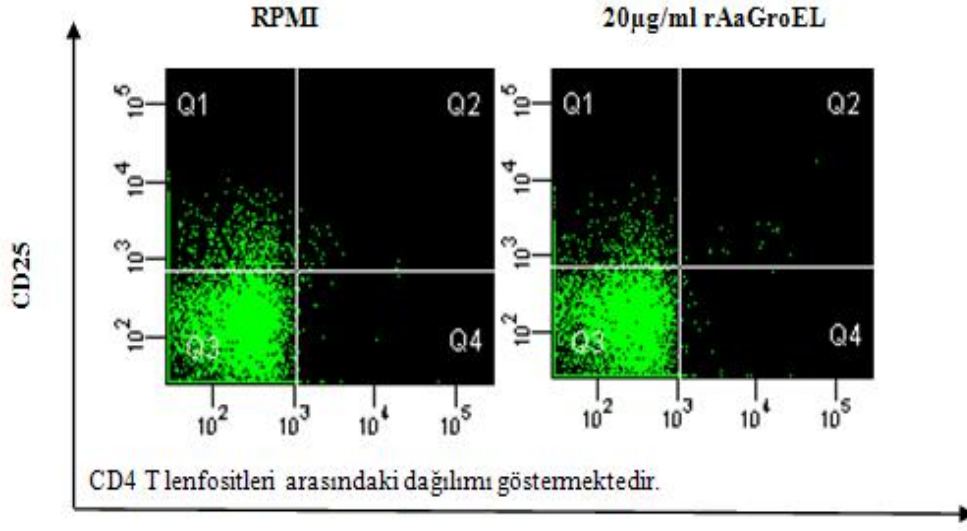
FİĞÜR 31: Hücre içi sitokin boyaması ile IFN γ tespiti

CBA deneyi ile tespit edilen IFN γ sitokininin hangi grup hücrelerden geldiğinin tespitinin yapılması için hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.



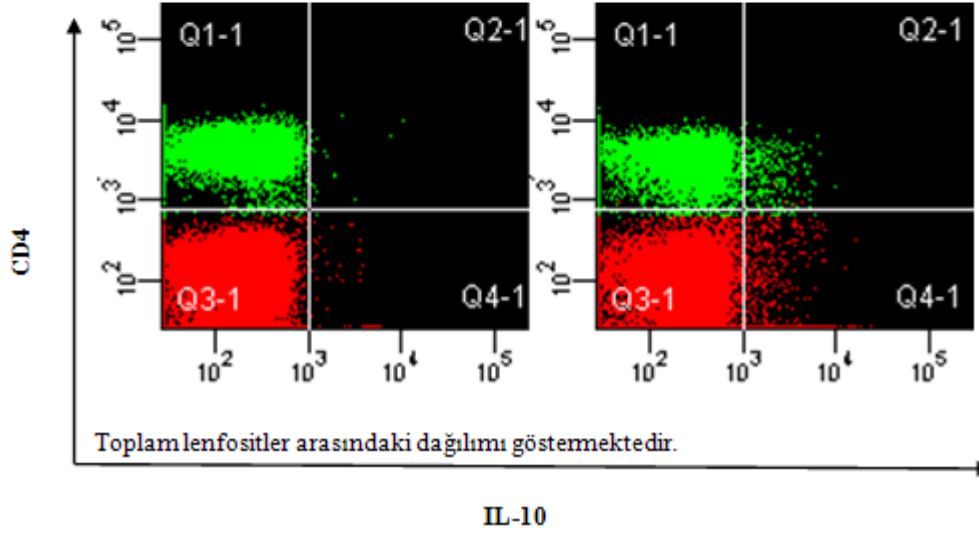
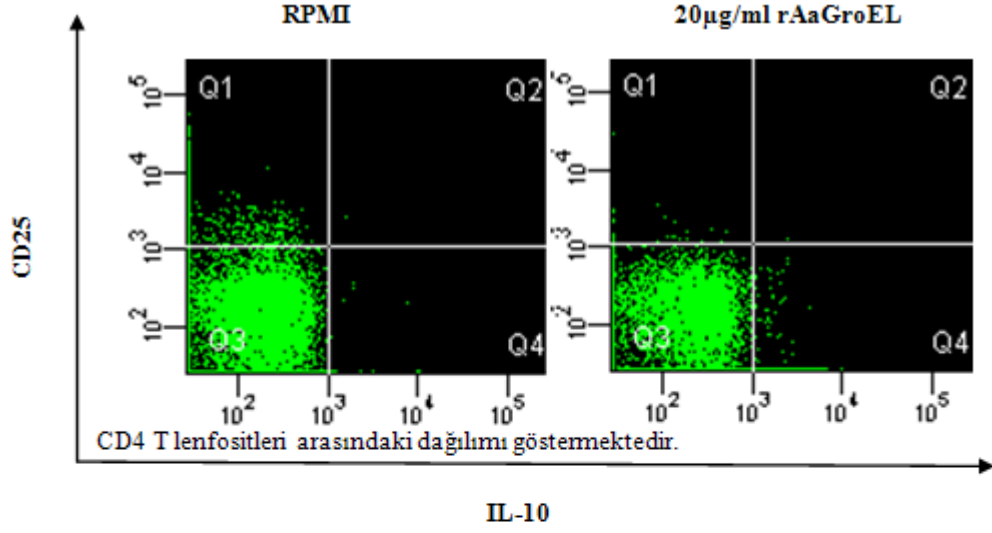
FİĞÜR 32: Hücre içi sitokin boyaması ile IL-2 tespiti.

Hücre içi sitokin boyaması ile IL-2 tespiti. Hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.



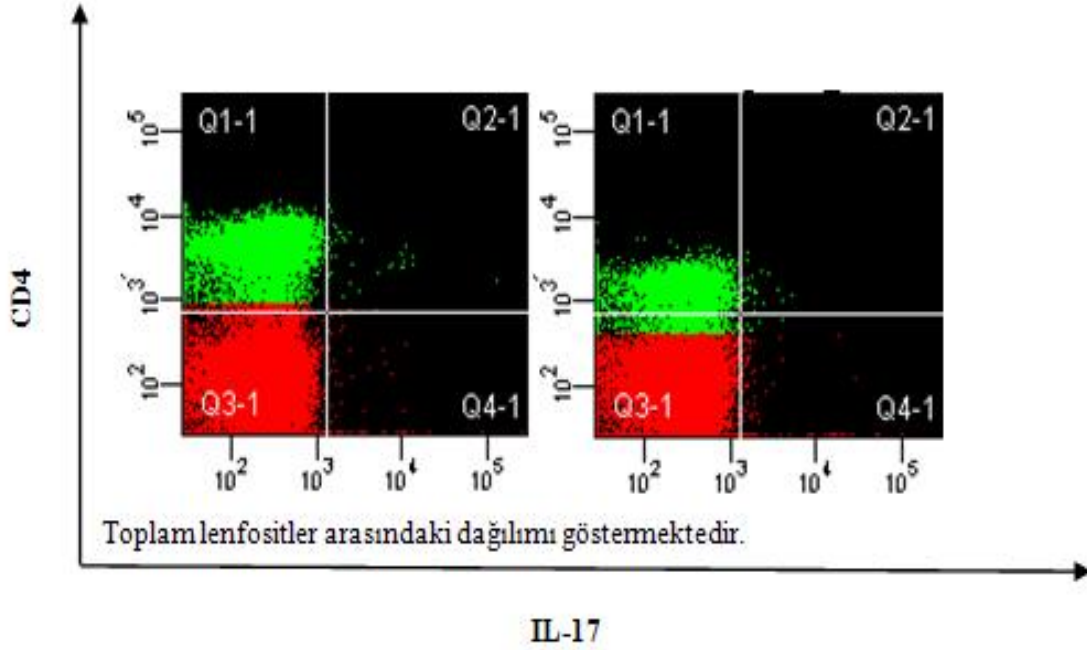
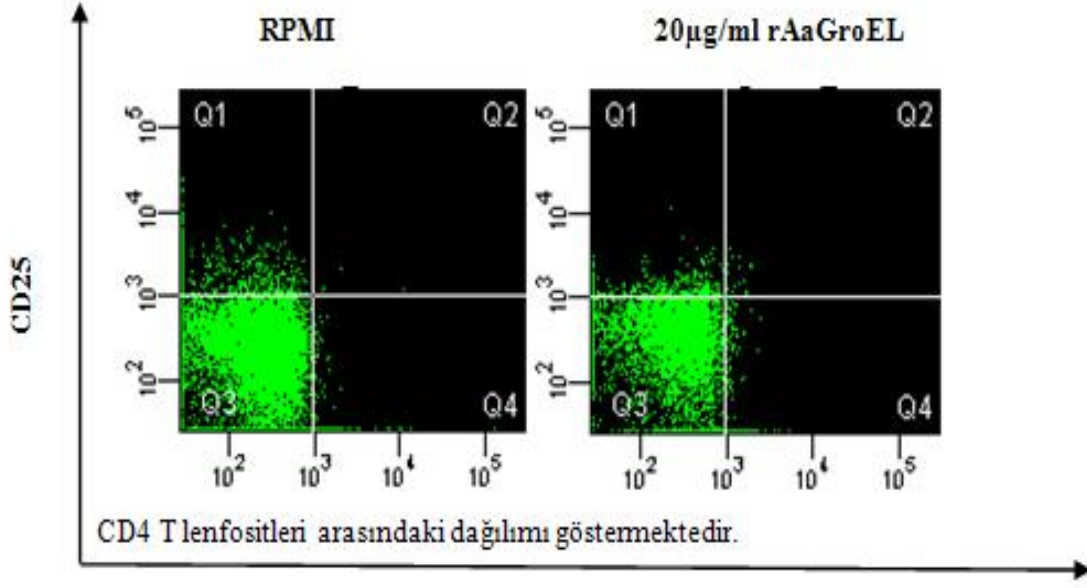
FIGÜR 33: Hücre içi sitokin boyaması ile IL-4 tespiti.

Hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra IL-4 sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.



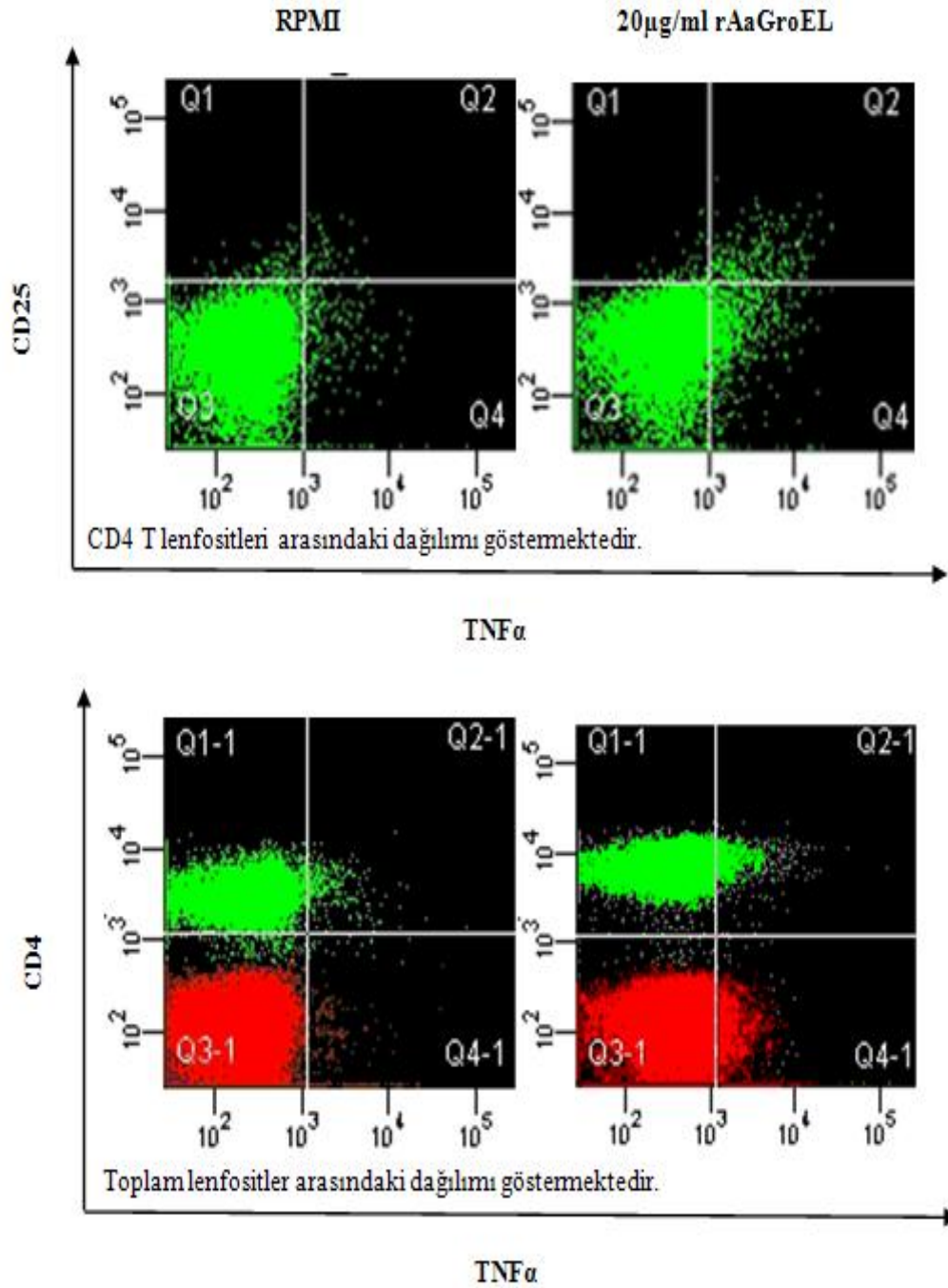
FİĞÜR 34: Hücre içi sitokin boyaması ile IL-10 tespiti.

Hücre içi sitokin boyaması ile IL-10 tespiti. CBA deneyi ile tespit edilen IL-10 sitokininin hangi grup hücrelerden geldiğinin tespitinin yapılması için hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.



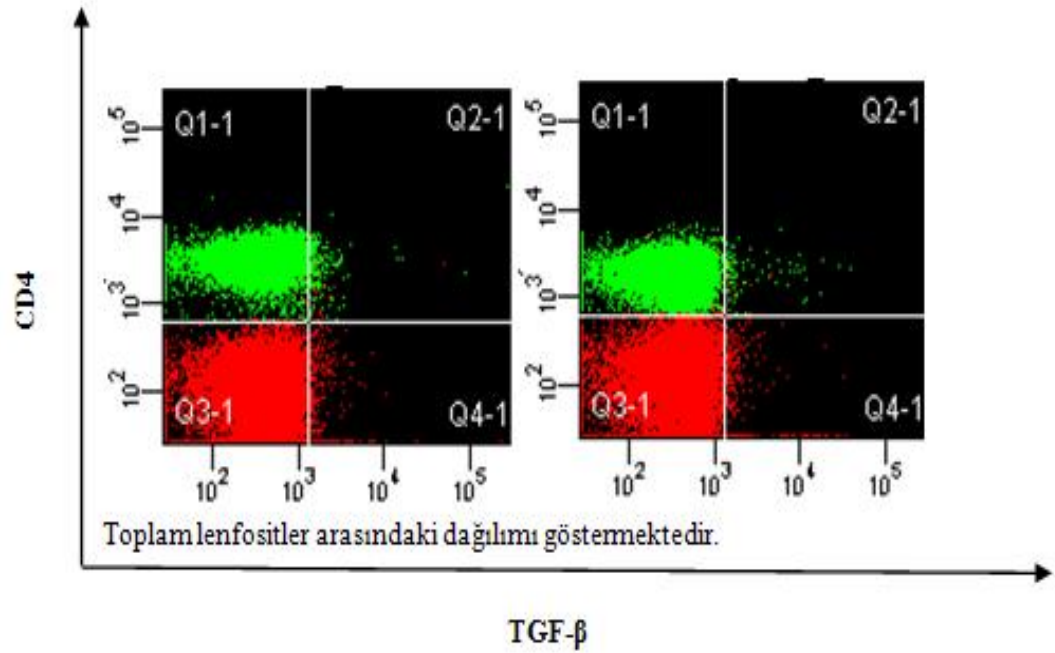
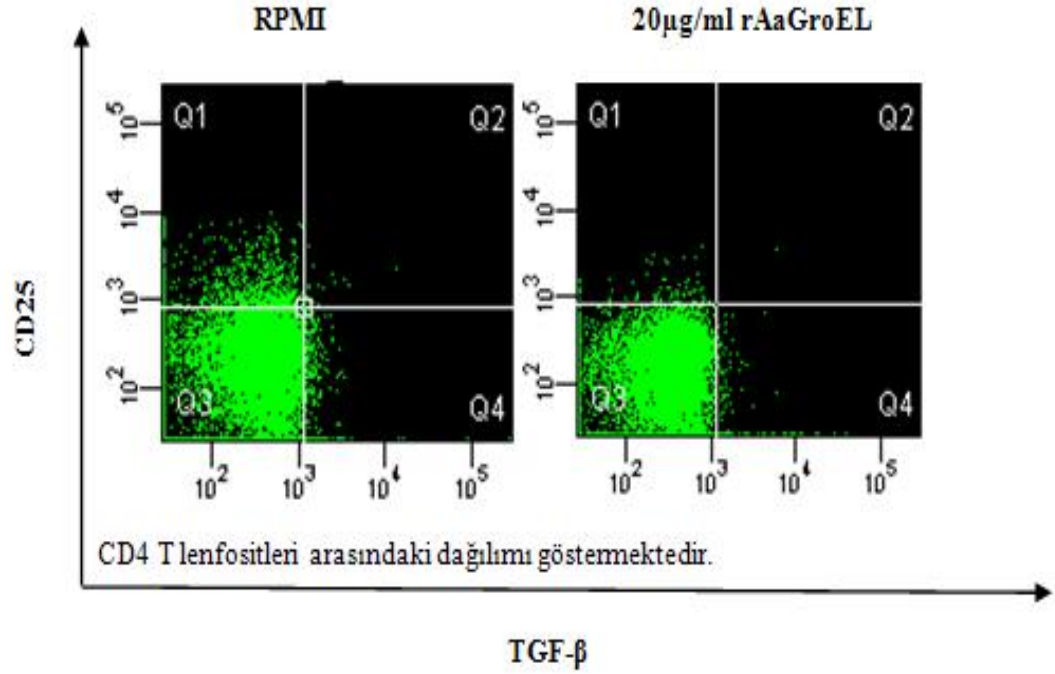
FİĞÜR 35: Hücre içi sitokin boyaması ile IL-17 tespiti.

Hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra IL-17 sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.



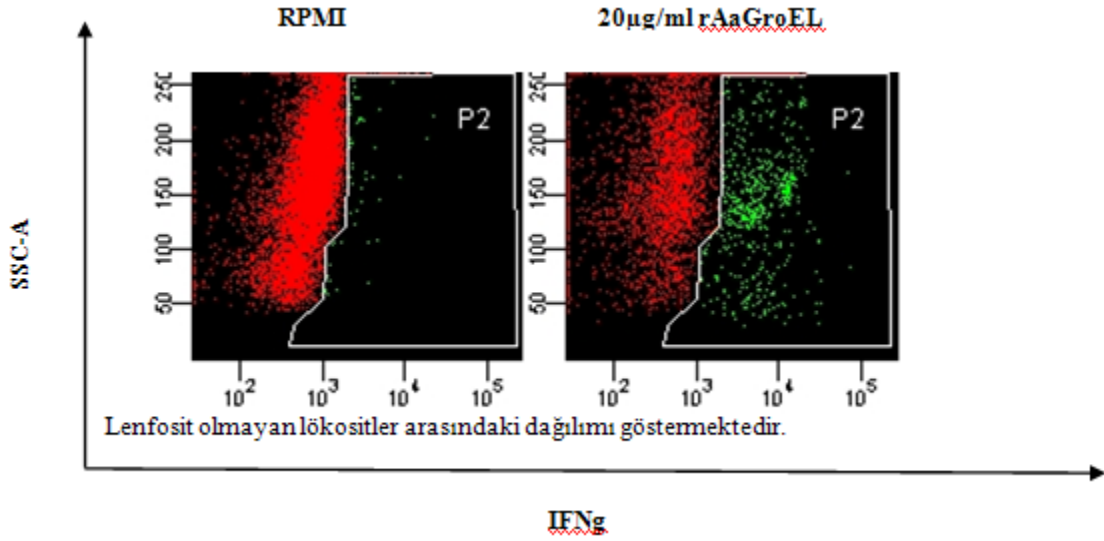
FİĞÜR 36: Hücre içi sitokin boyaması ile TNF α tespiti.

CBA deneyi ile tespit edilen TNF α sitokininin hangi grup hücrelerden geldiğinin tespitinin yapılması için hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra TNF α sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.

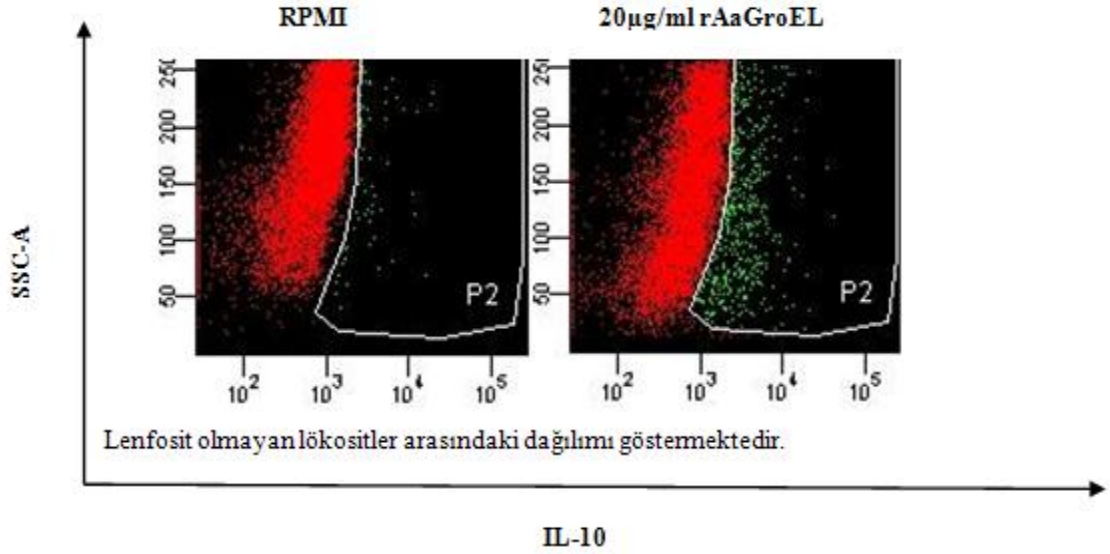


FİĞÜR 37: Hücre içi sitokin boyaması ile TGF-β tespiti.

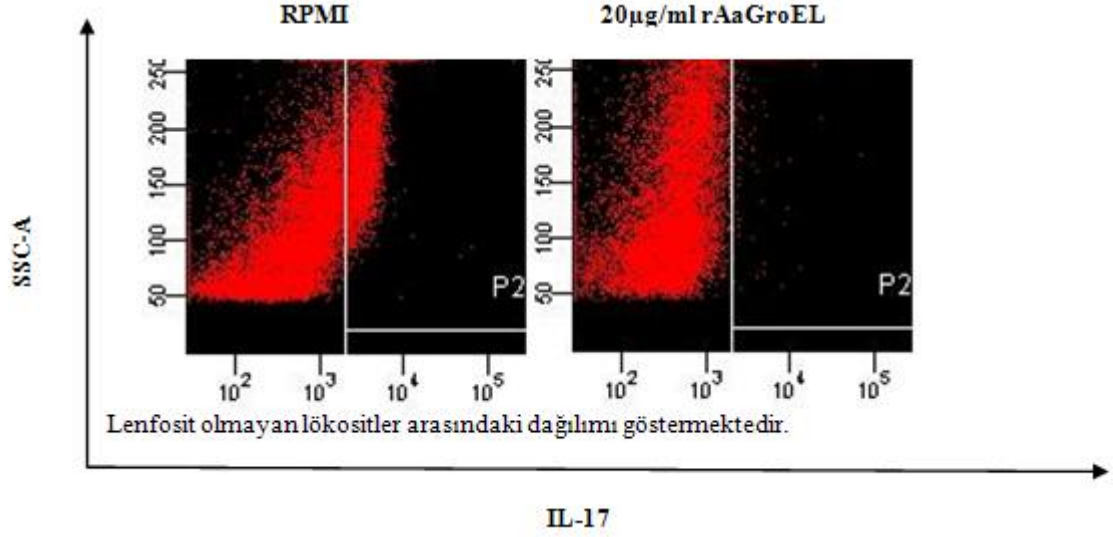
Hücreler hücre yüzeyi markörleri olan CD4 ve CD25 ile işaretlenip, hücreler fix ve perm edildikten sonra yani hücre yüzeyi geçirgen hale getirildikten sonra TGF-β sitokin antikorları eklenerek FACSarray cihazında analiz edilmişlerdir.



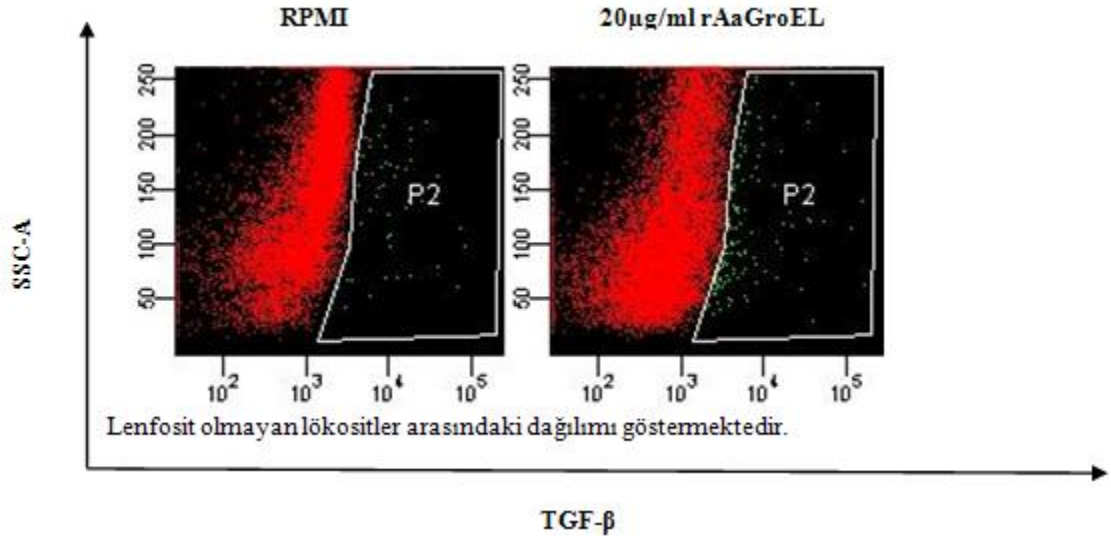
FIGÜR 38: Lenfosit haricindeki lökositlerin IFN γ üretimini gösteren data
rAaGroEL proteinin tetiklemesi ile lenfositlerin haricindeki lökositlerin de IFN γ sentezlediği görülmektedir.



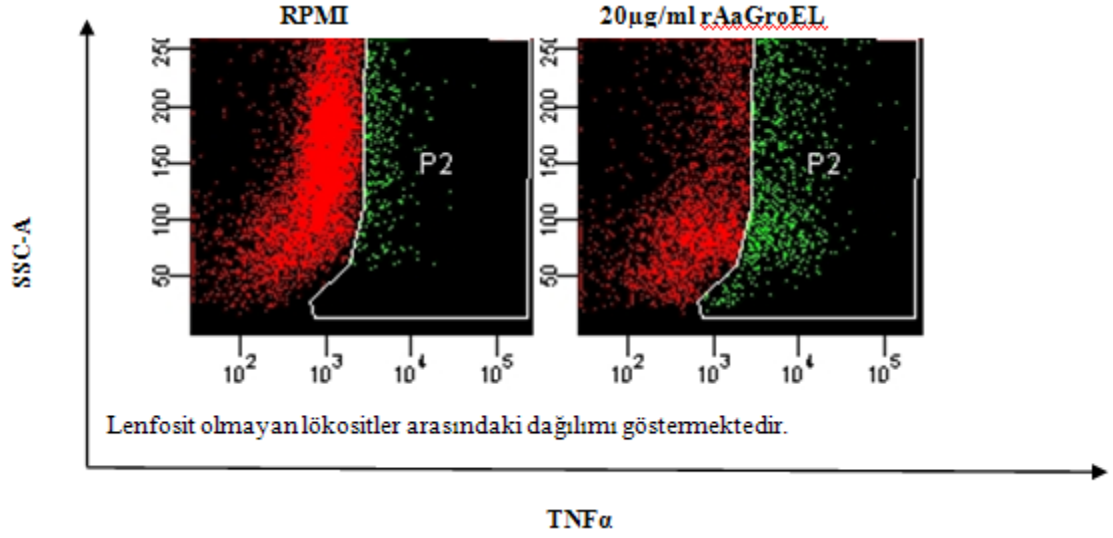
FIGÜR 39: Lenfosit haricindeki lökositlerin IL-10 üretimini gösteren data
rAaGroEL proteinin tetiklemesi ile lenfositlerin haricindeki lökositlerin de IL-10 sentezlediği görülmektedir.



FİĞÜR 40: Lenfosit haricindeki lökositlerin IL-17 üretimini gösteren data
 rAaGroEL proteininin, lenfositlerin haricindeki lökositlerin negatif kontrolde sentezlediği IL-17 sitokininin inhibe ettiği görülmektedir.



FİĞÜR 41: Lenfosit haricindeki lökositlerin TGF-β üretimini gösteren data
 rAaGroEL proteininin, lenfositlerin haricindeki lökositlerin de TGF-β üretiminde herhangi bir katkısı olmadığı görülmektedir.



FIGÜR 42: Lenfosit haricindeki lökositlerin TNF α üretimini gösteren data

rAaGroEL proteininin etkisiyle lenfositlerin haricindeki lökositlerin de TGF- α ürettikleri görülmektedir.

TARTIŞMA/SONUÇ

Ülkemizde ve dünyada periodontal hastalıklar en yaygın olarak görülen kronik enflamasyonlardır. Periodontal hastalıkların patolojisinde bakterilerin hastalıklı dokularda varlığının yanında, bu mikroplara karşı oluşturulan yıkıcı immün yanıtın da rolü büyüktür. *A. actinomycetemcomitans* periodontal hastalıkların patolojisinde rol oynayan önemli patojenlerden biridir ve bu çalışmada model mikroorganizma olarak seçilmiştir. *A.actinomycetemcomitans* bakterisinin periodontal patolojiye tam olarak nasıl neden olduğu bilinmemekle beraber, insan hücrelerine karşı sitolitik etkileri olduğu bilinen lökotoksin (Ltx) ve sitoletal distending toksin (CDT) adı verilen iki toksin ürettiği ve bu toksinlerin hastalığa katkısı bilinmektedir. Fakat, bu bakteri ısı şoku proteinleri ailesine ait 60-kilodalton büyüklükteki GroEL proteini üretmekte ve bu proteininin fonksiyonu bilinmemektedir. Literatürdeki çalışmalarda *A. actinomycetemcomitans*-GroEL proteininin epitel hücre proliferasyonuna yol açtığı ve osteolitik etkileri olduğu gösterilmiştir (ZHANG ve ark., 2001; PAJU ve ark., 2000; GOULHEN ve ark., 1998; NALBANT ve ark., 2003). Bu veriler *A. actinomycetemcomitans*-GroEL proteininin periodontal hastalıkların patolojisiyle ilişkisini düşündürmekle beraber, *A. actinomycetemcomitans*-GroEL proteininin T lenfositlerini nasıl etkilediği ve GroEL'e karşı oluşan T lenfosit immün yanıtının profili henüz bilinmemekte ve periodontal hastalıkların patolojisinde GroEL'in rolünün belirlenmesi gerekmektedir.

T lenfositleri immün yanıtın regülasyonunda rol oynayan anahtar hücreler olmaları nedeniyle, T lenfositlerinin immün yanıtının incelenmesi ve değerlendirilmesi kronik enflamasyon hastalıklarının patolojisinde önemli bir yer tutar. Bu nedenle proje kapsamında hem *A. actinomycetemcomitans*-GroEL'i bakteriden izole edilmiş hemde rekombinant olarak üretilmiştir. Elde edilen AaGroEL proteinin etkileri hem insan periferik kanından izole edilen naive T lenfositleri üzerinde hemde Jurkat T hücre hattı üzerinde araştırılmıştır. T lenfositlerinin *A. actinomycetemcomitans*-GroEL proteinine cevaben oluşturduğu immün yanıt; T hücrelerinin aktivasyonu, proliferasyonu ve sitokin profillerinin çıkarılması açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca, AaGroEL proteininin

düzenleyici T hücreleri üzerindeki etkisi de ölçülmüştür. Bunlara ilave olarak AaGroEL proteinin sitotoksik etkisinin olup olmadığı ve bu sitotoksik etkinin apoptoz olup olmadığı da yapılan deneylerle gösterilmiştir.

Öncelikle gerek bakteriden izole edilen gerekse rekombinant olarak elde edilen AaGroEL proteini western blot (Figür 5, Figür 10b) ve kütle spektrometrisi (Tablo-1, Tablo-2) ile doğrulanmıştır. Purifikasyon işlemleri sırasında kullanılan solusyonların AaGroEL'in ölçülen immün yanıtına bir katkısının olup olmadığı test etmek için purifikasyonda kullanılan solusyonlarda hücrelerle tekbaşına kültüre konmuş ve ilgili fonksiyona olan katkıları ölçülmüştür. Bu ölçümlerde solusyonların bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Figür 13 ve Figür 17). Ayrıca elektroelution işleminin AaGroEL proteinine katkısını anlama adına Stressgen'den satın alınan rekombinant *E.coli*-GroEL ve BSA proteinleri de AaGroEL ile eş zamanlı olarak elektroelute edilmiş ve eş zamanlı olarak hücrelerle kültüre konmuş ve fonksiyona katkıları ölçülmüştür. Yapılan test deneylerde purifikasyon işlemlerinin fonksiyonu etkilemediği gösterilmiştir (Figür 17 ve Figür 18). Bütün bunlara ilave olarak elde edilen AaGroEL proteinlerinin LPS ile kontamine olup olmadığı da LAL deneyi ile ölçülmüştür. LAL deneyi ölçümlerine göre (Figür 12) 1 mikrogram EE-AaGroEL'de 8 EU endotoksin olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmalarla AaGroEL proteininin kalitesi doğrulandıktan sonra antijenik kapasitesi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır. Projemiz kapsamında AaGroEL proteinin periferik kandan izole edilen PBMC'ler ve Jurkat hücreleri üzerindeki apoptotik aktivitesi zaman ve doz kinetiği ile optimum zaman ve optimum doz belirlenerek gösterilmiştir. AaGroEL proteinin apoptotik aktivitesinin doza bağlı olarak indüklendiği gözlenmiştir. PBMC'ler ile yapılan deneylerde LD₅₀ 100 ng olarak belirlenmiş ve AaGroEL'in 100ng dozunda zaman bağlı olarak (24, 48, 72, 96H) lenfosit hücrelerini öldürdüğü gözlenmiştir (Figür 14). Jurkat T hücreleri ve lenfositler üzerindeki apoptotik aktivitenin 48 saatte en iyi gözlendiği kanıtlanmış ve Jurkat T hücre hattı ile 48 saatte AaGroEL proteini diğer antijenlerle karşılaştırılmıştır. Jurkat T hücreleri üzerinde AaGroEL proteini (100ng) %30 apoptotik aktivite gösterirken elektroelute edilmiş BSA (100ng) ve elektroelute edilmiş *E.coli* rGroEL (100ng) %4, negatif kontrole eşit değerlerde kalmıştır (Figür 17 ve Figür 18). Ayrıca yapılan deneylerde elektroelution aşamasında kullanılan Elution buffer negatif kontrol olarak kullanılmış ve herhangi bir apoptotik aktivite gözlenmemiştir (Figür 13 ve Figür 17).

AaGroEL proteininin apoptotik aktivitesi hücre membranındaki fosfatidilserine bağlanan Annexin V ve apoptozun ileri evrelerinde DNA'ya bağlanan 7AAD ile çalışılmıştır. Apoptozda geri dönüşümü olmayan ve hem ölüm reseptörleri hemde mitokondriyal yolak tarafından aktifleşen kaspaz-3 enzimi apoptotik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yoldur. Periferik kandan izole edilen PBMC'ler ile yapılan deneyde CD3 markörünü ile T hücreleri işaretlenmiş ve aktif-kaspaz 3 enziminin AaGroEL ve rAaGroEL proteini ile zamana bağımlı olarak aktifleştiği gözlenmiştir (Figür 19). Jurkat T hücrelerinde ise aktif-kaspaz 3 enziminin AaGroEL ve rAaGroEL proteinine bağımlı olarak aktifleştiği, *E.coli* rGroEL ve elution buffer da ise negatif kontrol ile aynı etki gösterdiği gözlenmiştir (Figür 20).

Ayrıca AaGroEL proteini (100ng) Jurkat T hücrelerinde 48 saat sonunda DNA fragmentasyonuna yol açmaktadır (Figür 21).

AaGroEL proteini PBMC'ler ile kültüre alındığında 48 saatlik inkübasyon sonunda T lenfosit hücreleri fenotip açısından değerlendirilmiş, CD4+T hücrelerinde aktivasyonun arttığı ve CD8+ T hücrelerinde aktivasyonun negatife yakın bir değer seyrettiği gözlenmiştir (Figür 22). AaGroEL proteinin apoptotik aktivitesinin olması patolojide önemli bir etkisi olduğunun göstergesidir. Ancak bu apoptotik etkinin apoptoz açısından hangi sinyal yolağı izlediği ve apoptozun moleküler mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir. Ayrıca, AaGroEL tarafından indüklenen T hücre apoptozunun hangi T hücre altgruplarını (hem fenotipik olarak hemde sitokin ekspresyon profili dikkate alınarak) hedeflediğinin ortaya konması gerekmektedir.

rAaGroEL proteininin hücre yüzeyi markörleri ile yapılan immunoflorasan işaretleme sonucunda T lenfositlerini aktif hale getirdiği tespit edildikten sonra, aktive olan hücrelerin hangi fenotipe polarize oldukları üretilen sitokinler ile anlaşılmaya çalışılmıştır. Buna göre ilk olarak PBMC hücrelerini rAaGroEL ile kültür ortamına koyulmasını takiben 72 saate kadar belirli zamanlarda süpernatantları toplanmış ve CBA kiti ile IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α ve IFN γ sitokinlerin pikogram düzeyinde konsantrasyonlarına bakılmıştır. Bu deney sonucunda özellikle 24. ve de 48. saatlerde yüksek konsantrasyonlarda IL-6, IFN γ ve TNF α sitokinleri saptanmış (Figür 29 ve Figür 30) ve bunlar kadar fazla miktarda olmasa da negatife oranla anlamlı IL-10 sentezlendiği görülmüştür. Fakat IL-2 ve IL-4 sitokinleri hiçbir zaman aralağında saptanmamıştır (Figür 29 ve Figür 30). Süpernatana salınan sitokin oranları bize bu sitokinlerin hangi hücre grupları tarafından üretildiği hakkında bilgi vermediğinden dolayı T hücre altgrubu spesifik yüzey markörleriyle hücre içi sitokin işaretlemesi birleştirilerek IL-2, IL-4, IL-17, TGF- β , IL-10, TNF α ve IFN γ belirlenmesi yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda, IFN γ (Figür 31), IL-10 (Figür 34) ve TNF α (Figür 36) salınımının kaynağı hem CD4+T hücreleri hem de CD4+T hücrelerini içermeyen lenfositler (CD8+T hücreleri ve/veya B hücreleri) olarak bulunmuş (Figüre 38, Figüre 39, Figüre 42). Buna ilave olarak da lenfosit olmayan hücre grubu içinde yani PMN'lerde data analizi yapıldığında bu sözü edilen sitokinlerin monositler ve/veya dendritic hücreler tarafından da sentezlendiği görülmüştür (Figüre 38, Figüre 39 ve Figüre 42). CBA deneyinde tespit edilemeyen IL-2, hücre içi sitokin işaretlemesi ile tespit edilmiş ve yalnızca CD4+T hücrelerinin bu sitokini ürettiği görülmüştür (Figüre 32). rAaGroEL proteini ile inkübe edilen hücrelerde CD4+T hücreleri (Figüre 33, Figüre 35, and Figüre 37), lenfosit hücre grubu veya lenfosit olmayan (PMN'ler ve monositler dahil) analiz yapıldığında IL-17, TGF- β sitokinlerinde negatif kontrollere oranla anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır (Figüre 40 ve Figüre 41).

Bu sonuçlardan yola çıkılarak AaGroEL tarafından indüklenen immun yanıt Figür 43'te oluşturduğumuz model ile açıklanabilir. TNF α bir proenflamatuvar sitokin olduğundan bu sitokinin varlığı monositleri aktive etmektedir ve sonrasında aktive olan monositler naif T hücrelerine rAaGroEL antijenini sunabilir ve T hücrelerini aktive edebilir (IDRISS ve NAISMITH 2000). Ayrıca rAaGroEL varlığında CD4+T hücrelerinin IL-2 üretimi bu tip hücrelerin aktive olduklarını, çoğaldıklarını ve farklılaştıklarını gösterir (MOSMANN *ve ark.*, 1986). rAaGroEL varlığında kültürlerde IL-6 sitokininin yüksek oranda bulunması, IL-2 den bağımsız olarak bu sitokinin T hücreleri üzerindeki kostimulatör etkisi olduğundan dolayı önemlidir. Ayrıca IL-6, yine IL-2 den bağımsız olarak FasL downregulation ile AICD ölümünden CD4+T hücrelerini korur (AYROLDİ *ve ark.*, 1998). Dahası IL-6, CD4+T hücrelerinin aktive olmasında,

çoğalmasında, ve enfeksiyon bölgelerine takviyesinde önemli bir sitokindir. Bu sebeplerden dolayı IL-6 üretiminin rAaGroEL ile tetiklenmesi bu proteinin antijenik özelliğini de desteklemektedir. Bununla beraber IL-6 ve TNF α sitokinlerinin varlığı kronik enflamasyon ile ilişkilendirilmiştir (ROCHMAN *ve ark.*, 2005; TEAGUE *ve ark.*, 1997; TRZONKOWSKI *ve ark.*, 2003).

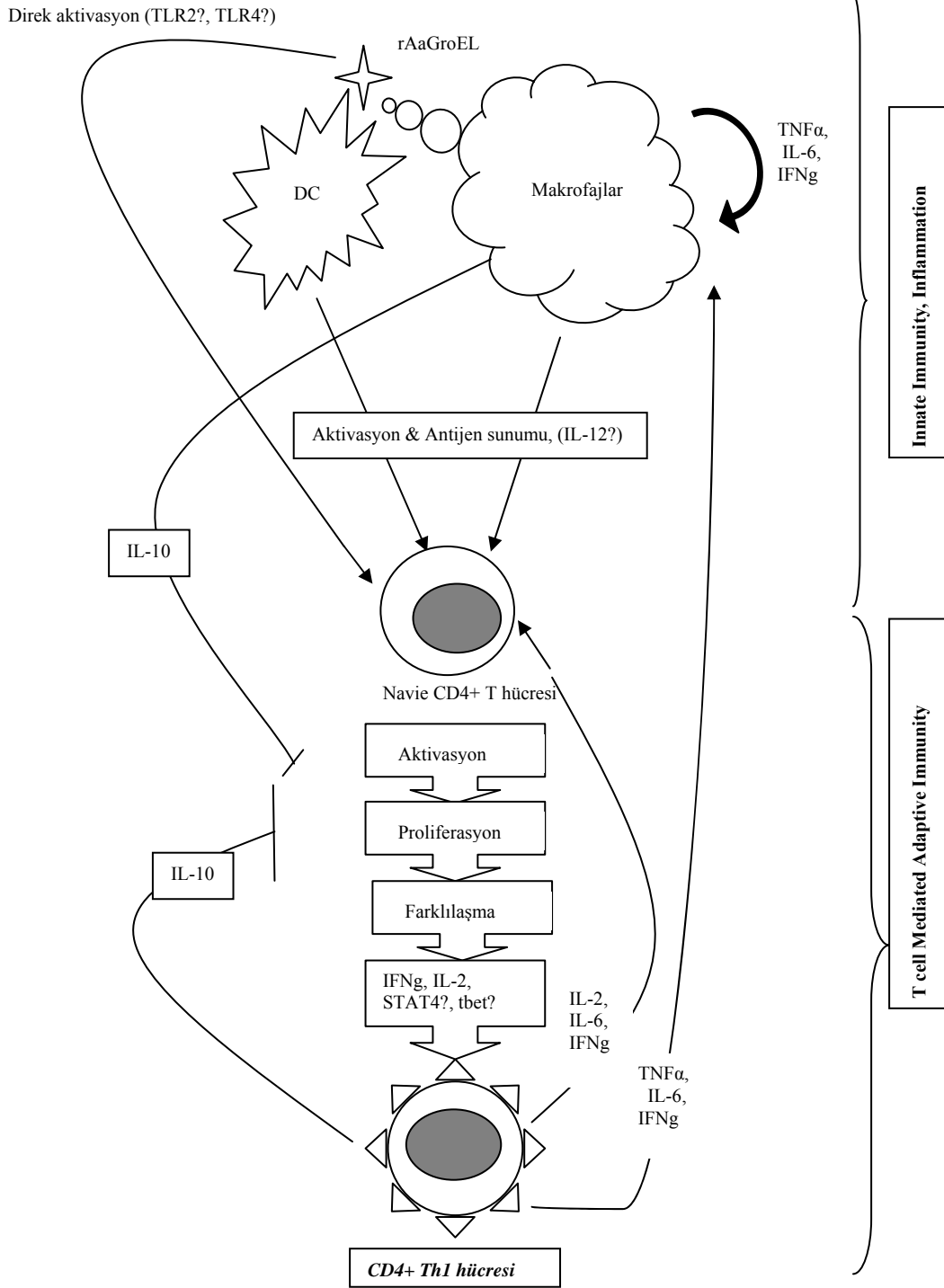
IFN γ sitokininin rAaGroEL varlığında yüksek miktarda sentezlenmesi ise bu proteinin naif CD4+ T lenfositlerini Th1 yönüne ittiğinin bir göstergesidir (MOSMANN *ve ark.*, 1986). Çünkü IFN γ Th1 polarizasyonunu hızlandırır ve monositlerin aktive olmasını hızlandırarak antijen sunumunu kolaylaştırır. Aynı zamanda IL-4 sitokininin yokluğu da bu görüşü desteklemektedir. Çünkü IL-4, Th2 alt sınıfının değişmez sitokini olarak bilinmektedir. Ayrıca IL-4, Th1 oluşumunu da inhibe ederken IFN γ da IL-4 üretimini inhibe eder. Yoğun miktarda üretilen IFN γ nın ise IL-17 sitokinini inhibe ettiği ve bu yüzden IL-17 saptanamadığı düşünülmektedir (GAFFEN *ve HAJISHENGALLIS* 2008).

Düzenleyici T hücrelerinin (Treg) IL-10 sentezlediğinin keşfi ile beraber, daha önce bilinen, bu sitokinin Th2 indikatörü olduğu gerçeği yıkılmıştır. Bununla beraber son yıllardaki çalışmalarda IFN γ ve IL-10 sitokinlerini aynı anda üreten Th1 hücrelerinin varlığı gösterilmektedir (O'GARRA *ve VIEIRA* 2007). Bizim bulgularımızda da CD4+ T hücreleri hem IFN γ hem de IL-10 açısından pozitif olduklarından, literatürdeki bu bilgi desteklenmektedir. Ayrıca IL-10 bizim bulgularımıza göre monositler tarafından ve de B hücreleri tarafından da sentezleniyor olabilir. Sonuç olarak rAaGroEL proteinini takiben IL-10 indüklenmesi, aktive olan Th1 hücrelerinin regülasyonu için önemlidir.

İleriye Yönelik Yapılması Gereken Çalışmalar

Bir antijenin T hücreleri üzerindeki etkilerinin bütünsel olarak ortaya konması oldukça kompleks ilişkilerin algılanması ve ortaya çıkarılmasını içerdiğinden proje kapsamında yapılmış deneylerden elde edilen veriler ışığında açığa kavuşturulması gereken noktalar vardır. Öncelikle, AaGroEL proteinin apoptotik aktivitesinin T hücre altgruplarında spesifik olarak çalışılması ve hangi T hücre altgruplarının AaGroEL antijenine bağımlı olarak öldüğünün araştırılması ve ayrıca AaGroEL proteinin indüklediği T hücre apoptozunun moleküler mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

Şu ana kadar belirlenmiş olan sitokinler ışığında, rAaGroEL proteininin naif CD4+T lenfositlerini Th1 alt sınıfına farklılaşması yönünde uyardığı belirlenmiştir. Bu görüşü daha da desteklemek adına, profesyonel antijen sunan hücrelerin (monositler ve dendritik hücreler) üretmiş olduğu ve naif CD4+T lenfositlerini Th1 alt sınıfına iten bir sitokin olan IL-12'ye bakılması gerekmektedir. Buna ilave olarak, Th1 farklılaşmasında rol oynayan transkripsiyonel faktörlerin, rAaGroEL uyarılması ile CD4+T lenfositlerindeki artış miktarı Western Blot yöntemi ile tespit edilebilir. Dahası Th2 ve Th17 farklılaşması için gerekli olan transkripsiyonel faktörlerin değişiminin olup olmadığını göstererek Th1 fenotip oluşu ile ilgili data desteklenebilir.



Figür 43: AaGroEL tarafından indüklenen immün yanıt modeli
 (? İşareti henüz tespit edilmeyen molekülleri göstermektedir)

REFERANSLAR

- Ando T., Kato T., Ishihara K., Ogiuchi H., Okuda K., Heat shock proteins in the human periodontal process, *Microbiol Immunol.*, 39:321-327, (1995).
- Ayroldi E., Zollo O., Cannarile L., Grohmann D.F.A.U., Delfino D.V., Riccardi C., Interleukin-6 (IL-6) prevents activation induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/fasL expression and cell death. *Blood*, 92 :4212–4219, (1998).
- Blank M., Shiloh Y., Programs for cell death: apoptosis is only one way to go, *Cell Cycle*, 6(6):686-95, (2007).
- Böyum A., Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand J Clin Laboratory Invest Suppl.* 97, 77–89, (1968).
- Braig K., Chaperonins, *Current Opinion in Structural Biology*, 8:159-165, (1998).
- Bulut Y., Faure E., Thomas L., Karahashi H., Michelsen K.S., Equils Ö., Morrison S.G., Morrison R.P., and M Arditi., Chlamydial Heat Shock Protein 60 Activates Macrophages and Endothelial Cells Through Toll-Like Receptor 4 and MD2 in a MyD88-Dependent Pathway. *J. of Immunology* 168: 1435-1440, (2002).
- Equils Ozlem, Lu Daning, Gatter Mary, Witkin Steve S., Bertolotto Cristina, Arditi Moshe, McGregor James A., Simmons Charles F., and Hobel Calvin J., Chlamydia Heat Shock Protein 60 Induced Trophoblast Apoptosis through TLR4, *J. of Immunology* 177:1257-1263, (2006).
- Gaffen S.L., Hajishengallis G., A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17, *J. Dent. Res.*, 87(9):817-28, (2008).
- Goulhen F., Hafezi A., Uitto V.J., Hinode D., Nakamura R., Grenier D., Mayrand D., Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-Like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infection and Immunity*, 5307-5313, (1998).
- Hinode D., Grenier D., Mayrand D., A general procedure for the isolation of heat-shock proteins from periodontopathogenic bacteria, *J. Microbiol Methods*, 125:349–355, (1996).
- Hinode D, Yokoyama M, Tanabe S, Yoshioka M, Nakamura R. Antigenic properties of the GroEL-like protein of *Campylobacter rectus*. *Oral Microbiol Immunol*, 17: 16-21 (2002).

- Idriss H.T. ve Naismith J.H., TNF- α and the TNF receptor superfamily: structure–function relationship(s), *Microsc. Res. Tech.*, 50: 184–195, (2000).
- Kim S.G., Kim S.H., Kim M.K., Kim H.S., Kook J.K., Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using species-specific 16S rDNA primers, *J. Microbiol.*, 43(2):209-12, (2005).
- Kirby A.C., Meghji S., Nair S.P., White P., Reddi K., Nishihara T., Nakashima K., Willis A.C., Sim R., Wilson M., The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL, *J. Clin. Invest.*, 96(3):1185-94, (1995).
- Koga T., Kusuzaki T., Asakawa H., Senpuku H., Nishibara T., Noguchi T., The 64 Kilodalton GroEL like protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *J. periodontal Res.* 28, 475-477, (1993).
- Li X., Darzynkiewicz Z., Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation, *Cell. Prolif.*, 28: 571–579 (1995).
- Lotz M., Jirik F., Kabouridis P., Tsoukas C., Hirano T., Kishimoto T., Carson D.A., B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 167: 1253–1258, (1988).
- Macario A. J. L., Macario E. C., The molecular chaperone system and other anti-stress mechanisms in archaea, *Frontiers In Bioscience* 6, 262-283, (2001).
- MacFarlane M., Williams A.C., Apoptosis and disease: a life or death decision., *EMBO Repl.* 5(7):674-8, (2004).
- Mangan D., Taichman N., Lally E., Wahl S., Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes, *Infect. Immun.*, 59: 3267–3272 (1991).
- Meghji S., Henderson B., Wilson M., High-titer antisera from patients with periodontal disease inhibit bacterial capsule-induced bone breakdown, *J. Periodontal Res.*, 28:115-121, (1993).
- Meira L.B., Bugni J.M., Green S.L., Lee C.W., Pang B., Borenshtein D., Rickman B.H., Rogers A.B., Moroski-Erkul C.A., McFaline J.L., Schauer D.B., Dedon P.C., Fox J.G., Samson L.D., DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice, *J. Clin. Invest.*, 118(7):2516-25, (2008).
- Michaud D.S., Liu Y., Meyer M., Giovannucci E., Joshipura K., Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study, *Lancet. Oncol.*, 9: 550–58, (2008).

- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J. Immunol.*, 136: 2348-2357, (1986).
- Nalbant A., Chen C., Wang Y., Zadeh H.H., Induction of T-cell apoptosis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* mutants with deletion of *ItxA* and *cdtABC* genes: possible activity of GroEL-like molecule, *Oral Microbiol. Immunol.*, 18(6):339-49, (2003).
- Nitta H., Ishikawa I., Analysis of the genetic control of antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by immunoblotting in inbred strains of mice, *Oral Microbiol. Immunol.*, 8:141-145, (1993).
- O'Garra A., Vieira P., T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10., *Nat. Rev. Immunol.*, 7:425-428, (2007).
- Ohta H., Hara H., Fukui K., Kurihara H., Murayama Y., Kato K., Association of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin with nucleic acids on the bacterial cell surface, *Infect. Immun.*, 61:4878-4884 (1993).
- Okuda J., Kurazono H., Takeda Y., Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*, *Microb. Pathog.*, 18: 167-172 (1995).
- Page R.C., Schroeder H.E., Pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: a summary of current work, *Lab. Invest.*, 33:235-249, (1976).
- Paju S., Goulhen F., Asikainen S., Grenier D., Mayrand D., Uitto V.J., Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation, *FEMS Microbiol. Lett.*, 182:231-235, (2000).
- Parkin D.M., The Global health burden of infection-associated cancers in year 2002, *Int. J. Cancer*, 118(12): 3030-44, (2006).
- Peres S.Y., Marches O., Daigle F., Nougayrede J.P., Hérault F., Tasca C., et al., A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase, *Mol. Microbiol.*, 24: 1095-1107 (1997).
- Pickett C.L., Pesci E.C., Cottle D.L., Russell G., Erdem A.N., Zeytin H., Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter sp. cdtB* gene, *Infect. Immun.*, 64: 2070-2078 (1996).
- Rochman I., Paul W.E., Ben-Sasson S.Z., IL-6 increases primed cell expansion and survival, *J. Immunol.*, 174: 4761-4767, (2005).

- Sandhu J.S., Prostate cancer and chronic prostatitis, *Curr. Urol. Rep.*, 9(4)328-32, (2008).
- Schultz D.R ve Harrington J.W., Apoptosis:Programmed cell death at a molecular level, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 32(6): 345-369, (2003).
- Scott D.A., Kaper J.B., Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin, *Infect. Immun.* 62: 244–251 (1994).
- Seymour G.J, Ford P.J, Cullinan M.P., Leishman S., Yamazaki K., Relationship between periodontal infections and systemic disease, *Clin. Microbiol. Infect.*, (13)4:3-10, (2007).
- Shenker B.J., Hoffmaster R.H., Zekavat A., Yamaguchi N., Lally E.T., Demuth D.R., Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle, *J. Immunol.*, 167: 435–441 (2001).
- Shenker B.J., Hoffmaster R.H., McKay T.L., Demuth D.R., Expression of the cytolethal distending toxin (Cdt) operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: evidence that the CdtB protein is responsible for G2 arrest of the cell cycle in human T cells, *J. Immunol.*, 165: 2612–2618 (2000).
- Shenker B.J., McKay T., Datar S., Miller M., Chowhan R., Demuth D.R., *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells, *J. Immunol.*, 162: 4773–4780 (1999).
- Spitznagel J.J., Kraig E., Kolodrubetz D., Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect. Immun.*, 59: 1394–1401 (1991).
- Stewart G.R., Young D.B., Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection, *Curr. Opin. Immunol.*, 16:506-510, (2004).
- Sugai M., Kawamoto T., Peres S.Y., Ueno Y., Komatsuzawa H., Fujiwara T., et al., The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin, *Infect. Immun.* 66:5008–5019 (1998).
- Tabeta K., Yoshie H., Yamazaki K., Characterization of serum antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL-like protein in periodontitis patients and healthy subjects, *Oral Microbiol. Immunol.*, 16(5):290-5, (2001).
- Taichman N., Dean R., Sanderson C., Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect. Immun.*, 28: 258–268 (1980).

- Teague T.K., Marrack P., Kappler J.W., Vella A.T., IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis, *J. Immunol.*, 158: 5791–5796, (1997).
- Trzonkowski P, Mysliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, et al. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination—an impact of immunosenescence, *Vaccine*, 21: 3826–36 (2003).
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Bildirisi 14.05.2002.
- Van Winkelhoff A.J., Slots J., *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections, *Periodontol*, 20:122–135, (2000).
- Whitehouse C.A., Balbo P.B., Pesci E.C., Cottle D.L., Mirabito P.M., Pickett C.L., *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block, *Infect. Immun.*, 66: 1934–1940 (1998).
- Yoshioka M., Grenier D., Mayrand D., Antigenic cross-reactivity and sequence homology between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* GroEL protein and human fibronectin, *Oral Microbiol. Immunol.*, 19(2):124-8, (2004).
- Zhang L., Pelech S.L., Mayrand D., Grenier D., Heino J., Uitto V.J., Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP kinases, *Exp. Cell Res.*, 266:11-20, (2001).
- Zügel U. ve Kaufmann S.H., Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases, *Clinical Microbiology Rev.*, 12: 19–39, (1999).

**EKLER
TABLOLAR**

Tablo-1: EE-AaGroEL Proteinin Kütle Spektrometresi İle Doğrulanması



Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|1705793](#) Score: **1001**

60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)

Found in search of D:\Data\080523\080513-2.D\Analysis.mgf

Nominal mass (M_r): **57408**; Calculated pI value: **4.83**

NCBI BLAST search of [gi|1705793](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Aggregatibacter actinomycetemcomitans](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI

Entrez:

[gi|1405314](#) from [Aggregatibacter actinomycetemcomitans](#)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **39%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAAKDVKFGN DARV**MLNGV** **NILADAVKVT** LGPKGRNVVL DK**SFGAPTIT**
51 **KDGVSVAREI** **ELEDKFENMG** **AQMVKEVASK** **ANDAAGDGT** **TATVLAQAIV**
101 **NEGLKAVAAG** **MNPMDLKRGI** **DKAVNSVVAE** **LKNLSKPCET** **SKEIEQVGTI**
151 SANSDSIVGQ LIAQAMEKVG KEGVITVEDG TGLEDELVV EGMQFDRGYL
201 SPYFINKPET ATVELDNPFI LLVDKKISNI **RELLPVLEGV** **AKAGKPLLI**
251 AEDVEGEALA TLVVNTMRGI VKVAAVKAPG FGDRRKAMLQ DIAILTAGTV
301 ISEEIGMELE **KATLEDLGQA** **KRIVINKDNT** **TIIDGIGDEA** **QIQGRVAQIR**
351 QQIEESTSDY DKEKLQERVA KLAGGVAVIK **VGAATEVEMK** **EKKARVEDAL**
401 HATRA**AAVEEG** **IVAGGGVALI** **RAAGRVVGLQ** **GENEEQNVGI** **KLALRAMEAP**
451 LR**QIVANAGE** **EASVIASAVK** **NGEGNFGYNA** **GTEQYGDMA** **MGILDPTKVT**
501 RSALQFAASV AGLMITTECM VTELPKDDKA DLGAAGMGGM GGMGMM

Tablo-2: Rekombinant AaGroEL Proteinin Kütle Spektrometresi İle Doğrulanması



Mascot Search Results Protein View

60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)

Found in search of D:\Data\080708\080630-1.D\Analysis.mgf

Nominal mass (M_r): **57408**; Calculated pI value: **4.83**

NCBI BLAST search of [gi|1705793](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Aggregatibacter actinomycetemcomitans](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|1405314](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=gi|1405314) from [Aggregatibacter actinomycetemcomitans](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=gi|1405314)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: **47%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAAKDVKFGN DARV**KMLNGV NILADAVKVT** LGPKGRNVVL DK**SFGAPTIT**
 51 **KDGVSVAREI ELEDKFENMG AQMVKEVASK ANDAAGDGT TATVLAQAIV**
 101 **NEGLKAVAAG MNPMDLKRGI DKAVNSVVAE LKNLSKPCET SKEIEQVGTI**
 151 **SANSDSIVGQ LIAQAMEKVG** KEGVITVEDG TGLEDELVDV EGMQFDRGYL
 201 SPYFINKPET ATVELDNPFI LLVDKKISNI **RELLPVLEGV AKAGKPLLI**
 251 AEDVEGEALA TLVVNTMRGI VKVAAVKAPG FGDRRKAMLQ DIAILTAGTV
 301 ISEEIGMELE **KATLEDLGQA KRIVINKDNT TIIDGIGDEA QIQGRVAQIR**
 351 **QQIEESTSDY DKEKLQERVA** KLAGGVAVIK **VGAATEVEMK** EKKARVEDAL
 401 **HATRAAVEEG IVAGGGVALI RAAGRUVGLQ GENEEQNVGI KLALRAMEAP**
 451 LR**QIVANAGE EASVIASAVK** NGEGNFGYNA GTEQYGDMA MGILDPTKVT
 501 RSALQFAASV AGLMITTECM VTELPKDDKA **DLGAAGMGGM GGMGMM**

Tablo-3 : A. actinomycetemcomitans bakterisinin rekombinant AaGroEL proteininin Sekans sonuçları

T7 Primer sekans sonucu (not: "D28817" ilgili genin PUBMED numarası olup "sekans" klonlanan genin sekans sonucunu göstermektedir. Genin baz uzunluğu 1644 baz çifti olduğundan dolayı 3 farklı primer ile sekans ettirilmiştir.)

D28817	1	ATGGCAGCAAAAGACGTAAAATTCGGCAACGACGCACGCGTAAAAATGTTAAACGGCGTA	60
Sekans	1	ATGGCAGCAAAAGACGTAAAATTCGGCAACGACGCACGCGTAAAAATGTTAAACGGCGTA	60
D28817	61	AATATTTTAGCCGATGCAGTAAAAGTTACTCTCGGTCCAAAAGGTCGTAACGTAGTGTTA	120
Sekans	61	AATATTTTAGCCGATGCAGTAAAAGTTACTCTCGGTCCAAAAGGTCGTAACGTAGTGTTA	120
D28817	121	GACAAATCTTTTCGGTGCACCGACCATCACCAAAGACGGGGTTTCCGTGGCGCGTGAAATC	180
Sekans	121	GACAAATCTTTTCGGTGCACCGACCATCACCAAAGACGGGGTTTCCGTGGCGCGTGAAATC	180
D28817	181	GAATTAGAAGATAAAATTTGAAAACATGGGCGCCCAAATGGTGAAAGAAGTGGCGTCCAAA	240
Sekans	181	GAATTAGAAGATAAAATTTGAAAACATGGGCGCCCAAATGGTGAAAGAAGTGGCGTCCAAA	240
D28817	241	GCGAACGACGCGGCAGGGGACGGTACCACAACCGCCACCGTATTGGCTCAAGCCATCGTG	300
Sekans	241	GCGAACGACGCGGCAGGGGACGGTACCACAACCGCCACCGTATTGGCTCAAGCCATCGTG	300
D28817	301	AACGAAGGCTTAAAAGCCGTTGCCGCCGGTATGAACCCGATGGATTTAAAACGCGGTATC	360
Sekans	301	AACGAAGGCTTAAAAGCCGTTGCCGCCGGTATGAACCCGATGGATTTAAAACGCGGTATC	360
D28817	361	GACAAAGCTGTCAACTCAGTGGTTGCCGAGCTTAAAAATCTCTCAAACCATGCGAAACC	420
Sekans	361	GACAAAGCTGTCAACTCAGTGGTTGCCGAGCTTAAAAATCTCTCAAACCATGCGAAACC	420
D28817	421	TCAAAAGAAATCGAACAAGTTGGCACGATCTCTGCAAATCCGACAGCATTGTGGGTCAA	480
Sekans	421	TCAAAAGAAATCGAACAAGTTGGCACGATCTCTGCAAATCCGACAGCATTGTGGGTCAA	480

D28817 481 TTAATCGCTCAAGCCATGGAAAAAGTGGGTAAAGAAGGCCTAATTACCGTGGAAAGACGGC 540
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 481 TTAATCGCTCAAGCCATGGAAAAAGTGGGTAAAGAAGGCCTAATTACCGTGGAAAGACGGC 540

D28817 541 ACCGGTTTGGAAAGACGAATTGGATGTGGTTGAAGGTATGCAATTCGACCGCGTTACCTT 600
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 541 ACCGGTTTGGAAAGACGAATTGGATGTGGTTGAAGGTATGCAATTCGACCGCGTTACCTT 600

D28817 601 TCCCATACTTCATCAACAAGCCTGAAACCGCCACTGTGGAAGTGGACAATCCGTTTATC 660
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 601 TCCCATACTTCATCAACAAGCCTGAAACCGCCACTGTGGAAGTGGACAATCCGTTTATC 660

Primer 2 sekans sonucu:

D28817 630 CGCCACTGTGGAAGTGGACAATCCGTTTATCCT 662
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 41 CGCCACTGTGGAAGTGGACAATCCGTTTATCCT 71

D28817 663 GTTAGTAGATAAAAAAATCTCCAACATCCGCGAATTATTGCCGGTATTAGAAGGCGTGGC 722
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 72 GTTAGTAGATAAAAAAATCTCCAACATCCGCGAATTATTGCCGGTATTAGAAGGCGTGGC 131

D28817 723 GAAAGCCGGTAAACCATTGTTAATCATCGCCGAAGATGTGGAAGGCGAAGCTTTGGCAAC 782
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 132 GAAAGCCGGTAAACCATTGTTAATCATCGCCGAAGATGTGGAAGGCGAAGCTTTGGCAAC 191

D28817 783 CTTGGTTGTAAACACCATGCGCGGTATCGTGAAAGTGGCCGAGTGAAAGCGCCGGGCTT 842
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 192 CTTGGTTGTAAACACCATGCGCGGTATCGTGAAAGTGGCCGAGTGAAAGCGCCGGGCTT 251

D28817 843 TGGTGACCGCGTAAAGCGATGTTACAAGATATTGCGATTTTAACCGCCGGTACGGTCAT 902
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 252 TGGTGACCGCGTAAAGCGATGTTACAAGATATTGCGATTTTAACCGCCGGTACGGTCAT 311

D28817 903 TTCCGAAGAAATCGGTATGGAATTGGAAAAAGCCACACTTGAAGATTTAGGTCAGGCAAA 962
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 312 TTCCGAAGAAATCGGTATGGAATTGGAAAAAGCCACACTTGAAGATTTAGGTCAGGCAAA 371

D28817 963 ACGTATTGTTATCAACAAAGATAACACCACCATCATCGACGGTATCGGCGATGAAGCACA 1022
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 372 ACGTATTGTTATCAACAAAGATAACACCACCATCATCGACGGTATCGGCGATGAAGCACA 431

D28817 1023 AATCCAAGGTCGTGTAGCGCAAATTCGTCAACAAATTGAAGAGTCCACTTCCGACTACGA 1082
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 432 AATCCAAGGTCGTGTAGCGCAAATTCGTCAACAAATTGAAGAGTCCACTTCCGACTACGA 491

D28817 1083 CAAAGAGAAATTACAAGAACGCGTGGCGAAATTGGCCGGCGGTGTTGCGGTGATTAAAGT 1142
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 492 CAAAGAGAAATTACAAGAACGCGTGGCGAAATTGGCCGGCGGTGTTGCGGTGATTAAAGT 551

D28817 1143 GGGCGCGCAACCGAAGTGGAAATGAAAGAGAAAAAAGCGCGGTTGAAGACGCCTTACA 1202
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 552 GGGCGCGCAACCGAAGTGGAAATGAAAGAGAAAAAAGCGCGGTTGAAGACGCCTTACA 611

D28817 1203 CGCGACCCGAGCGGCGGTAGAAGAAGGCATCGTTGCCGGTGGTGGCGTGGCGTTAATTCG 1262
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sekans 612 CGCGACCCGAGCGGCGGTAGAAGAAGGCATCGTTGCCGGTGGTGGCGTGGCGTTAATTCG 671

SP6 sekans sonucu:

D28817 917 GTATGGAATTGGAAAAAGCCACACTTGAAGATTTAGGTCAGGCAAAACGTATTGTTATCA 976
 |||
 Sekans 810 GTATGGAATTGGAAAAAGCCACACTTGAAGATTTAGGTCAGGCAAAACGTATTGTTATCA 751

D28817 977 ACAAAGATAACACCACCATCATCGACGGTATCGGCGATGAAGCACAAATCCAAGGTCGTG 1036
 |||
 Sekans 750 ACAAAGATAACACCACCATCATCGACGGTATCGGCGATGAAGCACAAATCCAAGGTCGTG 691

D28817 1037 TAGCGCAAATTCGTCAACAAATTGAAGAGTCCACTTCCGACTACGACAAAGAAATTAC 1096
 |||
 Sekans 690 TAGCGCAAATTCGTCAACAAATTGAAGAGTCCACTTCCGACTACGACAAAGAAATTAC 631

D28817 1097 AAGAACGCGTGGCGAAATTGGCCGGCGGTGTTGCGGTGATTAAAGTGGGCGGGCAACCG 1156
 |||
 Sekans 630 AAGAACGCGTGGCGAAATTGGCCGGCGGTGTTGCGGTGATTAAAGTGGGCGGGCAACCG 571

D28817 1157 AAGTGGAAATGAAAGAGAAAAAGCGCGCCTTGAAGACGCCTTACACGCGACCCGAGCGG 1216
 |||
 Sekans 570 AAGTGGAAATGAAAGAGAAAAAGCGCGCCTTGAAGACGCCTTACACGCGACCCGAGCGG 511

D28817 1217 CGGTAGAAGAAGGCATCGTTGCCGGTGGTGGCGTTAATTCGTGCAGCCGGCAGAG 1276
 |||
 Sekans 510 CGGTAGAAGAAGGCATCGTTGCCGGTGGTGGCGTTAATTCGTGCAGCCGGCAGAG 451

D28817 1277 TAGTCGGCTTACAAGGCGAGAACGAAGAGCAAAATGTGGGTATCAAGCTTGCCCTTCGTG 1336
 |||
 Sekans 450 TAGTCGGCTTACAAGGCGAGAACGAAGAGCAAAATGTGGGTATCAAGCTTGCCCTTCGTG 391

D28817 1337 CTATGGAAGCACCGTTGCGTCAAATCGTGGCAAATGCCGGTGAAGAAGCTTCCGTGATCG 1396
 |||
 Sekans 390 CTATGGAAGCACCGTTGCGTCAAATCGTGGCAAATGCCGGTGAAGAAGCTTCCGTGATCG 331

D28817 1397 CCAGCGCAGTGAAGAACGGTGAAGGCAATTTTCGGTTATAACGCAGGCACTGAACAGTACG 1456
 |||
 Sekans 330 CCAGCGCAGTGAAGAACGGTGAAGGCAATTTTCGGTTATAACGCAGGCACTGAACAGTACG 271

D28817 1457 GCGACATGATCGCTATGGGTATTTTGGATCCGACGAAAGTCACCCGTTCCGATTACAAT 1516
 |||
 Sekans 270 GCGACATGATCGCTATGGGTATTTTGGATCCGACGAAAGTCACCCGTTCCGATTACAAT 211

D28817 1517 TTGCGGCGTCTGTTGCCGGTTAATGATCACTACCGAATGTATGGTCACCGAGTTACCGA 1576
 |||
 Sekans 210 TTGCGGCGTCTGTTGCCGGTTAATGATCACTACCGAATGTATGGTCACCGAGTTACCGA 151

D28817 1577 AAGACGACAAAGCTGACCTCGGCGCTGCCGGAATGGGCGGTATGGGAGGCATGGGCGGGA 1636
 |||
 Sekans 150 AAGACGACAAAGCTGACCTCGGCGCTGCCGGAATGGGCGGTATGGGAGGCATGGGCGGGA 91

D28817 1637 TGATGTAA 1644
 |||
 Sekans 90 TGATGTAA 83



T7 primer sekans sonucu



Primer 2 sekans sonucu



SP6 primer sekans sonucu

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 106T417
Proje Başlığı: Proteomik Yaklaşım: Bakteriyel Isı Şoku Proteini GroEL'e Cevaben T Lenfosit Sitokin Profillerinin Çıkarılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Ayten NALBANT
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü –Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Gülbahçe Kampüsü Urla/İZMİR, 35430
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK TBAG
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Ocak 2007-1 Ocak 2009
Öz (en çok 70 kelime) <p><i>A. actinomycetemcomitans</i>-GroEL proteininin T hücreleri üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Araştırmalarımız AaGroEL proteininin; T hücreleri üzerinde antijenik etkisinin olduğu, CD4+T hücrelerini hedef olarak seçtiği, CD4+T hücrelerinin CD25 ve CD69 aktivasyon markörlerini ekspres ettiklerini, sitokin profillerine göre CD4+T hücrelerinin Th1 fenotipine polarize olduklarını göstermektedir. Ayrıca, AaGroEL proteininin T hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin apoptoz aracılığı ile oluştuğu ve bu apoptotik etkinin aktivasyonu takiben seçici olarak belirli T hücre altgruplarında olabileceğini görülmektedir.</p>
Anahtar Kelimeler: Mikrobial ısı şoku proteinleri, GroEL, <i>A.actinomycetemcomitans</i> , ısı şoku proteini 60, T Lenfositleri, Sitokinler, immün yanıt, immün düzenleme, kronik enflamasyon, çoklu boncuk testleri, akım sitometrisi, proteomik
Projeden Yapılan Yayınlar: