

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**U-937 VE THP-1 HÜCRELERİNİN DİFERANSİYASYONU VE
POLARİZASYONUNDA SIK GENLERİNİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Yasemin SEZİKLİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. ALİ OKUYUCU

SAMSUN/2016

ÖNSÖZ

Bu uzun ve meşakkatli yolda; tez yapım aşamasında desteğini her daim yanımda bulduğum başta tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ali Okuyucu'ya, uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin hazırlanması aşamalarında yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Abdulkerim Bedir'e, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ramazan Amanvermez, Prof. Dr. Nermin Kılıç, Doç. Dr. Bahattin Avcı, Doç. Dr. Birşen Bilgici, Yrd. Doç. Dr. Özgür Korhan Tuncel ve Yrd. Doç. Dr. Osman Salış'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında ve yazım aşamasında büyük özveriyle yardımcı olan değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Sinan Ürkmez, Araş. Gör. Eser Yener, Doktora Öğr. Dilara Aliyeva'ya, birlikte çalıştığım arkadaşlarım Doktora Öğr. Turkhan Baratzade, Doktora Öğr. Emil Rzayev, Dr. Yeşim Civil, Dr. Dilek Gül ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca tüm zorluklara rağmen, maddi-manevi desteğini esirgemeyen ve beni bugünlere taşıyan Anne ve Babama, her zaman bana destek olan değerli eşim İsmail'e, hayatıma neşe ve anlam katan oğlum Ahmet Efe'ne en kalbi şükranlarımı sunuyorum.

Not: Bu çalışma OMÜ araştırma fonu tarafından desteklenmiştir (PYO. TIP. 1904-15-035)

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar	v
ŞEKİLLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KISALTMALAR.....	v
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Makrofajlar.....	6
2.1.1. Makrofaj Fonksiyonları	8
2.2. Makrofaj Polarizasyonu	10
2.2.1. Makrofaj Plastisitesi	13
2.2.2. Tümör ve Makrofaj Polarizasyonu	14
2.2.3. IRF/STAT sinyali	16
2.2.4. Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle edici Faktör (GM-CSF).....	21
2.2.5. HIF-1 α / HIF-2 α (Hypoxia-inducible factors 1 α /2 α)	22
2.3. Tümör Mikroçevresi.....	23
2.4. TAM'ın kökeni.....	25
2.4.1. M2 Polarize Makrofajlar Olarak TAM.....	25
2.4.2. TAM ve Tümör Progresyonu	27
2.4.3. TAM ve Anjiogenez	28
2.4.4. TAM ve Matriks Remodelizasyonu	31
2.4.5. Anti-Tümör İmmün Cevapta TAM'ın Rolü	32
2.5. AMPK-İlişkili Kinaz	34
2.5.1. AMPK-ilişkili Kinaz'ın Sınıflandırılması	34
2.5.2. SIK (Salt Inducible Kinase).....	36
2.6. Sitokinler	43
2.6.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α).....	43
2.6.2. İnterlökin 12 (IL-12).....	43
2.6.3. Lipopolisakkarit (LPS)	44
2.6.4. İnterferon Gamma (IFN- γ)	44
2.6.5. İnterlökin 10 (IL-10).....	45

2.6.6. İnterlökin 4 (IL-4).....	46
2.6.7. İnterlökin 13 (IL-13).....	47
2.6.8. Transforming Growth Faktör Beta (TGF- β).....	47
2.7. U937 ve THP-1 Hücreleri	47
3. MATERYAL – METOT	50
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	50
3.2. Kullanılan Kimyasallar	51
3.3. U-937 ve THP-1 Hücre Kültürü.....	53
3.3.1. Hücre Kültür Solüsyonları.....	53
3.3.2. U-937 Hücre Kültür Protokolleri.....	57
3.3.3. THP-1 Hücre Kültür Protokolleri.....	58
3.4. Çalışmanın Yapılması	59
3.4.1. U-937 ve THP-1 hücrelerinin kültüre edilmesi	59
3.4.2. U-937 ve THP-1 hücrelerinin makrofaja (M0) diferansiye edilmesi	60
3.4.3. Çalışma gruplarının oluşturulması	61
3.4.4. M1 ve M2 polarize edici kimyasalların hazırlanması ve uygulanması	61
3.4.5. Süpernatantların elde edilmesi	62
3.5. Flow sitometri analizi.....	62
3.6. U-937 ve THP-1 hücrelerinden RNA izolasyonu	63
3.7. RNA izolatlarından cDNA sentezi.....	65
3.8. Real Time Q-PCR ile gen ekspresyon analizi.....	66
3.8.1. Biyoinformatik analiz	66
3.8.2. GAPDH için Real Time Q-PCR Çalışması.....	69
3.8.3. SIK1 için Real Time Q-PCR Çalışması	70
3.8.4. SIK2 için Real Time Q-PCR Çalışması	70
3.8.5. SIK3 için Real Time Q-PCR Çalışması	71
3.9. TNF- α , IL-10, IL-12p70 ELISA Çalışmaları.....	73
3.10. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi	74
4. BULGULAR.....	75
4.1. Flow sitometri Analizi.....	75
4.2. THP-1 hücrelerinde RNA konsantrasyonları	77
4.3. U-937 hücrelerinde RNA konsantrasyonları.....	77
4.4. Kantitatif Real Time-PCR Sonuçları	78
4.5. REST analizi	79

4.5.1. M0'a göre REST analizi.....	79
4.5.2. M (LPS+IFN- γ)'ya göre REST analizi.....	84
4.6. Sitokin Düzeyleri	95
4.6.1. THP-1 hücreleri sitokin düzeyleri	95
4.6.2. U-937 hücreleri sitokin düzeyleri.....	98
5. TARTIŞMA.....	102
6. SONUÇLAR.....	108
KAYNAKLAR	109



TABLolar

Tablo I	PBS solüsyon hazırlığı	55
Tablo II	RPMI 1640 KM hazırlığı	56
Tablo III	Freeze medyum	56
Tablo IV	Çalışma grupları	61
Tablo V	RNA izolasyon protokolü	63
Tablo VI	RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı	64
Tablo VII	cDNA sentez protokolü	65
Tablo VIII	GAPDH Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği	69
Tablo IX	Real Time Q-PCR programı	70
Tablo X	SIK1 Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği	70
Tablo XI	SIK2 Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği	71
Tablo XII	SIK3 Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği	71
Tablo XIII	THP-1 hücrelerinin RNA kantitasyon sonuçları	77
Tablo XIV	U-937 hücrelerinin RNA kantitasyon sonuçları	77
Tablo XV	THP-1 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Cp değerleri	78
Tablo XVI	U-937 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Cp değerleri	79
Tablo XVII	THP-1 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	80
Tablo XVIII	U-937 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	81
Tablo XIX	THP-1 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	82
Tablo XX	U-937 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	83
Tablo XXI	THP-1 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	84
Tablo XXII	U-937 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	85
Tablo XXIII	THP-1 hücrelerinde IL-4+IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	86
Tablo XXIV	U-937 hücrelerinde IL-4+IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	87
Tablo XXV	THP-1 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	88
Tablo XXVI	U-937 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	89

Tablo XXVII	THP-1 hücrelerinde TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	90
Tablo XXVIII	U-937 hücrelerinde TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	91
Tablo XXIX	THP-1 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları	92
Tablo XXX	U-937 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları.....	93
Tablo XXXI	THP-1 hücreleri sitokin düzeyleri	95
Tablo XXXII	U-937 hücreleri sitokin düzeyleri	98



ŞEKİLLER

Şekil 1	Mononükleer fagosit ailesi.	7
Şekil 2	M1 ve M2 polarize makrofajların şematik sunumu.	11
Şekil 3	Kanserdeki makrofaj plastisitesinin şematik sunumu	16
Şekil 4	M1 ve M2 makrofaj polarizasyonunun başlıca regülatör yolları.	18
Şekil 5	AMPK-ilişkili kinazlar	35
Şekil 6	SIK izoformları. Her üç izoformda korunmuş ve regülatuar alanların şematik gösterimi.	38
Şekil 7	SIK-CRTC3 Sinyal kaskadı tarafından IL-10 üretiminin kontrolü.....	41
Şekil 8	GAPDH primer-prob dizaynı	67
Şekil 9	SIK1 primer-prob dizaynı	68
Şekil 10	SIK2 primer-prob dizaynı	68
Şekil 11	SIK3 primer-prob dizaynı	69
Şekil 12	THP-1 Hücrelerinin Flow sitometri Analiz Sonuçları.	75
Şekil 13	U-937 Hücrelerinin Flow sitometri Analiz Sonuçları.....	76
Şekil 14	THP-1 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları.....	80
Şekil 15	U-937 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları.....	81
Şekil 16	THP-1 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	82
Şekil 17	U-937 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları.	83
Şekil 18	THP-1 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları.....	84
Şekil 19	U-937 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	85
Şekil 20	THP-1 hücrelerinde IL-4+IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları .	86
Şekil 21	U-937 hücrelerinde IL-4+IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları ..	87
Şekil 22	THP-1 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları.....	88
Şekil 23	U-937 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	89
Şekil 24	THP-1 hücrelerinde TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları.....	90
Şekil 25	U-937 hücrelerinde 10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları	91
Şekil 26	THP-1 hücrelerinde M0'a göre SIK1-2-3 gen ekspresyon düzeyleri.....	92
Şekil 27	THP-1 hücrelerinde M (LPS+IFN- γ)'ya göre SIK1-2-3 gen ekspresyon düzeyleri.....	93

Şekil 28 U-937 hücrelerinde M0'a göre SIK1, SIK 2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeyleri	94
Şekil 29 U-937 hücrelerinde M (LPS+IFN- γ)'ya göre SIK1, SIK 2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeyleri.....	94
Şekil 30 THP-1 hücreleri TNF- α düzeyleri	96
Şekil 31 THP-1 hücreleri IL-10 düzeyleri.....	96
Şekil 32 THP-1 hücreleri IL-12p70 düzeyleri.....	97
Şekil 33 THP-1 hücreleri IL-10/ IL-12p70 oranı	97
Şekil 34 U-937 hücreleri TNF- α düzeyleri.....	99
Şekil 35 U-937 hücreleri IL-10 düzeyleri.....	99
Şekil 36 U-937 hücreleri IL-12p70 düzeyleri.....	100
Şekil 37 U-937 hücreleri IL-10/ IL-12p70 düzeyleri	100

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AKT	: V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK5	: Activin A receptor type II-like kinase 5
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
APC	: Antijen sunucu hücre
Arg	: Arjinin
Arg 1	: Arjinaz 1
ATP	: Adenozin trifosfat
BLAST	: Basic local alignment search tool
BMDM	: Kemik iliği kaynaklı makrofaj
BRSK1	: Brain-specific kinase 1
BRSK2	: Brain-specific kinase 2
bp	: Base pair
C	: Sitozin
c-Maf	: V-Maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
c-Myc	: V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
C.I.	: Confidens intervale
CaMK	: Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CCL2/MCP-1	: Kemokin (C-C Motif) ligand 2/ Monosit kemoatraktan protein1
CCL5	: Kemokin (C-C Motif) ligand 5
CCL7	: Kemokin (C-C Motif) ligand 7
CCL8	: Kemokin (C-C Motif) ligand 8
CCL17	: Kemokin (C-C Motif) ligand 17
CCL22	: Kemokin (C-C Motif) ligand 22
CCL24	: Kemokin (C-C Motif) ligand 24
CD3ζ	: Cluster of differentiation 3, zeta-chain
CD4⁺ T	: T helper lenfosit
CD8⁺ T	: Sitotoksik T lenfosit
CD11b	: Cluster of differentiation 11b
CD14	: Cluster of differentiation 14

CD64	: Cluster of differentiation 64
CD163	: Cluster of differentiation 163
ChREBP	: Carbohydrate-responsive element-binding protein
CMP	: Common myeloid progenitor
COX-2	: Sikloksijenaz 2
Cp	: Crossing point
CREB	: Cyclic AMP response element-binding protein
CRTC	: Cyclic AMP response element-binding protein regulated transcription coactivator
CRTC1/TORC1	: Cyclic AMP response element-binding protein regulated transcription coactivator 1/ Transducer of regulated CREB activity 1
CRTC2/TORC2	: Cyclic AMP response element-binding protein regulated transcription coactivator 2/ Transducer of regulated CREB activity 2
CRTC3	: Cyclic AMP response element-binding protein regulated transcription coactivator 3
CXCL1	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 1
CXCL2	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 2
CXCL3	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 3
CXCL5	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 5
CXCL8	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 8
CXCL9	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 9
CXCL10	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 10
CXCL12	: Kemokin (C-X-C Motif) ligand 12
CXCR1	: C-X-C Kemokin reseptör tip 1
CXCR2	: C-X-C Kemokin reseptör tip 2
CXCR4	: C-X-C Kemokin reseptör tip 4
DC	: Dendritik hücre
DC-SING	:Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non- integrin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DOWN	: Downregülasyon
ECM	: Ekstrasellüler matriks

EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
ETS	: E-twenty-six
FBS	: Fetal bovin serum
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FGF2	: Fibroblast büyüme faktörü 2
FPR1	: Formil peptid reseptör 1
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
GMP	: Granülosit-makrofaj progenitör
HAT	: Histon asetil transferaz
HDAC4	: Histon deasetilaz 4
HDAC5	: Histon deasetilaz 5
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1 α
HIF-2α	: Hipoksi ile indüklenen faktör 2 α
HPV16	: Human papilloma virüs 16
HUNK	: Hormonally up-regulated neu-associated kinase
IFNAR	: İnterferon alfa /beta reseptör
IFN-α	: İnterferon alfa
IFN-β	: İnterferon beta
IFN-γ	: İnterferon gamma
IFN-γR	: İFN- γ reseptör
IFN-γR1	: İFN- γ reseptör 1
IFN-γR2	: İFN- γ reseptör 2
IgE	: İmmunglobulin E
IgG	: İmmunglobulin G
IKKα	: İnhibitor of kappa B kinase alfa
IKKβ	: İnhibitor of kappa B kinase beta
IKKγ	: İnhibitor of kappa B kinase gamma
I-Kb	: İnhibitor of kappa B
IL-1	: İnterlökin 1
IL-3	: İnterlökin 3
IL-4	: İnterlökin 4
IL-6	: İnterlökin 6

IL-8	: İnterlökin 8
IL-10	: İnterlökin 10
IL-12	: İnterlökin 12
IL-13	: İnterlökin 13
IL-23	: İnterlökin 23
IL1β	: İnterlökin 1 beta
IL12p40	: İnterlökin 12 subunit p40
IL12p70	: İnterlökin 12 subunit p70
IL-4Rα	: İL 4 reseptör alfa
IL-10R1	: İL 10 reseptör 1
IL-10R2	: İL 10 reseptör 2
IL-13Rα1	: İL 13 reseptör α 1
IRAK3	: İL 1 receptor-associated kinase 3
IRAK4	: İL 1 receptor-associated kinase 4
IRF	: IFN regülatör faktör
IRF3	: IFN regülatör faktör 3
IRS1	: İnsulin reseptör substratı 1
IRS2	: İnsulin reseptör substratı 2
iNOS	: İndüklebilir nitrik oksit sentaz
JAK1	: Janus kinaz 1
JAK3	: Janus kinaz 3
KLF4	: Kruppel-like faktör 4
Leu	: Lösin
LIGHT	: Homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes
LKB1	: Liver kinase B1
LPS	: Lipopolisakkarit
LY6C+	: Lenfosit antijen 6 kompleks
MAPK	: Mitogen-activated protein kinases
MARK1	: Microtubule affinity-regulating kinase 1
MARK2	: Microtubule affinity-regulating kinase 2
MARK3	: Microtubule affinity-regulating kinase 3
MARK4	: Microtubule affinity-regulating kinase 3

M-CSF	: Makrofaj-koloni stimule edici faktör
MDP	: Makrofaj/dendritik progenitör
MDSCs	: Myeloid kökenli baskılayıcı hücreler
MEF2	: Myocyte enhancer factor 2
MELK	: Maternal embryonic leucine-zipper kinase
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
MIF	: Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MMP7	: Matriks metalloproteinaz 7
MMP9	: Matriks metalloproteinaz 9
MO25	: Mouse protein-25
MyD88	: Myeloid differentiation primary response protein 88
MyD88sh	: Short version of MyD88
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NK	: Natural killer hücresi
NLS	: Nuclear localization signal
NO	: Nitrik oksit
NOS2	: Nitrik oksit sentaz 2
NUAK1	: Sucrose non-fermenting kinase-1 (SNF-1)-benzeri kinaz 1
NUAK2	: Sucrose non-fermenting kinase-1 (SNF-1)-benzeri kinaz 2
p53/Tp53	: Tümör protein 53
p300	: E1A binding protein
PBS	: Fosfat buffer salin
PCR	: Polymerase chain reaction
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PGE2	: Prostaglandin E2
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
PKA	: Protein kinaz A
PKB	: Protein kinaz B
PKC	: Protein kinaz C
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PME1	: Protein fosfataz metilesteraz 1
PPAR-γ	: Peroxisome proliferator-activated receptors γ
PPME1	: Protein fosfataz metilesteraz 1

PU.1	: Purine-rich nucleic acid binding protein 1
PyMT	: Polyoma middle T oncoprotein
qPCR	: Kantitative PCR
REST	: Relative expression software tool
RETNLA	: Resistin-like molecule alpha
RNI	: Reaktif nitrojen ara ürünleri
ROI	: Reaktif oksijen ara ürünleri
RT-PCR	: Real Time-polymerase chain reaction
RUNX1	: RUNT-Related transcription factor 1
S358	: Serin 358
S551	: Serin 551
S575	: Serin 575
S587	: Serin 587
SHIP	: SH2-containing inositol 5-phosphatase
SHIP1	: SH2-containing inositol 5-phosphatase1
SIK1	: Salt Inducible Kinase 1
SIK2	: Salt Inducible Kinase 2
SIK3	: Salt Inducible Kinase 3
Smad7	: SMAD family member 7
Smurf2	: SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
SNRK	: Sucrose non-fermenting related kinase
STAT	: Signal transduction and activators of transcription
STAT1	: Signal transduction and activators of transcription 1
STAT6	: Signal transduction and activators of transcription 6
SOCS1	: Suppressor of cytokine signaling 1
SOCS3	: Suppressor of cytokine signaling 3
SPHK1	: Sfingozin kinaz 1
SREBF1	: Sterol regulatory element binding transcription factor 1
TAB2	: TGF- β activated kinase 1-binding protein 2
TAK1	: TGF- β activated kinase 1
TAM	: Tümör ilişkili makrofaj
TEM	: Tie-2 ifade eden monosit/makrofajlar
TEPM	: Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta

TGF-βR1	: TGF-β reseptör 1
TGF-βR2	: TGF-β reseptör 2
TGF-βR3	: TGF-β reseptör 3
TGM2	: Transglutaminaz 2
THP-1	: İnsan lösemik monosit hücre hattı
Thr	: Threonin
Thr175	: Threonin 175
Thr182	: Threonin 182
Thr221	: Threonin 221
Thr322	: Threonin 322
Thr484	: Threonin 484
TH1	: T helper 1
TH2	: T helper 2
TH17	: T helper 17
TLR-2	: Toll like reseptör 2
TLR-4	: Toll like reseptör 4
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
TNF-R1	: TNF reseptör 1
TNF-R2	: TNF reseptör 2
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
TRAF6	: TNF receptor-associated factor 6
Treg	: Regülatör T lenfositler
TRIF	: Toll/IL-1R (TIR) domain-containing adapter inducing interferon
TSSK1	: Testis-specific serine/threonine kinase-1
TSSK2	: Testis-specific serine/threonine kinase-2
TSSK3	: Testis-specific serine/threonine kinase-3
TSSK4	: Testis-specific serine/threonine kinase-4
TYK2	: Tirozin kinaz 2
U937	: İnsan lösemik monosit lenfoma hücre hattı
UP	: Upregülasyon
uPA	: Ürokinaz plazminojen aktivatörü
uPAR	: Ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü
UPL	: Universal probe library
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

ÖZET

U-937 VE THP-1 HÜCRELERİNİN DİFERANSİYASYONU VE POLARİZASYONUNDA SIK GENLERİNİN ROLÜ

Tümör mikroçevresi, kanser hücreleri ile birlikte birçok farklı hücrenin bir arada olduğu dinamik bir ortamdır. Bu hücreler sürekli birbirleriyle etkileşim ve iletişim halindedir. TAM (Tümör ilişkili makrofaj), tümör mikroçevresindeki inflamatuvar hücrelerin büyük kısmını oluşturmaktadır. Makrofajlar inflamasyonla kanser arasında kilit rol oynamaktadırlar. SIK (Salt inducible kinase), AMPK ailesine ait olan bir serin/treonin protein kinazdır. SIK genleri genel olarak karbonhidrat ve lipid metabolizmasında rol alsalar da, kas büyümesi ve diferansiyasyonu, tümör baskılanması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve makrofaj polarizasyonunda da etkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda M1 veya M2 makrofaj polarizasyonuna neden olduğu düşünülen bazı maddelerin uyardığı U-937 ve THP-1 monosit hücrelerinde SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri görmeyi amaçladık. Bu amaçla 48 saat PMA (Forbol 12-miristat 13-asetat) uygulaması ile monositler makrofaja diferansiye edildi. Flow sitometride CD11b ve CD14 yüzey antiijenlerinin varlığı ile bu diferansiyasyon teyit edildi. Diferansiye makrofajlar 24 saat boyunca 10 ng/ml LPS (Lipopolisakkarit), 10 ng/ml LPS+20 ng/ml INF- γ , 20 ng/ml IL-4, 20 ng/ml IL-4+20 ng/ml IL-13, 20 ng/ml IL-10 ve 10 ng/ml TGF- β ile muamele edildi. Daha sonra kantitatif Real Time PCR ile SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeylerini belirlendi. Ayrıca TNF- α , IL-10 ve IL-12p70 protein düzeylerini de ölçüldü.

LPS uygulamasının THP-1 hücrelerinde SIK3 ekspresyonunu anlamlı bir şekilde azalttığını bulduk, U-937 hücrelerinde ise anlamlı bir değişim yoktu. LPS+IFN- γ kombinasyonu ile ise THP-1 hücrelerinde SIK1, SIK2, SIK3 genlerinin, U-937 hücrelerinde ise SIK1 ve SIK3 genlerinin ekspresyonu artmıştır.

LPS+IFN- γ kombinasyonu LPS'ye göre U-937 hücrelerinde, SIK1 ve SIK3, THP-1 hücrelerinde ise SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonunu anlamlı bir şekilde artırdı. Her iki hücrede LPS+IFN- γ kombinasyonunun uygulanması tek başına LPS'ye göre farklılık gösterdi.

U-937 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonunu M2 polarize makrofaj [M (IL-4), M (IL-4+IL-13), M (IL-10), M (TGF- β)] gruplarında M1 polarize makrofaja [M (LPS+IFN- γ)] göre düşük bulduk. M (IL-4) ve M (IL-4+IL-13)'deki bu azalma anlamlıydı. Tam tersine tüm M2 polarize makrofaj gruplarında SIK2 gen ekspresyonunun M1 polarize makrofajlara göre artmıştı. SIK3 gen ekspresyonunda ise tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre anlamlı olmayan bir azalma görüldü. THP-1 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonu tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre azalmıştı ama özellikle M (IL-4), M (IL-4+IL-13) ve M (IL-10)'da bu azalma anlamlıydı. SIK2 gen ekspresyonunda ise M (TGF- β) hariç tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre anlamlı olmayan bir azalma görüldü. THP-1 hücrelerinde SIK3 gen ekspresyonu tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre anlamlı olarak azalmıştı. Makrofajların sitokin üretimi incelendiğinde THP-1 hücrelerinde M (LPS+IFN- γ) makrofajda TNF- α , IL-12p70 ve IL-10 düzeylerinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu görüldü. U937 hücrelerinde ise IL-10 düzeyleri ve IL-10/IL-12p70 oranı M (IL-4) ve M (IL-4+IL-13) makrofajda M (LPS) veya M (LPS+IFN- γ)'ya göre yüksek, IL-12p70 protein düzeyleri de M (LPS) ve M (LPS+IFN- γ)'da diğer gruplara göre daha yüksekti.

Sonuç olarak her iki hücre grubunda da M2 fenotipi makrofajlarda SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonunun azaldığı, SIK2 gen ekspresyonunun ise hücreden hücreye farklılık gösterdiğini gördük. Bu bulgulardan SIK1 ve SIK3'ün biribiri ile uyumlu hareket ederken SIK2'nin ters yönde bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bundan sonraki çalışmalarda farklı sürelerdeki SIK gen ekspresyonları ile birlikte SIK protein düzeylerinin de ölçülmesi makrofaj polarizasyonunda SIK genlerinin rolüne açıklık getireceği gibi tümör mikroçevresini gözönünde bulunduran tedavilere yeni bir hedef gösterecektir.

Anahtar Kelimeler: U-937; THP-1; Makrofaj polarizasyonu; SIK

SUMMARY

ROLE OF SIK GENES IN DIFFERENTIATION AND POLARIZATION OF U-937 AND THP-1 CELLS

Tumor microenvironment is a dynamic environment that includes cancer cells and many different cell types together. These cells are in continuous interaction and communication with each other. TAM (Tumor associated macrophage) form the majority of inflammatory cells in the tumor microenvironment. Macrophages play a key role between cancer and inflammation. SIK (Salt inducible kinase) isoforms, members of the AMPK family are serine/threonine protein kinases. Although they often have a role in carbohydrate and lipid metabolism, SIK are considered to be effective in muscle growth and differentiation, tumor suppression, regulation of cell cycle and macrophage polarization.

In our study, we aimed to see the changes in expression of SIK1, SIK2 and SIK3 genes in U-937 and THP-1 monocyte cells by stimulated some agents that are considered to be caused M1 or M2 macrophage polarization. For this purpose, monocytes were differentiated to macrophages by PMA (Forbol 12-miristat 13-asetat) application for 48 hours. The differentiation was confirmed by the presence of CD11b and CD14 surface antigen in flow cytometry. Differentiated macrophages were treated with 10 ng/ml LPS (Lipopolisakkarit), 10 ng/ml LPS+20 ng/ml INF- γ , 20 ng/ml IL-4, 20 ng/ml IL-4+20 ng/ml IL-13, 20 ng/ml IL-10 and 10 ng/ml TGF- β for 24 hours. Then, SIK1, SIK2 and SIK3 gene expression levels were determined by quantitative Real Time PCR. In addition, TNF- α , IL-10 and IL-2p70 protein levels were measured by ELISA.

It was found that application of the LPS significantly reduces the SIK3 expression in THP-1 cells, while there was no significant change in U-397 cells. Combination of LPS+INF- γ in THP-1 cells, increased the expression of SIK1-3, in U-937 cells increased the expression of genes SIK1 and SIK3. The implementation LPS+INF combination in both cell lines was significantly different compared to only LPS application.

SIK1 gene expression in U-937 cells was lower in M2 polarized macrophage groups [M (IL-4), M (IL-4+IL-13), M (IL-10), M (TGF- β)] compared to M1 polarized

macrophage groups [M (LPS+IFN- γ)]. This reduction was significant in M (IL-4), M (IL-4+IL-13). On the contrary, in all M2 polarized macrophage groups, SIK2 gene expression was higher than M1 polarized macrophage groups. While SIK3 gene expression was lower all M2 polarized macrophage groups compared to M1 polarized macrophage groups but this reduction was not significant. In THP-1 cells SIK1 gene expression was reduced in all M2 polarized macrophages compared to M1 polarized macrophages but it was significant only in M (IL-4), M (IL-4+IL-13) and M (IL-10). SIK2 gene expression was lower in all M2 polarized macrophages excluding M (TGF- β) compared to M1 polarized macrophages but none of them was significant. While SIK3 gene expression was significantly decreased in all groups M2 polarized macrophages compared to the M1 polarized macrophages in THP-1 cells. When the cytokine production of macrophages was examined; in THP-1 cells, M (LPS+IFN- γ), macrophages have significantly higher levels of TNF- α , IL-12p70 and IL-10 than the other groups; in U-937 cells, M (IL-4) ve M (IL-4+IL-13) macrophages have significant higher IL-10 levels and IL-10 / IL-12p70 rate compared to M (LPS) and M (LPS+IFN- γ) groups and besides IL-12p70 protein levels in M (LPS) and M (LPS+IFN- γ) was higher than the other groups.

In conclusion, in M2 macrophages of both cell lines have reduced SIK1 and SIK3 gene expression but SIK2 gene expression has variable pattern from cell to cell was observed. Based on these findings, it is considered that SIK1 and SIK3 are compatible with each other while SIK2 has the opposite effect on this pattern. We believe that this study can be developed by measuring SIK gene expression and the level of SIK protein in different time and with all these shows a new target for therapies to consider the tumor microenvironment.

Key words: U-937; THP-1; Macrophage polarization; SIK;

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Makrofajlar sistemik bir inflamasyon ve enfeksiyon durumunda immun cevabın en önemli bileşenidir. Doğal ve kazanılmış bağışıklıkta görev almaktadır ve nötrofillerle birlikte immun cevapta ilk adımı oluşturmaktadırlar. Makrofajlar fagositozdan, antijen sunumundan, sitokin salınımından ve kemotaksisten sorumludurlar (Sintiprungrat ve ark., 2010). Ayrıca, antimikrobiyal savunmada, antikanser immün cevapta ve diğer birçok patolojide (metabolizma, obezite, bronşial astım ve allerji, tümörögenез, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz, yara iyileşmesi ve fibrozis) önemli rol oynamaktadırlar (Murray, 2011).

Lokal mikro çevresel sinyaller makrofaj heterojenitesini ve fonksiyonlarını etkilemektedirler (Murray, 2011). Doku mikroçevresine ve/veya inflamatuvar duruma bağlı olarak makrofajlar başlıca pro-inflamatuvar M1 tip ve anti-inflamatuvar M2 tip makrofaj olarak ikiye ayrılmaktadırlar (Mantovani ve ark., 2005; Komohara ve ark., 2014). Bu M1 ve M2 makrofaja uzmanlaşma prosesi makrofaj polarizasyonu olarak isimlendirilmektedir. LPS, INF- γ (İnterferon gamma) tarafından aktive edilen M1 makrofajlar IL-6 (İnterlökin 6), IL-12 (İnterlökin 12), NO (Nitrik oksit), TNF- α (Tümör nekrozis faktör alfa) gibi proinflamatuvar sitokinler üretmektedirler. M1 makrofajlar mikroorganizmaların hedeflenmesinde ve enfekte hücrelerin yıkımında rol almaktadırlar. (Biswas ve ark., 2012). IL-4 (İnterlökin 4), IL-10 (İnterlökin 10), IL-13 (İnterlökin 13) tarafından aktive edilen M2 makrofajlar ise IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinler salgılayarak yara iyileşmesi ve anjiogeneze katkıda bulunmaktadır (Mantovani ve ark., 2006). M1 ve M2 makrofajlar fonksiyonel olarak birbirine zıt olarak çalışmaktadırlar. Aslında yapılan son çalışmalar, makrofaj aktivasyonunun plastitise gösterdiğini, hızlı ve geri dönüşümlü olduğunu göstermiştir. İnflamasyonun başlangıç aşamasında M1 makrofajlar anti-mikrobiyal aktivite ile enfeksiyon bölgesinde baskın iken, inflamasyon sona erdiğinde ise M2 makrofajlar enfeksiyon bölgesinde baskın hale gelmektedir (Biswas ve ark., 2012). Polarite dengesi uygun immun fonksiyon için önemlidir. Kontrol edilemeyen M1 veya M2 makrofaj aşırı ekspresyonu olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Sepsis sırasında makrofaj ve monositler hiperinflamatuvar M1 fenotiplerine aktive edilmekte ve bunlar da dokuya zarar veren sitokinlerin aşırı salınımına neden olmaktadır. Sepsis, organ kaybına ve kan damarlarında hemorajiye neden olabilmektedir. (Biswas ve ark., 2012). M2

makrofajların over-ekspresyonu ise özellikle kanser gibi hastalıkların ilerlemesinde rol oynamaktadır.

Tümör hücreleri, yüksek derecede genetik heterojeniteye sahiptir ve tümör mikroçevresi olarak isimlendirilen kompleks bir çevre oluşturmaktadır. Tümör mikroçevresinde, birbiri ile ve tümör hücresi ile ilişkili olarak fibroblastlar, endotel hücreleri ve inflamatuvar hücreler gibi çeşitli hücreler ve ekstraselüler matriks komponentleri bulunmaktadır. Fenotipik ve fonksiyonel makrofaj çeşitliliği bu içeriği daha da genişletmektedir (Quail ve ark., 2013). Kanserin başlaması, büyümesi ve yayılması bu inflamatuvar hücreler ve bu hücrelerden kaynaklanan inflamatuvar mediatörler (sitokin, kemokin gibi) aracılığı ile şekillenmektedir. Bu inflamatuvar hücrelerin en önemlisi tümör ilişkili makrofajdır. TAM, tümör dokularına veya tümör mikroçevresine infiltre olmuş makrofaj olarak tanımlanabilmektedir. TAM, kemik iliği, dolaşan monositler ve splenik monositlerden köken alabilmektedir. (Cortez-Retamozo ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalarda olgun TAM'ın M2 makrofaja benzer fenotipe ve işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Mantovani ve ark., 2002). Gerçekten de, pek çok açıdan TAM, inflamatuvar yanıtın ve adaptif bağışıklığın düzenlenmesi, doku yeniden yapımı ve onarımı, anjiogenezin gelişimi gibi M2 makrofajın özelliği olan bir dizi fonksiyonu göstermektedir. Bununla birlikte, farklı deneysel tümör modelleri ile yapılan çalışmalar, TAM'ın proinflamatuvar (M1), immünsüpresif (M2) veya bu karakteristiklerin bir kombinasyonu gibi çeşitli fenotiplere sahip olduğunu göstermiştir (Biswas ve ark., 2008). Ayrıca tümörün farklı bölgelerinde farklı polarize makrofajların varlığı bildirilmiştir. Bir meme adenokarsinom modelinde, normoksik tümör dokularında bulunan, yüksek MHCII (Majör histokompatibilite kompleks II) profiline sahip TAM'ların anti-anjiogenik fonksiyonlara sahip olduğu ve M1 markırlarının ekspresyonunu yaptığı bulunmuştur. Bunun tersi olarak hipoksik tümör dokularında ise düşük MHCII profiline sahip TAM'ların belirgin proanjiogenik fonksiyonlar göstererek M2 markırlarının ekspresyonunu yaptıkları bulunmuştur (Movahedi ve ark., 2010). Çeşitli inflamasyon kaynaklı kanserlerin transgenik modellerindeki çalışmalarda, inflamatuvar M1 makrofajlar tümörögenез ve kansere bağlı inflamasyonda rol alır iken (Karin ve Greten 2005) tümörlerde M2 benzeri TAM'ların varlığının tümör kaynaklı immünsupresyonu artırdığı gösterilmiştir (Biswas ve ark., 2006). Böylece, oluşan

tümörlerde makrofajların fenotiplerinin tümörün başlangıcı sırasında inflamatuvar fenotipten immünsupresif (M2-benzeri) fenotipe değiştiğine inanılmaktadır (Biswas ve ark., 2008). TAM, farklı mikroçevreye adaptasyon için heterojen plastisite ve fleksibiliteye sahiptir (Biswas ve Mantovani, 2010). Bu bulgular kanserin ilerlemesi sırasında makrofajların plastisite göstermesi kavramını desteklemektedir (Biswas ve Mantovani, 2010). Yaygın görüş tümör mikroçevresindeki farklı lökositler, mediyatörler ve sinyaller TAM ile etkileşerek M1/M2 belirtileri gösteren farklı TAM fenotiplerini oluşturabileceğidir. Tümör mikroçevresindeki makrofajların M1 fenotipinde olması veya en azından M2 makrofaja dönüşmemesi istenmektedir.

M1 ve M2 makrofajları kendilerine özgü sinyal yollarına sahiptir. TLR (Toll-like reseptör) stimülasyonu makrofajların aktivasyonu için gerekli ilk sinyaldir. TLR stimülasyonu; MAPKs (Mitogen-activated protein kinases), NF- κ B (Nükleer faktör κ B) ve IRF (İnterferon regülasyon faktör) sinyal aksının fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlamaktadır. Daha sonrasında; makrofajın tüm fenotipleri sekonder sinyaller tarafından yönlendirilmektedir. Bu sekonder sinyaller, CREB (Cyclic AMP response element-binding protein)'in fonksiyonunu düzenlemektedir. CREB bir transkripsiyon faktörüdür ve antiinflamatuvar moleküllerin üretimini sağlamaktadır. Daha sonra; IFN- γ gibi CREB fonksiyonunu baskılayan agonistler, klasik olarak aktive olan M1 makrofajları indüklemektedir. CREB'in PGE2 (Prostaglandin E2) gibi ajanlar tarafından aktivasyonu, düzenleyici (regulatory-like) M2 makrofaj oluşumuna katkıda bulunur (Kawai ve ark., 2010; Clark, 2014).

Yakın zamanda; yapısal olarak ilişkisiz bazı inhibitörlerinin anti-inflamatuvar M2 (regulatory-like) makrofajların birçok karakteristik özelliğini indüklediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar; bu küçük moleküllerin makrofajlarda CREB fonksiyonunu indüklemek için SIK ailesinin üyelerini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Clark ve ark., 2012).

SIK, AMPK (5'adenosine monophosphate-activated protein kinase) ilişkili kinazlar ailesinin bir üyesidir. AMPK-ilişkili kinazlar metabolizma, hücre çoğalması, hücre polarizasyonu, kanser gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir role sahiptir (Bright ve ark., 2009).

SIK1 ilk olarak yüksek tuz diyetiyle beslenen ratların adrenal bezlerinden tesbit edilmiş bir serin/treonin protein kinazdır (Wang ve ark., 1999). Diğer 2 izoformu SIK2 ve SIK3 ise, SIK1 ile sekans homolojisi gösterdikleri tesbit edilerek tanımlanmıştır (Horike ve ark., 2003). SIK1 geni 21q22.3 kromozomunda lokalize iken, SIK2 ve SIK3 sırasıyla 11q23.1 ve 11q23.3 kromozomunda lokalizedirler (Lin ve ark., 2000).

Serin/treonin protein kinaz SIK1; glukoneogenezde ve lipogenezin regülasyonunda, kas büyümesinde ve diferansiyasyonunda, tümör baskılanmasında ve hücre döngüsü regülasyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. (<http://www.uniprot.org>).

SIK izoformları (SIK1, SIK2, SIK3) için ortak substratlar, sınıf 2 histon deasetilazlar (HDAC4, HDAC5) ve CRTC (Cyclic AMP response element-binding protein regulated transcription coactivator) ailesi (CRTC1, CRTC2, CRTC3) proteinleridir. Aynı zamanda SIK izoformlarının en iyi karakterize edilen fonksiyonu, CRTC ve sınıf 2 HDAC üzerinden çeşitli regülatörleri üzerine etki ederek gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Temel durumda CRTC'nin SIK tarafından fosforilasyonu, 14-3-3 proteinleri ile CRTC'nin etkileşimini indüklemekte ve ardından sitoplazmada hapsetmektedir (Screaton ve ark., 2004; Bittinger ve ark., 2004). cAMP sinyalizasyonu ve PKA (Protein kinaz A) tarafından fosforilasyonu SIK'in CRTC'ye doğru aktivitesini inhibe etmektedir. Böylece CRTC defosforilasyon sonucu nükleusa alınmaktadır (Koo ve ark., 2005). Nükleusta CRTC, CREB hedef gen transkripsiyonu düzenlenmesinde rol almaktadır.

SIK'in inhibisyonu, CRTC3 (CREB-regulated transcription co-activator 3)'ün defosforilasyonuna ve bu molekülün, CREB ile ilişkili olduğu nükleusa translokasyonuna neden olmaktadır. Nükleusta CTRC3, CREB ile kompleks oluşturarak IL-10 gibi antiinflamatuvar etkili genlerin ekspresyonunu artırmaktadır. SIK'lerin inhibisyonu, pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-12 ve TNF- α) baskılanmasına da neden olmaktadır (Clark ve ark., 2012).

Araştırmacılar, hücre kültüründe makrofaj benzeri fonksiyonları çalışmak amacıyla genellikle insan U-937 veya THP-1 monosit hücre serilerini kullanmışlardır (Dockrell ve ark., 2010). Biz de bu monosit hücre serilerininin PMA ile makrofaj hücrelerine dönüşümünü sağladıktan sonra LPS, INF- γ , IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β

(Transfore edici büyüme faktörü beta) ile bu makrofajları uyararak SIK gen profilini belirlemeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Makrofajlar

Monositler ve makrofajlar doğal bağışıklık sisteminin önemli hücresel bileşenleridir. Makrofajlar kemik iliği kaynaklı monositlerden veya embriyonik yolk sac'tan köken almaktadırlar (Murray 2016).

Monositler ise, olgun kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden köken almaktadırlar. Bu hücreler, monosit serisi yönünde aktive edildikleri zaman, common myeloid progenitor (CMP) hücrelere farklılaşmaktadırlar. Oluşan CMP'ler granülosit ve makrofaj progenitörlerine (GMP) farklılaşmakta GMP'ler de daha sonra makrofaj ve dentritik hücre progenitörlerine (MDP) dönüşecekleri bir yol izlemektedirler. Son aşamada ise MDP'lerin farklılaşması ile makrofajlar meydana gelmektedirler (Chow ve ark., 2011).

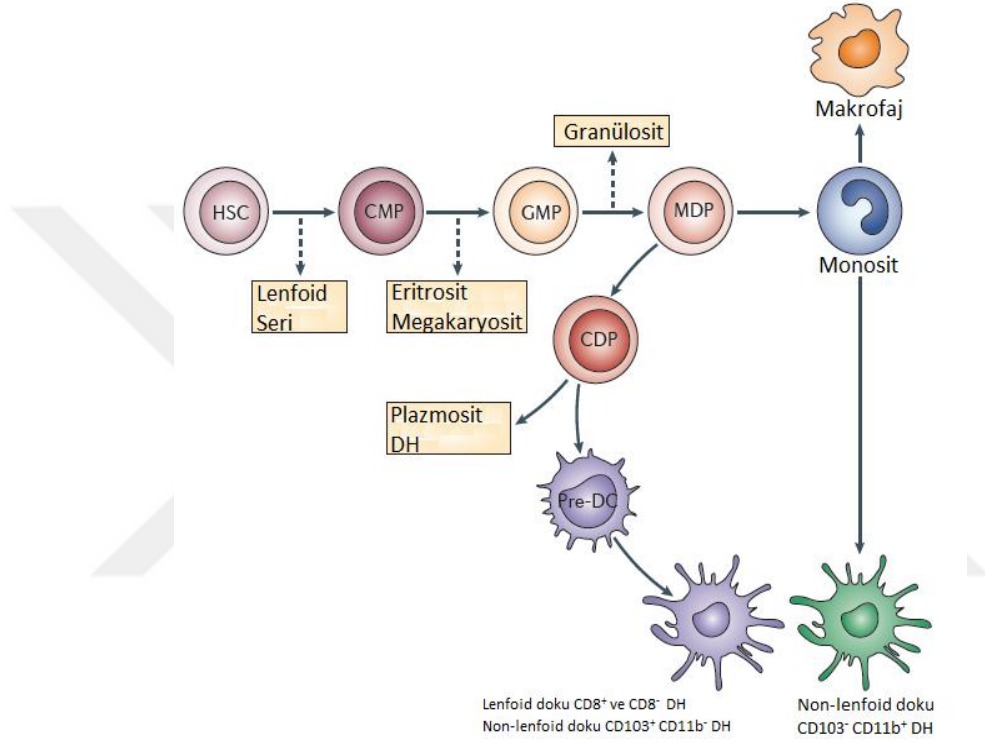
Monositler gelişim ve farklılaşma sırasında IL-1 (İnterlökin 1), IL-3 (İnterlökin 3), IL-6, GM-CSF (Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör), M-CSF (Makrofaj-koloni stimüle edici faktör) sitokinleri tarafından kontrol edilmektedirler. GM-CSF, granülosit proliferasyonu ve monosit öncüllerinin gelişmesi yönünde çalışırken, M-CSF monosit proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlamaktadır (Corbi ve Vega, 2006).

Monositler kandaki lökositlerin % 3–8'ini oluşturmaktadırlar. Kandaki monositler 10–18 µm çapında, lenfositten daha büyük hücrelerdir. Morfolojik olarak nükleusları oval, at nalı veya böbrek şeklindeyken, stoplazmaları ise geniş ve de azurofilik granüllere sahiptirler.

İntrastoplazmik lizozomları ve gelişmiş golgi kompleksleri vardır. Lizozomlar, mikrobisidal etkinlikte önemli olan peroksidazları ve asit hidrolazları içermektedirler. Monositler amöboid tarzda hareket etmektedirler (Taylor ve ark., 2005; Murray ve ark., 2016).

Periferik kanda monositler birkaç gün (1–3 gün) bulunduktan sonra kan damarlarından diyapedez yolu ile dokulara göç ederek doku makrofajlarını oluşturmaktadırlar. İmmun, metabolik veya proinflamatuvar faktörler gibi birçok etken, monositleri kandan ayrılarak doku makrofajlarına dönüşmeleri yönünde uyarmaktadır (Gordon ve Taylor, 2005).

Monositlerin, makrofajlara farklılaşma prosedürü, ETS (E-twenty-six) transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan PU.1 (Purine-rich nucleic acid binding protein 1)'i kodlayan RUNX1 (RUNT Related transcription factor 1)'i gerektirmektedir. PU.1 ekspresyonu monositlerin, makrofaj farklılaşma modelini takip etmelerine neden olmaktadır (Lawrence ve Gioacchino, 2011).



Şekil 1. Mononükleer fagosit ailesi.

Bir monositin, makrofajın veya dentritik (DC) hücrenin farklılaşması makrofaj ve DC progenitör (MDP) aşamasında başlamaktadır. MDP'ler, yaygın DC progenitörlere (CDP) veya monositlere dönüşebilmektedir. CDP'ler DC ailesi hücrelerine farklılaşırlar ve hem lenfoid dokulardaki CD8+/- DC'lerin hemde periferal non-lenfoid dokulardaki CD103+ CD11b- DC'lerin üretiminden sorumludur. Ayrıca monositler bazı CD11b+ CD103- DC'lere veya makrofajlara farklılaşabilmektedir. CMP, common myeloid progenitor; GMP, granulocyte and macrophage progenitor; HSC, haematopoietic stem cell (Chow ve ark., 2011).

Makrofajlar, CD11b (Cluster of differentiation 11b) ve TLR-4 (Toll like Reseptör 4) veya TLR-2 (Toll like reseptör 2) ile bağlantılı bir LPS reseptörü olan CD14 (Cluster of differentiation 14) eksprese etmektedirler (Schwende ve ark., 1996).

Doku makrofajları fagositoz, antijen sunumu, sitokin salınımı ve kemotaksisle karakterize edilmektedir. Makrofajlar, monositlere göre birkaç kat daha büyük hücrelerdir. Doku makrofajları, monositlere göre daha uzun ömürlü hücrelerdir, ömürleri yaklaşık 2-4 aydır. (Delves ve ark., 2006). Büyük düzensiz şekilli ve vakuollerle dolu bir stoplazmayla karakterizedirler. Makrofajlar aynı zamanda "çöpçü hücreler" olarak da adlandırılmaktadır, çünkü ölü hücrelerin, kalıntıların (debris) ve diğer patojenik mikroorganizmaların etrafını sarmakta ve onları sindirmektedirler (Delves ve ark., 2006).

Doku makrofajlarının bir kısmı hareketsiz kalmaktadır. Bunlar sabit makrofajlar olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler matriksdeki kollajen fibrillere tutunmaktadır. Diğerleri ise ameboid hareketle sürekli yer değiştirmektedirler. Her iki durumda da yüzeyindeki reseptörlerle ve pinositoz yaparak çevrelerini denetlemektedirler.

Doku yerleşik makrofajlar, akciğer alveolar makrofajları, karaciğer Kupffer hücreleri, böbrekte intraglomerüler mezenseyal hücreler, bağ dokusunda histiositler, osteoklastlar, sinoviyal hücreler ve beyindeki mikroglial hücreleri içermektedir. Bu makrofajlar yolk sac hücrelerinden türemiştir ve öncelikle doku bakım ve de onarım fonksiyonlarına katılmaktadırlar. Bu hücreler, yerleştikleri nihai doku lokalizasyonuna ve fonksiyonlarına bağlı olarak farklı morfolojilere sahip olabilmekte ve hücre yüzey moleküllerini eksprese edebilmektedirler. Kan, alveol ve serozal (örneğin periton) makrofajlar ise gezici makrofaj örnekleridir ki bu hücreler kemik iliği kaynaklıdır (Murray ve ark., 2016).

2.1.1. Makrofaj Fonksiyonları:

1. Fagositoz:

Makrofajlar bakteri, antijen gibi yabancı maddeleri, hasarlı, ölü hücre ve artıklarını fagosite etmekle görevlidirler. Bu özellik sayesinde, makrofajlar patojenleri sadece öldürmekle kalmaz inflamasyonun rezolüsyonunda da önemli bir aşama olan doku artıklarının ve ölü hücrelerin temizlenmesinde de rol almaktadırlar. Makrofajlar ayrıca kollajenden zengin ekstraselüler matriks sentezi (fibrozis) ve yeni kan damarı gelişiminin stimülasyonu (angiogenezis) hasarlı dokuların onarımını arttırmaktadırlar (Gartner ve Hiatt, 2001).

Makrofaj, plazma membranındaki Fc reseptörleri ile tanıdığı mikroorganizmayı çevrelemekte ve mikroorganizma, invajinasyon sonunda oluşan ve fagozom olarak adlandırılan membran kesesinin içinde kalmaktadır. Fagozomlar, lizozomlar ile birleşerek fagolizozomları oluşturmaktadırlar. Mikroorganizmaları tanıyarak onların hücrelere bağlanmasına ve hücre içine hapsedilmelerine neden olan reseptörler, fagolizozomlar içindeki bazı enzimlerin uyarılmasına yol açan sinyaller göndermektedirler. Fagosit oksidazı olarak tanımlanan bu enzimlerden biri, moleküler oksijeni süperoksit anyonu ve serbest radikallere dönüştürmektedir. Ayrıca arjininden sentezlenen NO ve bir diğer enzim grubu olan lizozomal proteazlar, mikrobiyal proteinlerin parçalanmasına yol açmaktadırlar. Tüm bu mikrobisidal maddeler, lizozomların ve fagolizozomların içerisinde sentezlenmekte ve fagositik hücrelere zarar vermeksizin, keselerin içine alınmış mikroorganizmaları sindirmektedirler. Ortaya çıkan komponentler ve artık maddeler ekzositoz yolu ile hücreden atılmakta veya sitoplazma içerisinde artık olarak birikmektedir (Parslow ve ark., 2001).

2. Antijen Sunma

Makrofajlar antijenlerle ilk birleşen ve antijen sunumu yapan hücrelerdir. Bu fonksiyonları sayesinde, antijenlerin lenfositler tarafından tanınmalarını ve lenfosit cevabı oluşmasını sağlamaktadırlar.

T lenfositler doğal görünümde olan antijenleri tanıyamamaktadırlar. Ancak antijenler parçalandıktan sonra uygun bir şekilde sunulduğunda tanıyabilmektedirler. Makrofajlar ve diğer APC'ler (Antijen sunucu hücre) proteinleri sindirerek küçük peptitlere ayırmakta ve MHC molekülleriyle birleştirdikten sonra T lenfositlere sunmaktadırlar. Hücre içinde, endojen olarak işlenmiş proteinler veya virüsle enfekte hücrelerdeki viral proteinler, MHC sınıf I moleküllerine, hücre dışındaki proteinlerden köken alan peptitler ise MHC sınıf II moleküllerine bağlanmaktadır. MHC sınıf I proteinler, antijenleri CD8⁺ T (sitotoksik T lenfosit) lenfositlere, MHC sınıf II proteinler antijenleri CD4⁺ T (T helper lenfosit) lenfositlere sunmaktadırlar (Tünger ve ark., 2004; Parham, 2009).

3. Salgılama

Makrofajların lizozomlarında üretilen en önemli mikrobisidal maddeler, ROİ (Reaktif oksijen ara ürünleri), NO ve proteolitik enzimlerdir.

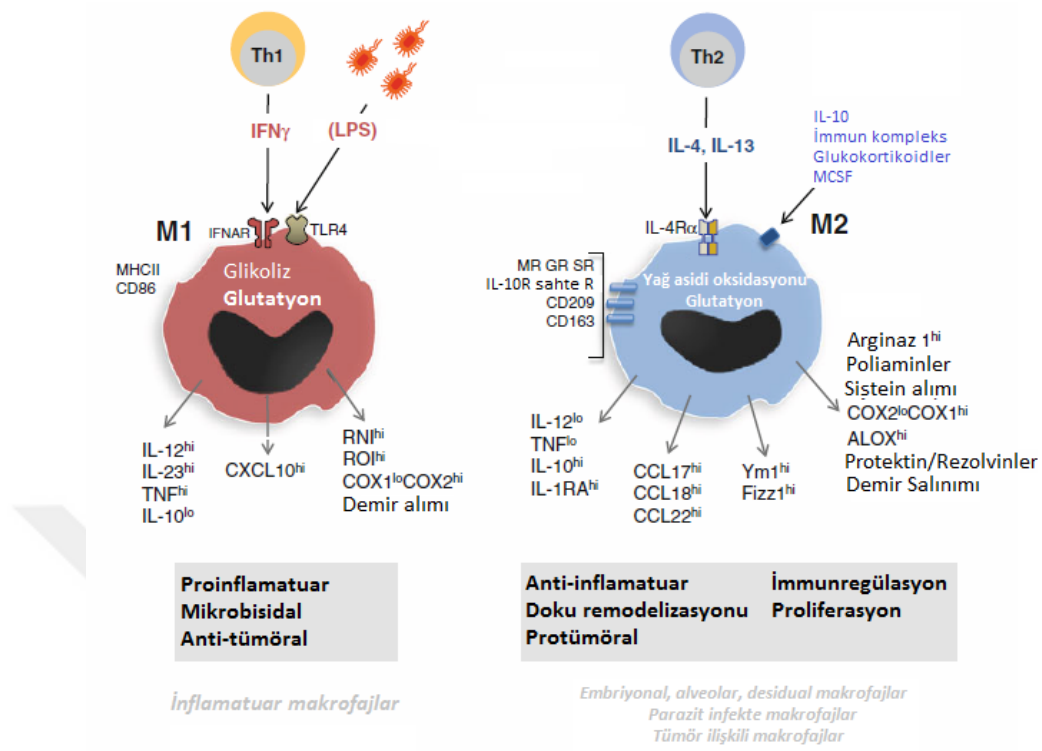
Makrofajlar nötrofillerin, monositlerin ve efektör T lenfositlerin enfeksiyon bölgesine göçünü uyaran kemokinler ve TNF- α , IL-1 (İnterlökin 1), IL-6 (İnterlökin 6), IL-8 (İnterlökin 8), IL-12, IL-23 (İnterlökin 23), IFN α (İnterferon alfa), IFN β (İnterferon beta) gibi sitokinler salgılamaktadırlar.

Makrofajlar ayrıca, enfeksiyon temizlendikten sonra, oluşan doku hasarını tamir etmesi için fibroblastların büyümesi ve aktivitesini uyaran FGF (Fibroblast büyüme faktörü) ve PDGF (Platelet kaynaklı büyüme faktörü) gibi farklı sitokinler de üretmektedirler (Kütükçüler, 2007).

2.2. Makrofaj Polarizasyonu

Doğal bağışıklığın önemli bir bileşeni olan makrofajlar, belirli bir fonksiyon aralığında bir takım farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Biswas ve Mantovani, 2010). Farklı patofizyolojik koşullarda ya da çeşitli çevresel etkilere (örn. mikrobiyal ürünler, hasar görmüş hücreler, aktive lenfositler) yanıt olarak, makrofajlar polarizasyon aracılığıyla farklı fonksiyonel fenotipler edinebilmektedirler (O'Shea ve Paul, 2010).

Makrofajların M1 ve M2 tipi yanıtları öldürme veya tamir gibi karşıt faaliyetleri ifade etmekte ve söz konusu polarize edici uyaranlar, sırasıyla, makrofajlarda TH1 (T helper 1) ve TH2 (T helper 2) yanıtlarını uyarmaktadır. TH1 yanıtlarını uyaran makrofajlar mikrobiyal ürünler veya proinflamatuvar sitokinler (IFN- γ , TNF veya TLR ligandları) tarafından stimule edilmekte (Verreck ve ark., 2004) ve bu tarz makrofajlar M1 veya klasik aktive makrofajlar olarak sınıflandırılmaktadır (Mantovani ve ark., 2002). M1 makrofajların tipik karakteristik özellikleri içerisinde yüksek antijen sunumu, yüksek seviyelerde IL-12 ve IL-23 üretimi ve yüksek seviyelerde NO ve ROİ üretimi bulunmaktadır (Verreck ve ark., 2004). TH2 yanıtı uyaran makrofajlar ise doku remodelizasyonunda ve anjiogenezde önemli rol oynayan antiinflamatuvar moleküller üretmektedir. Bu tarz makrofajlar ise M2 veya alternatif aktive makrofajlar olarak sınıflandırılmaktadır (Mantovani ve ark., 2002).



Şekil 2. M1 ve M2 Polarize makrofajların şematik sunumu.

Polarize edici sinyaller ve makrofajların moleküler, metabolik ve de fonksiyonel karakteristikleri özetlenmiştir. Her bir polarize makrofaj tipinin muhtemel in vivo kaynakları italik yazı ile belirtilmiştir. SR (Scavenging receptor), MR (Mannose receptor), GR (Galactose receptor)'den uyarlanmıştır (Biswas ve ark., 2012).

Aslında yapılan son çalışmalar, makrofaj aktivasyonunun plastisite gösterdiğini, hızlı ve geri dönüşümlü olduğunu göstermiştir. İnflamasyonun başlangıç aşamasında M1 makrofajlar antimikrobiyal aktivite ile enfeksiyon bölgesinde baskın iken, inflamasyon sona erdiğinde ise M2 makrofajlar enfeksiyon bölgesinde baskın hale gelmektedir (Biswas ve ark., 2012). M2-tip cevap "dinlenme" fenotipidir ve enfeksiyon olmaksızın iyileşme durumlarında görülmektedir. Bu gibi yanıtlar IL-4, IL-10 veya IL-13 tarafından uyarılmaktadır. M2 makrofajları, artmış fagositik aktivite, mannoz reseptör, çöpçü reseptör A ve B, CD163 (Cluster of differentiation 163) ve Dektin-1, DC-SING (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) up-regülasyonu ile karakterizedir (Martinez ve ark., 2009). M2 makrofajlar NO ve ROI üretimi yerine Arg 1 (arjinaz 1) yolağı vasıtasıyla ornitin ve poliaminlerin

üretimini gerçekleştirmektedir (Gordon ve Martinez, 2010). Fonksiyonel açıdan bakıldığında NO ve ornitin sentezinin makrofajların M1 ve M2 fonksiyonlarıyla bağlantılı olması nedeniyle bazı araştırmacılar açısından NO ve ornitin makrofajların en karakteristik molekülleridir (Mills, 2012).

M1 ve M2 makrofajlar esas olarak reseptör, sitokin ve kemokin ekspresyonları ve efektör işlevleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. İnflamatuar M1 makrofajlar TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, Tip I IFN- γ , gibi bir çok proinflamatuar sitokinleri ve TH1'leri dokuya çeken CXCL1-3 [Kemokin (C-X-C Motif) ligand 1-3], CXCL5 [Kemokin (C-X-C Motif) ligand 5] ve CXCL8-10 [Kemokin (C-X-C Motif) ligand 8-10] gibi kemokinleri üretirken (Sica ve Mantovani, 2012), M2 makrofajlar IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinleri ve düşük seviyede IL-12 gibi pro-inflamatuar sitokinleri ve CCL17 [Kemokin (C-C Motif) ligand 17], CCL22 [Kemokin (C-C Motif) ligand 22] ve CCL24 [Kemokin (C-C Motif) ligand 24] gibi kemokinleri üretmektedirler (Mosser, 2003; Biswas ve ark., 2012). Ayrıca M2 fenotipinde Chitinase 3-like 3 (kitinaz ailesinin üyesi) ve RETNLA (Resistin-like molecule alpha) da identifiye edilmiştir (Raes ve ark., 2005). M1 makrofajlar TH1 cevabını indüklemekte ve güçlü antimikrobiyal ve tümörosidal etki göstermektedirler. M2 makrofajlar ise metazoan paraziter infestasyonlara katılmaktadırlar. Ayrıca M2'ler TH2 cevabını, doku iyileşmesini, immun toleransı ve tümör progresyonunu desteklemektedirler (Gordon ve Taylor, 2005; Mantovani ve ark., 2011).

M1 ve M2 makrofajlar glukoz, lipid ve demir metabolizması ile ilgili de farklı metabolik özellikler göstermektedirler. Glikoz metabolizması açısından M1 makrofajların glikolitik yolağa doğru yöneldiği gösterilmişken, M2 makrofajları oksidatif fosforilasyonu kullanmaktadır. Lipid metabolizması açısından ise murin M2 makrofajların yağ asidi oksidasyonunu ile ilişkili genleri upregüle ettiği gösterilmişken, M1 makrofajların bu genleri down regule ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde insan makrofajlarında demir metabolizmasında da farklılıklar gözlemlenmiştir. M1 makrofajlar demir retansiyonunu artırırken, M2 makrofajların demir atılımını artırdığı görülmüştür (Biswas ve ark., 2012).

Çeşitli inflammatuar modülatörlerin, sinyal moleküllerinin ve transkripsiyon faktörlerinin koordineli etkisi makrofaj polarizasyonunun düzenlenmesi için gereklidir.

Hücresel düzeyde M1 ve M2 makrofajların aktivitesi T veya B lenfositlerin etkisi olmaksızın ortaya çıkmasına rağmen (Mills ve ark., 2000) özelleşmiş veya polarize olmuş T lenfositleri [TH1, TH2 ve Treg (Regülatör T hücreleri)] makrofaj polarizasyonunda rol oynamaktadır (Biswas ve Mantovani, 2010). M1 ve M2 makrofajlar etkileşim halinde buldukları T lenfositler açısından da farklılık göstermektedir. TH1 lenfositleri IFN- γ salgılayarak M1 polarizasyonunu, M1 makrofajları aktive olduktan sonra IL-12, CXCL9 ve CXCL10 gibi bazı sitokin ve kemokinleri salgılayarak TH1 hücrelerinin aktivasyonu ve bölgeye toplanmasını sağlamaktadır. M2 makrofaj polarizasyonu ise TH2 hücrelerinin salgıladığı IL-4 ve IL-13 aracılığı ile oluşmaktadır. Aktive olan M2 makrofajlar da salgıladıkları CCL17, CCL22 ve CCL24 aracılığı ile TH2 hücrelerinin bölgeye toplanmasını sağlayarak yanıtı arttırmaktadırlar (Allavena ve ark., 2008; Biswas ve Mantovani, 2010).

IRF/STAT (Signal transduction and activators of transcription) sinyalizasyonu, makrofaj polarizasyonunun düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Bu yolun STAT1 (Signal transduction and activators of transcription 1) üzerinden IFN'lar ve TLR tarafından aktivasyonu M1 makrofaj polarizasyonu yönünde etki ederken, STAT6 (Signal transduction and activators of transcription 6) üzerinden IL-4 ve IL-13 tarafından aktivasyonu M2 makrofaj polarizasyonu yönünde etki etmektedir (Mosser, 2003). IL-10, glukokortikoid hormonlar, apoptotik hücre kaynaklı moleküller ve immun kompleksler tarafından oluşturulan sinyaller, makrofajların fonksiyonel durumunu önemli ölçüde etkilemektedir (Biswas ve Mantovani, 2010). Makrofaj polarizasyonu aynı zamanda hipoksi gibi mikro çevresel faktörlerden de etkilenmektedir (Escribese ve ark., 2012). Makrofaj polarizasyonu dinamik bir süreçtir dolayısıyla fizyolojik ve patolojik koşullar altında fenotipler birbirlerine dönüşebilmektedirler (Saccani ve ark., 2006).

2.2.1. Makrofaj Plastisitesi

Araştırmacıların makrofaj polaritesini çalışırken karşılaştıkları önemli engellerden biri makrofaj plastisitesidir. Makrofajlar, mikro çevredeki uyarımların tipine, konsantrasyonuna ve süresine bağlı olarak fenotiplerini değiştirebildiğinden tek bir fenotipte tutulmaları zordur. M2 makrofajları, IFN- γ etkisi altında M1 genlerini

eksprese edebilmektedir, yine aynı şekilde M1 makrofajlar da IL-10 etkisinde M2 genlerini eksprese edebilmektedir. Makrofaj genlerinin plastisitesi, sitokinler, kemokinler, mikroorganizmalar, hücre yığınları, ölü hücreler ve farklı T lenfosit tipleriyle etkileşim gibi sinyallere cevap olarak ekspresyon karakterinin değişmesiyle açıklanmaktadır. Bu olgu sitokin etkisinden sonra kromatin modifikasyonunun stabil kalıp fenotipin korunmasına yol açması nedeniyle lenfositler gibi diğer hücreler için geçerli değildir. Bu sebeple mikro çevresel uyarılara cevap olarak makrofajlar ve monositler fonksiyonlarını değiştirebilmekte ve belirgin bir heterojenite sergilemektedirler. Polarizasyon dengesi uygun immun fonksiyon için önemlidir (Mosser ve Edwards, 2008).

Kontrol edilemeyen M1 ve M2 makrofaj ekspresyonu olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Sepsis sırasında makrofaj ve monositler hiperinflamatuvar M1 fenotiplerine aktive edilmekte ve bunlar da dokuya zarar veren sitokinlerin aşırı salınımına neden olmaktadır. Bunun sonucunda Sepsis, organ kaybına ve kan damarlarında hemorajiye neden olabilmektedir. M2 makrofajların over-ekspresyonu ise özellikle kanser gibi hastalıkların ilerlemesinde rol oynamaktadır (Biswas ve ark., 2012).

2.2.2. Tümör ve Makrofaj Polarizasyonu

Makrofajlar inflamasyon ile kanser arasında kilit rol oynamaktadırlar (Montovani ve ark., 2008). Bu olgu ile ilgili çok sayıda kanıt tümör ilişkili makrofajların tümör ilerlemesini artırıcı etkisini desteklemektedir (Lewis ve Pollard, 2006). Bu kanıtlardan ilki solid tümörlerin ciddi makrofaj infiltrasyonu ile ilişkili olmasıdır. İkincisi, çeşitli murin tümör modellerinde makrofaj infiltrasyonu ve tümör gelişimi arasında fonksiyonel bir ilişki gösterilmiş olmasıdır. Üçüncüsü ise, göğüs, serviks, mesane ve prostat kanserinde olduğu gibi bir çok insan kanserinde, yüksek TAM yoğunluğuyla kötü prognoz arasında pozitif korelasyon tesbit edilmesidir (Lewis ve Pollard, 2006).

TAM'ın tümör stimulan rolünü doğrudan destekleyen kanıtlar, murin tümör modellerinde TAM sayılarını modüle etmek amacıyla transgenik yaklaşımlar kullanılarak elde edilen çalışmalardan gelmektedir. Örneğin, fare fibrosarkom hücreleri tarafından CCL2 [Kemokin (C-C Motif) ligand 2]/MCP-1 (Monosit kemoatraktant

protein-1) aşırı ekspresyonu tümör büyümesini artıran TAM infiltrasyonunda artışla sonuçlanmıştır (Bottazzi ve ark., 1992).

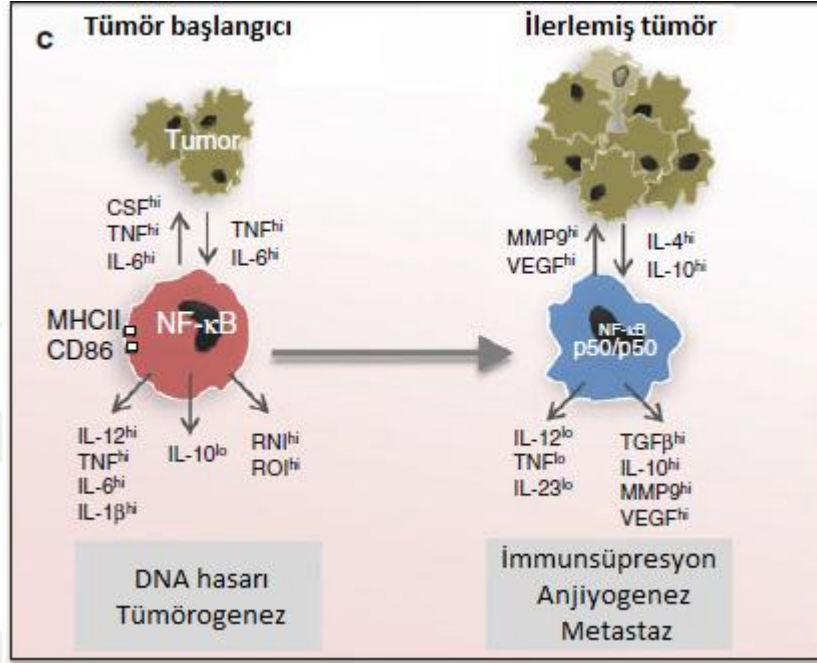
Spontan PyMT (Polyoma Middle T oncoprotein) ile ilişkili meme karsinomunda, M-CSF genetik delesyonu yapılarak TAM migrasyonu azaltılmış ve böylece TAM'ın tümörün anjiogenik değişimi, tümörün progresyonu ve metastatik yayılımına aracılık edici rolü gösterilmiştir (Lin ve ark., 2001; 2006). Aslında, makrofajlar tümör gelişiminde her yönüyle, yani büyüme, yaşama ve tümör hücrelerinin metastazı, damarlanması ve immünosupresyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Montovani ve ark., 2008). Gen ekspresyon çalışmalarında bazı kanser modellerinde TAM'ın IL-10 ^{yüksek}/IL-12 ^{düşük} fenotip eksprese ettiği ve tümör destekleyici VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü), EGF (Epidermal büyüme Faktörü), COX-2 (Sikloksijenaz 2), MMP (Matriks metalloproteinaz) gibi faktörleri upregule ettiği gösterilmiştir (Hagemann ve ark., 2008; Stout ve Watkins, 2009). Ayrıca birkaç vakada arjinaz, RETNLA, Chitinase 3-like 3'ün M2 benzeri fenotip eksprese ettiği ve TAM'ın M2-polarize popülasyonu temsil ettiği ileri sürülmüştür (Mantovani ve ark., 2002).

Bununla birlikte, farklı deneysel tümör modelleri ile yapılan çalışmalar, makrofajların proinflamatuvar, immünsüpresif veya bu karakteristiklerin kombinasyonu gibi bir takım fenotiplere sahip olduğunu göstermiştir (Biswas ve ark., 2008). Ayrıca tümörün farklı bölgelerinde farklı polarize makrofajların varlığı bildirilmiştir.

Bir meme adenokarsinom modelinde, normoksik tümör dokularında bulunan, yüksek MHCII profiline sahip TAM'ların anti-anjiogenik fonksiyonlara sahip olduğu ve M1 markırlarının ekspresyonunu yaptığı bulunmuştur. Bunun tersi olarak hipoksik tümör dokularında ise düşük MHCII profiline sahip TAM'ların belirgin proanjiogenik fonksiyonlar göstererek M2 markırlarının ekspresyonunu yaptıkları bulunmuştur (Movahedi ve ark., 2010). Bu bulgular kanserin ilerlemesi sırasında makrofajların plastisite göstermesi kavramını desteklemektedir (Biswas ve Mantovani, 2010).

Çeşitli inflamasyon kaynaklı kanserlerin transgenik modellerindeki çalışmalarda, inflamatuvar M1 makrofajların tümörögenез ve kansere bağlı inflamasyonda rol alır iken (Karin ve Greten, 2005) tümörlerde M2 benzeri TAM'ların varlığının tümör kaynaklı immünsupresyonu artırdığı gösterilmiştir (Biswas ve ark., 2006). Böylece, oluşan

tümörlerde makrofajların fenotiplerinin tümörün başlangıcı sırasında inflamatuvar fenotipten immünsüpresif (M2-benzeri) fenotipe değiştiğine inanılmaktadır (Biswas ve ark., 2008).



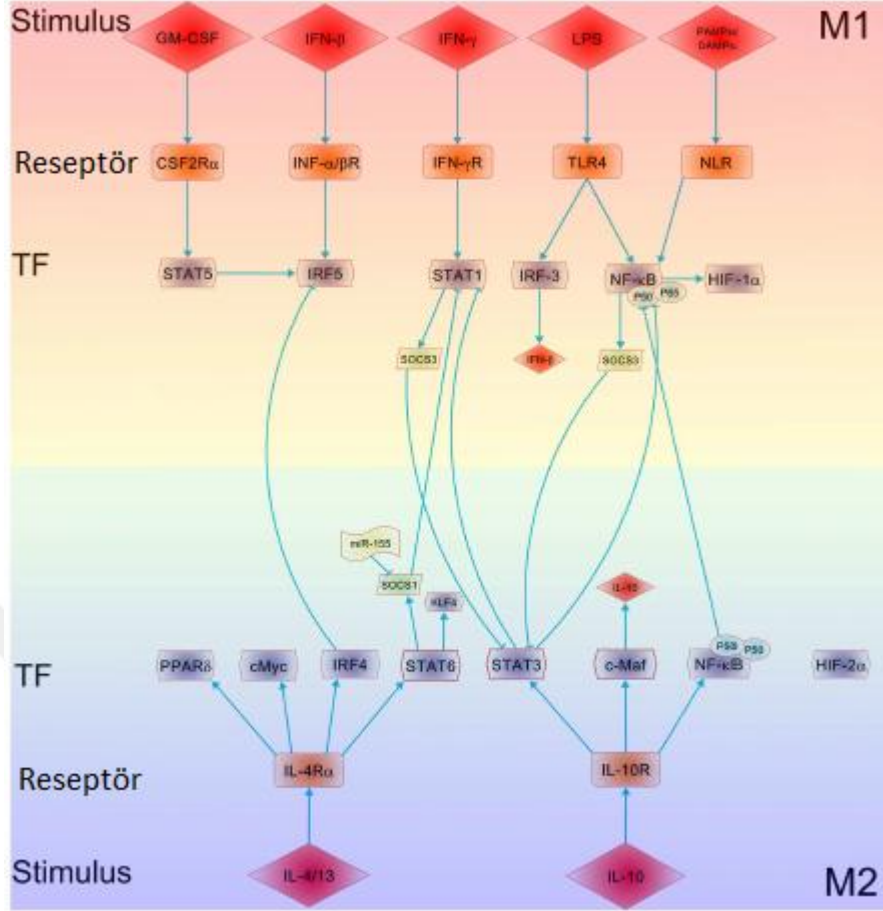
Şekil 3. Kanserdeki makrofaj plastisitesinin şematik sunumu (Biswas ve ark., 2012)

Tümör progresyonunun farklı aşamalarında TAM'ın plastisitesini düzenleyen moleküler mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. TAM, hematopoietik hücrelerin tümörün progresyonu artırıcı etkisine klasik bir örnek teşkil ederken, LY6C+ (Lenfosit antijen 6 kompleksi) monositler (TAM'ın olası kökeni) gibi birçok diğer miyelomonositik hücre tipleri, TEM (Tie-2 ifade eden monositler/makrofajlar) ve MDSCs (Myeloid kökenli baskılayıcı hücreler) de, aynı zamanda, tümör ilerlemesinde rol oynamaktadır (Movahedi ve ark., 2010).

2.2.3. IRF/STAT sinyali

IRF/STAT sinyali, makrofaj M1-M2 polarizasyonunun kontrol edilmesinde merkezi yolaktır. TLR sinyali (özellikle LPS ve diğer mikrobiyal liganlar tarafından stimule edilen TLR4 gibi) makrofajları, M1 fenotipine yönlendirmektedir. MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88) ve TRIF [Toll/IL-1R (TIR)

domain-containing adapter inducing interferon β] adaptörleri TLR4 downstream sinyaline aracılık yapmaktadırlar. MyD88, NF- κ B aktivasyonuna yol açan IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase 4), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) ve IKK β 'nin dahil olduğu kinaz kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. M1 polarizasyonunun anahtar transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, bir çok inflamatuvar genin [TNF- α , IL1 β (interlökin-1 beta), COX2, IL-6, ve IL12 (interlökin-12)] ekspresyonunu düzenlemektedir. NF- κ B aktivitesi ise, IKK trimerik kompleksin [IKK α (inhibitor of kappa B kinase alpha), IKK β (inhibitor of kappa B kinase beta) iki kinaz ve regülatör protein IKK γ (inhibitor of kappa B kinase gamma)] aktivasyonu tarafından düzenlenmektedir. Upstream sinyalleri IKK komplekste toplandığı zaman ilk olarak fosforilasyonla IKK β aktive olmaktadır. Aktif IKK β ise I- κ B (inhibitor of kappa B)'yi fosforillemektedir. Bu olay I- κ B'nin proteozomal yıkılmasıyla ve NF- κ B/I- κ B kompleksinden NF- κ B p65/p50 heterodimerlerinin salınmasıyla sonuçlanmaktadır. Sonrasında NF- κ B p65/p50 heterodimeri nükleusa gelmekte ve burada inflamatuvar genlerin promotörlerine bağlanmaktadır. TRIF adaptörü yolağı ile gelen sinyal ise IRF3 (IFN regülatör faktör 3) transkripsiyon faktörünü aktive etmekte ve IFN- α ve IFN- β gibi tip 1 interferonların ekspresyonuna ve sekresyonuna yol açmaktadır. Salınan tip 1 interferonlar kendilerine spesifik tip 1 interferon reseptörlerine (IFNAR) bağlanmakta bunun sonucunda transkripsiyon faktör STAT1 aktivasyonu gerçekleşmektedir. Tip 2 interferon (IFN- γ) ayrıca IFN- γ R (IFN- γ reseptör) aracılığıyla STAT1 aktivasyonu gerçekleşmektedir (Lawrence ve ark., 2001; Auffray ve ark., 2007). IRF3 ve STAT1 aktivasyonu, CCL2, CCL5 [Kemokin (C-C Motif) Ligand 5] ve CXCL10 gibi IFN- γ ile indüklenebilen kemokinlerin ekspresyonunu up-regüle etmektedir ve bu kemokinler diğer proinflamatuvar mediatörleri ilgili bölgeye çekmektedirler (Biswas ve ark., 2012).



Şekil 4. M1 ve M2 makrofaj polarizasyonunun başlıca regülatör yolları.

M1 ve M2 makrofajlar arasındaki etkileşim özellikle STAT1 ve STAT3/STAT6'nın aktivasyonu arasındaki dengeye bağlıdır. NF-κB ve STAT1'in aktivasyonu M1 polarizasyona yol açar ve sitotoksik, proinflatuar fonksiyonlar ortaya çıkarmaktadır. Bunun zıddı olarak IL-4/IL-13 ve IL-10 tarafından STAT3 ve STAT6'nın aktivasyonu immüntolerans ve doku tamiriyle ilişkili olan M2 makrofaj polarizasyonuna yol açmaktadır. PPARγ M2 makrofajların bazı özelliklerini ve oksidatif metabolizmayı kontrol etmektedir. KLF4 NF-κB/HIF-1α bağımlı transkripsiyonu baskılayarak M2 polarizasyon oluşumunda yer almaktadır. IL-4 c-myc (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog)'i indüklemenin yanında, IRF5 aracılı M1 polarizasyonu inhibe etmek için IRF4'ü de indüklemektedir. IL-10 ise p50 (NF-κB'nin homodimeri), c-maf (V-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene) ve STAT3 indüksiyonu üzerinden M2 polarizasyona yol açmaktadır (NanWang ve ark., 2014).

Polarizasyonun karakteri makrofajlar üzerindeki çeşitli TLR tiplerinin birbirlerine göre oranlarıyla sıkı bir şekilde ilişkilidir. TLR4/TLR2 oranı M2 makrofajlar göre M1 makrofajlarda anlamlı derecede yüksek (Saue ve ark., 2014) iken

TLR4 yoksunluğunda ise adipöz doku makrofajlarının alternatif (M2) aktivasyonu şekillenmektedir (Orr ve ark., 2012).

TLR ve TLR'nin indüklediği sitokin-reseptör kaskadları genel olarak tirozin kinazlar tarafından inhibe edilmektedir (Tyro3, Axl ve Mer). IFN β , Axl, Tyro3 ve Mer reseptörlerini aktive edebilmekte ayrıca SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling 1) ve SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) indüksiyonu yoluyla TLR sinyalini negatif olarak düzenlemektedir. Tyro3, Axl, ve Mer reseptörünün aracılık ettiği hiperaktif bir sinyalin, şiddetli septisemideki hastalarda immunsupresyona yol açtığı savunulmaktadır (Rothlin ve ark., 2007). Aynı mekanizmayla TLR4 yolağı üzerinden gelen kronik sinyallerin, IRAK3 (IL-1 receptor-associated kinase 3), SOCS1, MyD88'in kısa versiyonu (MyD88sh, short version of MyD88), SHIP (SH2-containing inositol 5-phosphatase) gibi çeşitli negatif regülatörleri indükledikleri gösterilmiştir (Lumeng ve ark., 2007). Bu negatif regülatörler TLR aracılı sinyali inhibe etmektedirler. Bu sayede makrofajların fenotipini immunsupresif, endotoksin toleranslı bir forma dönüştürülmektedir. TLR4 yolağını MyD88 bağımlı formdan TRIF bağımlı forma dönüştürmenin makrofaj fenotipine antiinflamatuvar karakteri kazandırdığı bildirilmiştir (Biswas ve Lopez-Collazo, 2009). Bu sebeple sinyal moleküllerinin ve transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi makrofaj polarizasyon fenotipini tersine dönüştürebilmektedir.

Makrofajların STAT-aracılı aktivasyonu, sitokin sinyal ailesinin baskılayıcı (SOCS) üyeleri tarafından düzenlenmektedir. SOCS aile üyeleri sitokin sinyallerinin indüklenebilir inhibitörleridir ve bu sebeple inflamatuvar yanıtların sınırlanmasında kritik bir rol oynamaktadır. SOCS proteinleri sitokin sinyal yolağı tarafından indüklenebilmekte ve daha sonra da çeşitli mekanizmalarla sitokin sinyallerini engellemektedirler. Buna örnek olarak, IL-4 ve IFN- γ , TLR uyarımı ile SOCS1'i ve SOCS3'ü up-regüle etmektedirler (Whyte ve ark., 2011) ve sonrasında SOCS1 ve SOCS3 tarafından ise STAT1 ve STAT3 aktivasyonu inhibe edilmektedir. SOCS proteinleri aynı zamanda TLR sinyali ile doğrudan indüklenmektedirler. Makrofajlarda, SOCS proteinleri sadece sitokinlere karşı hücrelerin duyarlılığını düzenlemez aynı zamanda TLR'ler üzerinden sinyalleri de düzenlemektedirler. SOCS3, Notch sinyalinin downstream molekülü olması sebebiyle (Narayana ve Balaji, 2008), Notch sinyalinin, SOCS3 yoluyla makrofajların M1'e karşı M2 polarizasyonunu belirlemesi olasıdır (Wang ve ark., 2010). Fakat SOCS3'ün makrofajların M1-M2 polarizasyonun

düzenlenmesindeki rolü tartışmalıdır. SOCS3'ün spesifik ekspresyonu klasik makrofaj aktivasyonu için gerekli olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen (Liu ve ark., 2008), SOCS3 eksikliği de organizmayı M1 makrofaj polarizasyona ve inflamasyona yönlendirmektedir (Qin ve ark., 2012).

Makrofajlar, IL-4, IL-13 ve IL-10 gibi standart M2 uyaranlar tarafından M2 fenotipe yönlendirilebilmektedir (Mosser, 2013). IL-4 ve IL-13, IL-4R α (IL-4 reseptör alfa) ile STAT6'yı aktive ederek makrofajları M2 fenotipe polarize etmekteyken, IL-10 ise kendi reseptörü (IL-10R) üzerinden STAT3'ü aktive ederek M2 fenotipi uyarılmaktadır. IL-4 ve IL-13 yolağında, IL-4'ün reseptörle bağlanması, STAT6 aktivasyonuna ve translokasyonuna yol açan JAK1 (Janus Kinaz 1) ve JAK3 (Janus Kinaz 3) ü aktif hale getirmektedir (Nelms ve ark., 2009).

Makrofaj M2 fenotipi, PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptors γ) ve KLF4 (Kruppel-like faktör 4)'ü içeren birçok transkripsiyon faktörü tarafından teşvik edilmektedir (Chawla, 2010). PPAR- γ veya KLF4'ün myeloid-spesifik eksikliği, apolipoprotein-E eksikliği olan veya LDL reseptör genleri çıkarılmış farelerde lezyon oluşumunu hızlanmasına yol açarak makrofajların baskılanmış M2 polarizasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca PPAR- γ ligasyonu, insanlarda ve farelerde M2 polarizasyonu ile sonuçlanmaktadır (Sharma ve ark., 2012). Ayrıca c-Myc ve IRF4 transkripsiyon faktörleri bu sürece katılmaktadır. IL-4 ile uyarılmış hücrelerin transkriptom analizi TGM2 (Transglutaminaz 2), mannoz reseptörü, transkripsiyon faktörü IRF4, KLF-4 ve SOCS1 kapsayan çeşitli enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini içermektedir (Martinez ve ark., 2013).

Şiddetli RSV (Respiratuar sinsitiyal virüs) kaynaklı bronşiyolit sırasında, makrofajların IL-4R α /STAT6 bağımlı M2 farklılaşması, akciğerlerdeki inflamasyonu ve epitel hasarını azaltmaktadır (Shirey ve ark., 2010). PPAR γ , IL-4 veya IL-13 ile indüklenen makrofaj M2 polarizasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Luzina ve ark., 2012). PPAR γ eksikliği bulunan makrofajlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu nükleer reseptörün farelerin insülin direnciden korumak için M2 aktivasyonunun uyarılmasındaki rolü gösterilmiştir (Odegaard ve ark., 2007). PPAR γ için benzer mekanizmaya makrofaj polarizasyonunun belirlenmesinde de rastlanmıştır (Mukundan ve

ark., 2009). Tüm bu bulgular STAT6, PPAR γ , KLF-4 ve IRF4 'ün makrofajların M2 polarizasyonunu düzenleyebileceğini düşündürmektedir (Eguchi ve ark., 2011).

IL-10R1 (IL-10 reseptör 1) ve IL-10R2 (IL-10 reseptör 2)' in bir heterodimeri olan IL-10R, IL-10'nun reseptörüdür. IL-10'la ligand sonucu IL-10R (L-10 reseptör) otofosforilasyona uğramakta ve transkripsiyon faktörü STAT3'ün aktif hale gelmesine ve proinflamatuvar sitokin ekspresyonunun ise azalmasına yol açmaktadır. Makrofajlarda IL-10'un aynı zamanda TLR aktivasyona, glukokortikoid tedavisine ve C tipi lektin sinyaline (Örneğin, DC-SIGN ve dectin 1 ligasyonu) yanıt verdiği bildirilmektedir. IL-10 kaynaklı makrofaj transkriptom bileşenleri spesifik Fc reseptörlerini, kemoatraktantlar olan CXCL13 ve CXCL4'ü, tanıma reseptörleri FPR1 (Formil peptid reseptör 1), TLR1, TLR8'i ve kollejenöz alanları bulunan makrofaj reseptörlerini içermektedir (Park-Min ve ark., 2005).

2.2.4. GM-CSF

Makrofaj polarizasyon düzenlenmesinde rol oynayan en son keşfedilen sitokin olan GM-CSF, makrofaj ve parankim hücrelerini de içeren çeşitli hücreler tarafından üretilmektedir. GM-CSF'in ana fonksiyonları, fonksiyonel hematopoetik hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasının düzenlenmesini içermektedir. GM-CSF reseptörü, bir dodekamer yapısı oluşturmakta (Hansen ve ark., 2008) ve STAT5'in, ERK (extracellular signal-regulated kinase), AKT (V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)'in aktivasyonuna ve NF-KB ve IRF5'in çekirdek translokasyonu neden olan (Krausgruber ve ark., 2011) JAK2'yi üretmektedir. Bu düzenleyicilerin birçoğu IFN γ ve TLR sinyal yollarının bir parçasıdır. GM-CSF, makrofaj antijen sunumunu, komplement ve antikor aracılı fagositozu, mikrobiyosidal kapasiteyi, lökosit kemotaksisini ve adezyonu arttırmaktadır.

GM-CSF tarafından yapılan sitokin indüksiyonunun derecesi LPS'ye göre daha az olmasına rağmen, GM-CSF monositlerde ve makrofajlarda IL-6, IL-8, G-CSF, M-CSF, TNF ve IL-1 β sitokinlerinin üretimini indüklemektedir. GM-CSF ile muamele monositlerden farklılaşmış makrofajların global gen ekspresyon analizi, GM-CSF'in makrofajlarda 340 geni up regüle ve 190 geni down regüle ettiğini göstermiştir. CD14, CD163 ve CD64(Cluster of differentiation 64) içeren makrofaj spesifik genler, çeşitli

hücre yüzeyi yapışma molekülleri ve sitokin reseptörleri, GM-CSF tarafından indüklenmiştir (Lehtonen ve ark., 2007). GM-CSF eksikliği olan farelerin birçok dokusunda normal sayıda makrofajlar bulunmaktadır fakat alveoler makrofajların olgunlaşmasında aksamalar görülmektedir (Dranoff ve ark., 1993).

2.2.5. HIF-1 α / HIF-2 α (Hypoxia-inducible factors 1 α /2 α)

Makrofajlar, etrafındaki dokuların mikroçevresine uyum sağlamak için kendi metabolik ve fonksiyonel durumlarını hızla değiştirebilmektedir. İnfekte, inflamasyonlu veya zarar görmüş dokulardaki mikroçevre koşullarına genellikle oksijen ve besin eksikliği hakimdir. Makrofajlar inflamatuvar bölgelere geldiklerinde, polarizasyonlarını doğrudan etkileyen hipoksik bir ortamla karşılaşmaktadırlar. Hipoksi makrofajlar üzerindeki etkisini HIF'in iki izoformu olan HIF-1 α ve HIF2 üzerinden göstermektedir (Imtiyaz ve ark., 2010).

Makrofajların ve monositlerin gen ekspresyonu profil çalışmaları, hipoksiye yanıtta önemli değişiklikler tespit etmiştir (Fang ve ark., 2009). Hipoksi güçlü bir şekilde VEGF, FGF2 (Fibroblast büyüme faktörü 2), MMP7 (Matriks metalloproteinaz 7) ve MMP9 (Matriks metalloproteinaz 9) gibi angiogenesis ve metastaz ile ilişkili genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Hipoksi etkisi altında olan genlerin up regülasyonu ateroskleroz, obezite ve kanser gibi patolojilerde inflamasyonun azaldığı veya tümör gelişiminin arttığı bölgeler olan hipoksik (avasküler) alanlarda daha fazla makrofajın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Buna ek olarak, makrofajlarda TNF- α , IL-1 β , MIF (Makrofaj migrasyon inhibitör faktör) ve COX2 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin yanı sıra IL-10 ve Arg 1 gibi M2 markırlarda da hipoksi tarafından indüklenmektedir (Murdoch ve Lewis, 2005).

Makrofajların inflamatuvar cevabının düzenlenmesinde hipoksinin önemli bir rolü olduğu, inflamatuvar mikro çevrede myeloid hücrelerin glikolitik kapasitesini, yaşam gücünü ve fonksiyonunu düzenleyen HIF-1 α 'nın myeloid spesifik silindiği farelerde doğrulanmıştır (Cramer ve ark., 2003). Bu durum HIF-1 α nın NF- β tarafından uyarıldığına dair bulgular ile uyumlu olmakta (Rius ve ark., 2008) ve sepsiste bakterilere karşı makrofajların fagositik aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Nizet ve Johnson, 2009). Ayrıca, son çalışmalarda HIF-1 α 'nın M2

benzeri fenotipin uyarılmasında, tümör kaynaklı laktik asidin (Colegio ve ark., 2014) ve sitokinlerin (Onkostatin M ve Eotaksin) (Tripathi ve ark., 2014) etkilerine mediatörlük yapabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmaların aksine, yapılan miyeloid spesifik HIF-2 α silinmesinin güncel bir çalışması makrofajların inflamatuvar cevabının düzenlenmesinde HIF2'nin HIF-1 α 'dan daha önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (Imtiyaz ve ark., 2010). Bu çalışmaların aksine başka bir çalışma ise HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın sitokin kaynaklı ve transkripsiyona bağlı bir mekanizma tarafından NO homeostazının düzenlenmesi üzerinden makrofaj polarizasyonu kontrol ettiğini düşündürmektedir. Özellikle, bu çalışma polarize makrofajlarda iNOS ve Arg 1 genlerinin, spesifik olarak HIF'ler tarafından düzenlendiğini göstermiştir (Takeda ve ark., 2010).

HIF-1 α ve HIF-2 α fizyolojik olarak antagonist fonksiyonlar göstermesine rağmen, sahip oldukları antifaz düzenlemeleri, makrofaj polarizasyonun rehberliği için koordineli olarak NO üretimini düzenlemelerine olanak sağlar.

2.3. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin yanı sıra birçok farklı hücrel ve biyokimyasal yapının bir arada olduğu ve bunların sürekli olarak birbirleriyle etkileşim ve iletişim halinde olduğu organize, interaktif ve dinamik bir ortamdır (Balkwill ve ark., 2012).

Solid tümörler, değişken miktarlarda neoplastik ve stromal hücrelerin yanında kan/lenf damarları ve de özellikle makrofaj ve lenfositler olmak üzere immun kompetan hücreler ile fibroblastlardan oluşmaktadır. Çözünür biçimde ya da ECM (Ekstraselüler matriks) proteinleri ile bağlı biyolojik olarak aktif moleküllerden oluşan geniş bir grupta bu ortamda bulunmaktadır. Bu moleküllere örnek olarak; tümör hücreleri ve yeni oluşan kan damarları için büyüme faktörleri, tümör kitlesi içinde üretilen bağıışıklık hücreleri için kemoatraktantlar ve tümör çevresindeki matrisi aktif olarak remodelize eden çok fazla sayıda ki proteolitik enzimler verilebilmektedir. Makrofajlar genellikle tümör mikro ortamında en bol bulunan immun popülasyonu oluşturmaktadır (Balkwill ve Mantovani, 2001; Balkwill ve ark., 2005).

Günümüzde inflamasyon kanser progresyonunun iyi tanınan bir özelliğidir. TAM, insan ve fare tümörlerine infiltre olabilen majör inflamasyon hücrelerinden biridirler.

19. yy'da inflamasyon ve kanser arasındaki ilişki ilk defa keşfedilmiştir. İnflamasyon ve kanserin bağlantı olduğuna dair ilk görüşler, tümörlerin sıklıkla inflamasyon bölgelerinde ortaya çıkmasının ve alınan tümör biyopsilerinde inflamasyon hücrelerinin bulunmasının gözlemlenmesiyle ortaya çıkmıştır (Balkwill ve Mantovani, 2001; Mantovani ve ark., 2008). Bir yüzyıldan fazla bir süre sonra ise inflamasyon ve kanserin bağlantılı olduğu görüşü ortaya çıkmıştır ve konuyla ilgili ortada hala güncel bir ilgi artışı vardır. Epidemiyolojik çalışmalar, bireylerdeki kronik inflamasyonların kolon, prostat ve karaciğer tümörü gibi çeşitli tümörlere karşı predispozisyonu arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, yapılan çok sayıda gözlem çalışmaları özellikle aspirin gibi steroid yapıda olmayan anti inflamatuvarların kullanımının çeşitli kanser türlerine karşı duyarlılıkta ve tümör progresyonuna karşı bir etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadırlar (Rothwell ve ark., 2012).

Sadece kansere yatkınlık yaratan bazı inflamatuvar durumlara değil aynı zamanda epidemiyolojik açıdan inflamasyonla ilgisiz tümörler (örn: meme kanseri) bile inflamatuvar bir mikroçevreyle karakterizedir. Bu nedenle, eldeki birçok kanıt, inflamasyonun tümör mikro çevresinin önemli bir bileşeni olduğu konusunda genel olarak kabul gören bir paradigma oluşturmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanserle ilişkili inflamasyonun başlıca özellikleri, lökositlerin infiltrasyonunu, çözünebilir mediatörlerin (sitokinler ve kemokinler), doku remodelizasyonunun ve anjiogenezin varlığını içermektedir. Güncel olarak kansere bağlı inflamasyonun, tümör büyümesini ve ilerlemesini artırdığı genel bir kabul görmektedir (Balkwill ve Mantovani, 2001; Mantovani ve ark., 2008).

1970'lerin sonuna doğru, tümör gelişiminin, tümörlerle infiltre büyük bir lökosit popülasyonu olan TAM'lar tarafından desteklendiği tespit edilmiştir. Bu duruma göre, insan tümörlerinin tümünde olmamakla birlikte birçoğunda TAM'ın yüksek frekanslı infiltrasyonu kötü prognoz ile ilişkilidir (Zhang ve ark., 2012). Özellikle, Hodgkin hastalığında yüksek frekansta görülen TAM'ların kötü prognoz ile ilişkili

olduğu görülmekte ve uygulanan tedavi yaklaşımına yardımcı olabilmektedir (Steidl ve ark., 2010).

2.4. TAM'ın kökeni

TAM, kanda dolaşan monositik prekürsörlerin derivelerinden (Mantovani ve ark., 1992) ve splenik monositlerden köken almaktadır (Cortez-retamozo ve ark., 2012). Daha önceki çalışmalar, tümör kaynaklı bir kemoatraktan olan CCL2/MCP-1'in, TAM'ların toplanmasında kilit role sahip olduğunu göstermiştir (Matsushima ve ark., 1999). Tümör bölgesindeki makrofaj birikiminde CCL2'nin rolü, tümör kaynaklı CCL2 seviyelerinin over, meme ve pankreas kanserlerini de içeren adenokarsinomlardaki TAM'ın fazla miktarda bulunması ile ilişkili olması gibi kanıtlar tarafından desteklenmektedir (Negus ve ark., 1995; Monti ve ark., 2005).

İlginç bir şekilde, TAM'ın amplifikasyon döngüsünün varlığını kanıtlar nitelikte CCL2 sekresyonu yaptığı tespit edilmiştir. Bu ilk gözlemi takiben TAM'ı aktive eden diğer kemokinler (CCL5, CCL7 [Kemokin (C-C Motif) ligand 7], CCL8 [Kemokin (C-C Motif) ligand 8] ve CXCL12 [Kemokin (C-X-C Motif) ligand 12]), tümör ya da stroma hücrelerin ürünleri olarak neoplastik dokuda tespit edilmiştir (Balkwill ve ark., 2004; Mantovani ve ark., 2004). Ayrıca, dolaşımdaki monositlerinin tümör dokusu içine hareketi sadece kemokinler tarafından sağlanmamaktadır (Balkwill ve ark., 2004). VEGF, PDGF, TGF- β ve M-CSF de monositler/makrofajlar için kemotaktik özelliktedirler. Ayrıca bu faktörler makrofaj hayatta kalmasını ve farklılaşmasını indüklemektedirler (esas olarak M-CSF). Buna ek olarak, makrofajlar ve tümör hücreleri matriks proteazlar üreterek ECM'i yıkabilmekte; ECM proteinlerinin ayrılması ile diğer büyüme ve anjiogenik faktörlere ek olarak fibrinojen ve fibronektinin fragmanları gibi kemoatraktantları içeren biyoaktif degradasyon ürünleri serbest kalmaktadır (Coussens ve Werb, 2002).

2.4.1. M2 Polarize Makrofajlar Olarak TAM

Tümör mikro çevresinde eksprese edilen sinyaller olgunlaşmakta olan mononükleer fagositlerin diferansiyasyonunun düzenlenmesinde merkezi bir rol

oyunmaktadır, böylece tümör lokal bağışıklık sistemini ele geçirerek anti-tümör fonksiyonlardan korunmaktadır. Yapılan çalışmalarda olgun TAM'ların M2 makrofajlara benzer fenotipe ve işlevlere sahip oldukları incelenmiştir (Mantovani ve ark., 2002). Gerçekten de, pek çok açıdan TAM, inflamatuvar yanıtın ve adaptif bağışıklığın düzenlenmesi, doku yeniden yapımı ve onarımı, angiogenezin gelişimi gibi M2 makrofajların özelliği olan bir dizi fonksiyonu göstermektedir. Son çalışmalarda TAM'ın transkripsiyon profilinde de M2 polarizasyon özellikleri gösterilmiştir. CD163, C-tip lektin domainleri, ısı şok proteinleri, IgG (Immunglobulin G)'nin fc kısmı gibi birçok M2-ilişkili genin up regule olduğu fark edilmiştir (Biswas ve ark., 2006). Bu tercih edilen polarizasyon, hem INF- γ , bakteriyel bileşenler gibi M1 polarizasyona yönlendiren sinyallerin yokluğunun hem de M2 polarizasyon faktörlerinin sentezlenmesinin bir sonucudur (Deepak ve ark., 2007; Nevala ve ark., 2009).

Tümör mikroçevresinden eksprese edilen birçok faktör, monositin M2 makrofaja olgunlaşması için polarizasyona ve diferansiyasyona yönlendirme yeteneğindedir. Bunlar; büyüme ve farklılaşma faktörü M-CSF ve PGE2, TGF- β , IL-6 ve IL-10'u içermektedir. Birçok tümörde TH2 lenfositler buldukları çevrede sayıca baskındır ve IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin ana kaynağını oluşturmaktadırlar. Ayrıca, neoplastik hücreler, fibroblastlar ve Treg'ler TGF- β and IL-10 üretmektedirler. Birçok kanser hücrelerinden ve TAM'lardan immunsupresif sitokinler IL-10 ve TGF- β üretilmektedir (Mantovani ve ark., 2002; Balkwill, 2004).

IL-10, monositlerin olgun makrofajlara diferansiyasyonunu düzenlemekte ve onların DC (Dendritik hücre)'e farklılaşmasını engellemektedir (85). Bu nedenle tümör kaynaklı IL-10'un gradienti, bir tümörün farklı mikro anatomik lokalizasyonlarında makrofaj yolağı boyunca farklılaşmasından sorumludur. Söz konusu durum, meme kanseri ve tiroid papiller karsinomunda gözlenmiştir. Sadece periferde mevcut olan DC'nin aksine TAM doku boyunca eşit dağılmaktadır (Scarpino ve ark., 2000). IL-10 makrofaj aktivasyonunun M2C alternatif yolağını aktive etmekte ve M2 ilişkin işlevleri ifade etmek üzere TAM'ı indüklemektedir. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada murin fibrosarkomdan izole edilmiş TAM'dan IRF-3/STAT1 aktivasyonunu yolu ile IFN- γ ile uyarılabilir kemokinler olan CXCL9 ve CXCL10'un eksprese edildiği bildirilmiştir (Sica ve ark., 2006).

NF- κ B aktivasyonu, çok sayıda pro-inflamatuar genin transkripsiyonunu indüklemektedir. Daha önceki çalışmalarda fare TAM'larının LPS ile M1 polarizasyon sinyaline yanıtında, defektif NF- κ B aktivasyonunun gözlemlendiği belirtilmiştir (Sica ve ark., 2000).

TAM'da p50 homodimerlerinin (NF- κ B'nin negatif regülatörleri) bol miktarda bulunduğu kanıtlanmıştır (Saccani ve ark., 2006). Söz konusu durum, TAM'ın neden inflamatuvar sitokinlerin üretiminde yetersiz olduğunu açıklamaktadır (Örneğin, IL-12, IL-1 β , TNF- α , IL-6)(4).

TAM, ayrıca NO'yu düşük düzeylerde üretmekte; in situ, ovaryan kanserindeki perifer lokalizasyon gösteren makrofajların küçük bir kısmı iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) için pozitiflik kaydetmiştir (Klimp ve ark., 2001). Ayrıca, M1 polarize makrofajların aksine, TAM'ın reaktif oksijen ara ürünlerinin zayıf üreticileri olduğu gösterilmiştir ve genel olarak tümör hücrelerine karşı nonsitotoksiktir (Mantovani ve ark., 2002).

M2 polarize makrofajlar gibi TAM'ın bir diğer özelliği, zayıf antijen sunumu ve zayıf APC aktivitesiyle uyumlu olmak üzere azalmış veya tamamen durmuş IL-12 üretimi, MHC molekülünün düşük ekspresyon seviyeleri ve IL-10'nun yüksek düzeyleri ile karakterize adaptif bağışıklığın aktivasyonunda yetersiz olmasıdır (Sica ve ark., 2006).

2.4.2. TAM ve Tümör Progresyonu

Daha önceki in vitro çalışmalarda IFN- γ ile uyarılmış makrofajlar veya TAM'ın belirli koşullar altında tümör hücrelerine karşı sitotoksik fonksiyonlar gösterdiği belirtilmiştir (Mantovani ve ark., 2002). Bununla birlikte, in vitro ve deneysel fare modellerinde, M1 polarizasyona yönlendiren sinyallerinin yokluğunda, TAM'ın inflamasyon yerine tümör gelişimini artırdığı gözlemlenmiştir (Mantovani ve ark., 2002; Pollard, 2004). Bu sebeple, yüksek seviyelerdeki TAM infiltrasyonunun birçok insan tümörlerinde (ancak hepsinde değil) kötü prognoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir; (Bingle ve ark., 2002; Pollard, 2004; Tsutsui ve ark., 2005; Balkwill ve ark., 2005). Buna göre makrofaj infiltrasyonu (örn. CD68) veya diferensiyasyonu (M-CSF) ilişkili genler, lenfoma, meme ve karaciğer kanserlerinin

kötü prognozunun habercisi olan moleküler sinyallerin bir parçasıdır. (Dave ve ark., 2004; Paik ve ark., 2004; Budhu ve ark., 2006).

Dikkat çekici bir şekilde, M2 polarizasyona doğru kendiliğinden kayma gösteren SHIP1 (SH2-containing inositol 5-phosphatase 1) -eksikliği olan farelerde, transplante edilen tümörlerin gelişiminde artış gözlemlenmiştir (Rauh ve ark., 2004).

Tümör stromasından salınan pek çok makrofaj ürünleri doğrudan tümör hücrelerinin büyümesini artırmakta veya tümör hücre göçünü ve metastazını artırmaktadır. Bunlara örnek olarak EGF, IL-6 ve TNF gibi sitokinler, CXCL12 gibi kemokinler verilebilmektedir (Mantovani ve ark., 2002; Balkwill, 2004; Pollard, 2004; Sica ve ark., 2006).

TAM ayrıca neo-anjiogeneze ve interstisyel matrisin çözülmesine ve de remodelizasyona yol açan çeşitli faktörleri üreterek tümör ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca TAM tümörün immün sistemden kaçmasına katkıda bulunan, IL-10 ve PGE2 gibi güçlü immunsupresif moleküllerin bir kaynağıdır (Mantovani ve ark., 2002; Balkwill, 2004; Balkwill ve ark., 2005).

2.4.3. TAM ve Anjiogenez

Anjiogenez, tümör büyümesinde ve ilerlemesinde önemli bir role sahip olan M2 makrofajlarla ilişkili bir fonksiyondur. TAM'ların çeşitli proanjiogenik faktörlerin (TGF β , VEGF, PDGF, FGF ailesinin üyeleri ve anjiogenik kemokinler) üretimi ile anjiogenezi arttırdığı rapor edilmiştir (Mantovani ve ark., 2002; Bingle ve ark., 2006). Gerçekten de kan mikro-damarların yoğunluğunun meme kanserinde ve diğer bazı insan tümörlerinde, makrofajların infiltrasyon derecesi ile orantılı olduğu görülmüştür (Leek ve ark., 1996). Akciğer kanserinde, TAM kanser hücreleri tarafından üretilen TGF ile birlikte, PDGF salınımı ile stroma oluşumuna ve anjiogeneze katkıda bulunarak tümör ilerlemesini yardımcı edebilmektedir (Mantovani ve ark., 2002). İnsan servikal kanserinde, TAM'ın VEGF-C üretimi ile peritümöral lenfanjiogenezinde ve daha sonrasında lenfatik metastaz oluşumu ile de kanser hücrelerinin yayılmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (Schoppmann ve ark., 2002).

TAM ayrıca, ekspresyon seviyeleri tümör neovaskularizasyonu ile ilişkili olan ve in vitro endotel hücre göçünü artıran anjiogenik faktör timidin fosforilazı ve anjiogenezi düzenleyen MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12, COX-2 gibi enzimleri üreterek proanjiogenik sürece katılmaktadır (Hotchkiss ve ark., 2003).

Östrojen tedavisi alan HPV16 (Human papilloma virüs 16) transgenik farelerde (servikal karsinogenezis modeli), TAM'ın MMP-9 üretmesinin anjiogenez gelişimi için çok önemli olduğu gösterilmiştir (Giraud ve ark., 2004). Ayrıca, TAM prokoagülan aktiviteye sahip fibrinin birikimi yoluyla da dolaylı olarak kan damarı oluşumunu artırmaktadır (Sica ve ark., 2006).

TAM ayrıca çeşitli kemokinler üreterek de anjiogeneze katkıda bulunmaktadır. Kemokinler tümör dokularında anjiogenik değişimin düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir (Balkwill, 2004). Birçok CXC kemokinlerinin NH₂-terminali, ilk sistemin önünde bulunan son derece korunmuş amino asit motiflerini içermektedir [Glu(glutamin)-Leu(lösin)-Arg(arjinin): ELR dizilimi] (Strieter ve ark., 1995; Luster, 1998). Genel olarak CXC kemokinlerinin ELR dizilimi içermeyen diğer serisi (non-ELR) anjiogenezi inhibe etme yeteneğinde iken ELR+ kemokinler, güçlü bir anjiogenik etkinliğe sahiptir. Anjiogenik olan kemokinler CXCL1-8 (CXCL 4 hariç) arasındaki kemokinleri içermektedir. Söz konusu kemokinler ortak bir reseptör olan CXCR2 vasıtasıyla etkinlik göstermektedir. Bazı ELR+ kemokinler, CXCR1 reseptörlerine bağlanmasına rağmen yaygın olarak endotelial hücreler yalnızca CXCR2 eksprese etmektedirler, buna bağlı olarak yalnızca CXCR2'nin anjiogenik aktivitenin aracısı olduğu kabul edilmektedir. Diğer bir ligand reseptör çiftini ise CXCL12 ve CXCR4 (C-X-C kemokin reseptör tip 4) oluşturmaktadır. CXCL12, non-ELR karakterde olmasına rağmen neo-anjiogenezise katılmaktadır (Salcedo ve ark., 1999; Bachelder ve ark., 2002). Hem CXCL12 hemde CXCR4 hipoksik koşullar altında upregülasyona uğramaktadır. Neoplastik progresyon esnasında anjiogenezi destekleyen ELR+ kemokinlerin önemi birçok hücre tipinde ortaya konulmuştur (Luster, 1998; Balkwill, 2004).

Hem fare tümör modellerinde hem de kanser hastalarından cerrahi yolla alınan örneklerdeki CXCL5 ve CXCL8 ekspresyonu, neovaskularizasyonla ilişkiyken hayatta kalma oranıyla negatif korelasyon göstermektedir. Başka bir deyişle CXCL5'in

azalması, tümör gelişiminin ve neovaskülarizasyonun zayıflaması demektir. ELR+ kemokinlerin yokluğunda dahi ortamda CXCR2 reseptörlerinin bulunması terapötik müdahale için söz konusu reseptörlerin hedef olması nedeniyle iyi bir fırsat vermektedir.

Düzensiz vaskülarizasyon ve hipoksi neoplastik dokuların özellikleridir ve azalmış tedavi yanıtları, malign progresyon, lokal invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Semenza, 2003).

TAM, tercihen tümörlerin düşük oksijen basıncı ile karakterize, zayıf vaskülarize bölgelerinde birikim göstermektedir (Murdoch ve ark., 2004). Hipoksi, hem tümör hücrelerinde hemde makrofajlarda pro-anjiogenik bir süreci tetiklemektedir. Transkripsiyon faktörü olan HIF-1 α , hipoksik strese karşı majör bir hücrel adaptasyon düzenleyicisidir bu sebeple anti kanser tedavisinin potansiyel bir hedefidir (Semenza, 2003). HIF-1 aerobik metabolizmayı anerobik metabolizmaya çevirmektedir, dolayısıyla kanser hücrelerinin glikolitik özelliklerini ön plana çıkarmakta ve enerji ihtiyaçlarını karşılamakta dolayısıyla olumsuz çevre koşullarında hayatta kalmasını sağlamaktadır. TAM, HIF-1 α ve HIF-2 α tarafından uyarılabilir genler olan glikolitik enzimlerin yanında ayrıca VEGFA, FGF beta, CXCL8'in ekspresyonunu artırarak hipoksiye uyum sağlamaktadır (Murdoch ve ark., 2004; Knowles ve ark., 2006). Cramer ve ark. tarafından makrofajların hipoksiye karşı bu metabolik adaptasyon ilişkisi in vivo olarak gösterilmiştir (Cramer ve ark., 2003).

HIF-1 α 'nın ablasyonu düşük oksijen koşullarında bozulmuş makrofaj motilitesi ve sitotoksitesi ile sonuçlanmıştır. Bu kanıt hipoksi-HIF-1 α yolunun solid tümörlerin içinde TAM'ın toplanmasında ve aktivasyonunda rol oynayabileceğini ve TAM aracılı anjiogenez ve tümör metastazı için etkili olabileceğini vurgulamaktadır. Bu bulgular ışığında, hipoksinin kemokin reseptörü CXCR4'ün ekspresyonunun selektif upregülasyonu ile TAM'ı da içeren stromal hücrelerin ve kanser hücrelerinin fonksiyon ve pozisyonunu etkileyebileceği tanımlanmıştır (Schioppa ve ark., 2003).

Ayrıca HIF-1 aktivasyonu, kanser hücresi migrasyonuna katılan bir kemokin olan CXCL12'nin, ligandı olan CXCR4'ün indüklenmesinde rol oynayabilmektedir (Balkwill, 2004). Bu nedenle, dolaylı olarak makrofajların in situ toplanması, doğrudan tümör hücreleri tarafından üretilen anjiogenik moleküller ile uyumlu olarak,

anjiojenin amplifikasyon yolağını oluşturmaktadırlar. HIF-1'in inhibisyonu kansere karşı umut verici bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmekte ve HIF-1'in inhibitörü bazı faktörler [Örneğin; farnesil transferaz inhibitörleri, PI3K (phosphoinositide 3-kinase) inhibitörleri] antitümör ilaçlar olarak klinik çalışma aşamasındadırlar (Semenza, 2003).

Diğer miyeloid hücreler tümör mikro çevresindeki anjiogenik değişimde kilit rol oynamaktadırlar. Spontan gelişen ya da tümör transplante edilen fare modelinde monosit/makrofajların protümörjenik ayrı bir alt kümesi TEM olarak tanımlanmıştır. TEM anjiopietin reseptör Tie2'nin ekspresyonu ile karakterizedir ve hipoksik vasküler hücreler tarafından yüksek düzeyde üretilen anjiopietin 2'ye cevap olarak tümörün hipoksik alanlarında birikir. TEM'ler VEGF ve MMP9'u daha yüksek seviyelerde eksprese etmektedirler ve güçlü pro-anjiogenik özellikler sergilemektedirler (De Palma ve ark., 2005). Farelerde tümör gelişiminin erken saflarında söz konusu hücrelerin selektif azalmasının tümör kitlesinin ve vaskülarizasyonunun azalmasına yol açması TEM'in anjiogenesisize dahil olduğunun kuvvetli bir kanıtı olarak gösterilmektedir (De Palma ve ark., 2005). TEM tümörlere yakın neoplastik olmayan dokularda mevcut değildir ve TEM'in tümörü kendi dokusuna geri çevirme kabiliyeti antitümör gen dağıtımı için araç olarak kullanılabilir (De Palma ve ark., 2008).

2.4.4. TAM ve Matriks Remodelizasyonu

Tümör kaynaklı proteazların hücre dışı matriks proteinlerini parçalayabildiği ve bazal membranın dağılmasına yol açarak tümör hücre invazyon sürecini kolaylaştırdığı uzun süredir bilinmektedir. Tümör stromasındaki makrofajlar, MMP'ler, plazmin, uPA (Ürokinaz plasminojen aktivatörü) ve uPAR (Ürokinaz plasminojen aktivatör reseptörü) gibi matriks sindirimini düzenleyen enzimleri üretebilmektedir (Egeblad ve Werb, 2002). Bu enzimlerin aktivitesi daha agresif bir neoplastik davranış ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, tPA (Doku plasminojen aktivatörü) ve uPA ve de ilgili reseptörleri, anneksin II ve uPAR'ın pankreas kanserinin invaziv davranışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Nagakawa ve ark., 2002).

MMP-2 ekspresyonu çeşitli tümörlerde artmakta ve lenf nodu tutulumu ile tümör evresi arasında güçlü bir ilişki vardır (Krecicki ve ark., 2001). MMP'in matris yıkımının

ötesinde bazı karmaşık etkileri vardır. Tümörün hücre dışı matriksinin sindirimi heparin bağlı büyüme faktörlerini salınmasına sebep olmaktadır ve anjiogenezi artırmak için endotel hücre göçünü kolaylaştırmaktadır. MMP-9'un hematopoietik hücrelerden türetilmiş tümörlerin ilerlemesine katkıda bulunduğu dair doğrudan kanıtlar bulunmaktadır. İnsan tümör ksenogrefti uygulamasında kullanılan MMP-9 defektli makrofajlar üreten MMP-9^{-/-} fareler, vahşi formlarına kıyasla daha küçük boyuttadır ve daha az sayıda damar ve makrofaj infiltrasyonu içermektedir. Kemokinler proteolitik enzimlerin ve bu enzimlerin reseptörlerinin güçlü indükleyicileridir ki bu enzimler hücre dışı matris yıkmakta ve tümör invazyonu kolaylaştırmaktadır. İnsan monositlerin gen ekspresyonu analizinde, kemokin CCL5, uPA reseptörü ile birlikte çeşitli MMP'ların özellikle de MMP9'un gen ekspresyonunu indüklediği gözlenmiştir (Coussens ve ark., 2000). Ayrıca TAM, sisteinden zengin asit protein sentezini de içeren birçok matriks proteinleri üreterek tümör matrisi oluşturmak için aktif olarak katkıda bulunmakta ve böylece kollajen yoğunluğunu, lökosit ve kan damar infiltrasyonunu düzenlemektedir (Sangaletti ve ark., 2008).

Wyckoff ve arkadaşlarının floresan işaretli hücreler kullanarak yaptıkları bir çalışmada, meme tümörlerinde malign hücre mobilizasyonu genellikle damar yüzeyine doğrudan tümör hücre intravazasyonuna yardımcı olduğu görünen makrofajların yakınında meydana gelmiştir (Wyckoff ve ark., 2007).

Pawelek ve Chakraborty makrofajın metastaz gelişimindeki rolünü açıklamada kamçılayıcı teoriyi ileri sürmüşler, kemik iliği kaynaklı migratuar hücrelerle kanser hücresinin birleşmesini disseminasyon sürecini artırıcı itici güç olarak bildirmişlerdir (Pawelek ve Chakraborty, 2008).

2.4.5. Anti-Tümör İmmün Cevapta TAM'ın Rolü

TAM popülasyonu oluşturan hücre tiplerinden biri olan M2 makrofajların diğer bir özelliği, T hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve zayıf antijen sunumuna yol açarak edinsel bağışıklığın baskılanmasıdır (Sica ve ark., 2006). M2 makrofajlar tarafından salınan immunsupresif sitokinlerden en fazla çalışma IL-10 üzerinde yapılmıştır. Ancak, en azından ilerlemiş kanser TAM'larında ağırlıklı olarak NF- κ B'nin aktivasyonu ile saptanan TNF- α , IL-1 ve IL-2 gibi immünstimulan sitokinler de

salgılanmaktadır. IL-10'nun tek başına veya IL-6'ya uyumlu olarak, tümör bağlantılı antijen spesifik T hücre immünitesinin baskılanmasına yol açan makrofaj B7-H4 molekülünün ekspresyonunun upregülasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Kryczek ve ark., 2006).

TAM'lardaki temel immünstimulan sitokin IL-12'nin defektif üretimi, TAM veya tümör hücrelerinden IL-10 salınımı nedeniyle gerçekleşmektedir. Nihayetinde söz konusu bazı immünsüpresif etkiler STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinin aşırı aktivasyonu tarafından düzenlenebilmektedir. STAT3 inhibisyonu aktive makrofajlarda sitotoksitede ve antijen sunumunda bir artışla sonuçlanmaktadır ve bu durum tümör gelişiminin gerilemesine yol açmaktadır (Sun ve ark., 2006).

TAM'ın immünsüpresif etkisinin bir bölümü nonsitotoksik T hücre alt sınıflarının öncelikli olarak etkileyen kemokinlerinin salınımı ile indirekt olarak ortaya çıkarılmaktadır (Schutysse ve ark., 2002).

CCL18 insan ovarian karsinomunda asit sıvısındaki en bol bulunan kemokin olarak tespit edilmiştir. Normal makrofajlarda CCL18, IL-4, IL-13 ve IL-10 gibi TH2 sitokinleri tarafından indüklenebilmekte ve tanımlanamayan bir reseptör ile etkileşime girerek naif T hücrelerini üretimine yol açmaktadır (Adema ve ark., 1997).

M2 makrofajlar ve olgunlaşmamış DC hakim olduğu periferik mikroçevrede ki naif T hücrelerinin uyarımı, olasılıkla T hücresi anerjisini indüklemektedir. Diğer CCL17 ve CCL22 kemokinleri, TAM'lar tarafından fazla miktarda eksprese edilmektedir (Mantovani ve ark., 2002; Balkwill, 2004). Bu kemokinler çoğunlukla, anti tümör fonksiyonları bulunmayan TH2 hücreleri ve Treg'ler tarafından eksprese edilen CCR4 reseptörü ile etkileşime girmektedir (Bonecchi ve ark., 1998).

TAM'lara ek olarak bir takım çalışmalarda, tümör ve tümörlü hastaların lenfoid dokularında, immun supresif fenotipe katkı sağladığı savunulan myeloid türevi baskılayıcı hücreler (MDSC) olarak adlandırılan myeloid M2 eğilimli hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir (Bronte ve ark., 2003). Bu hücreler M2 polarize TAM'larla ortak özelliklere ve gen ekspresyonu profiline sahiptir ancak aynı zamanda farklı özelliklerde göstermekte ve LY6C+ ve de CD11b markırların ekspresyonu ile karakterize edilmektedirler (Biswas ve ark., 2006). MDSC T hücre yanıtını kontrol etmek için, arjinin metabolizmasında yer alan iki enzimi indüklemektedir. Bunlar;

peroksinitrit üretimiyle ve T hücreleri ve de T hücre apoptozu tarafından CD3 ζ (Cluster of differentiation 3, zeta-chain) zinciri ekspresyonunun yoksunluğuyla sonuçlanan arjininin tükenmesi yol açan NOS2 (Nitrik oksit sentaz 2) ve Arg 1 enzimleridir (Bronte ve ark., 2003).

2.5. AMPK-İlişkili Kinaz

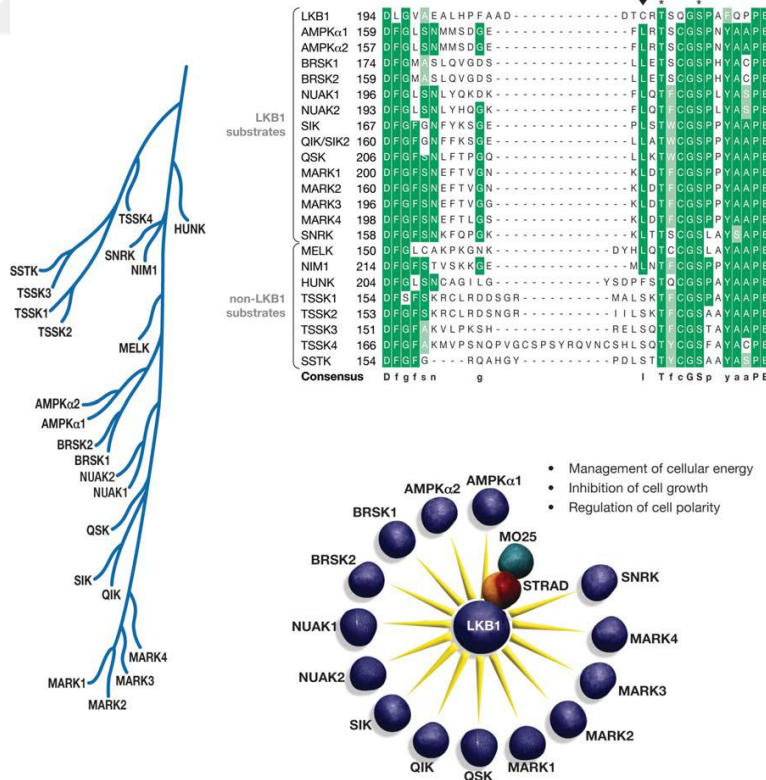
2.5.1. AMPK-ilişkili kinaz'ın sınıflandırılması

AMPK çok iyi korunmuş bir protein kinaz olup, bütün ökaryotik canlılardaki enerji dengesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. AMPK heterotrimerik bir protein kompleksi olup bir adet katalitik- α subuniti ve iki adet düzenleyici ($-\beta$ ve $-\gamma$) subunitten oluşmaktadır (Stapleton ve ark., 1996).

AMPK; intraselüler ADP (Adenozin difosfat) /ATP (Adenozin trifosfat) ile intraselüler AMP (Adenozin monofosfat)/ATP oranlarında artışa neden olan metabolik stres durumuna, cevap olarak aktive edilmektedir. Bu metabolik stres tanımı; egzersiz, hipoksi, hipoglisemi ve oksidatif stresi de içine almaktadır. Aktifleşen AMPK, ATP tüketimini azaltmak için protein, yağ asidi, kolesterol sentezi gibi anabolik olayları durdurmakta ve ATP üretmek amacıyla yağ asidi oksidasyonunu ve glikoliz gibi katabolik süreçleri de aktive etmektedir (Hardie ve ark., 2012). İnsan kinomlarının (500 enzim) siliko analizlerinde, AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ kinaz bölgeleri ile belirgin sekans benzerlikleri olan bir grup protein kinaz bulunmuştur ve de söz konusu protein kinazlar bu nedenle AMPK-ilişkili kinazlar olarak adlandırılmıştır. Toplamda 20 adet AMPK-ilişkili kinaz mevcuttur ve bunların 12 adedi yakın ilişkili ve 8 adedi ise uzak ilişkili olmak üzere iki gruptan oluşur. 12 tane olan AMPK-ilişkili kinazlar yakın ilişkili olup bunlar; BRSK (brain-specific kinase) 1 ve 2, NUA1 [Sucrose non-fermenting kinase-1 (SNF-1)-benzeri kinaz] 1 ve 2, MARK (microtubule affinity-regulating kinase) 1, 2, 3 ve 4, SIK 1, 2 ve 3, MELK (maternal embryonic leucine-zipper kinase). Diğer 8 adet kinaz uzaktan ilişkili olup bunlar; SNRK (sucrose non-fermenting related kinase), NIM1, TSSK (testis-specific serine/threonine kinase-1) 1-2-3 ve 4, SSTK (testis-specific serine kinase 6) ve HUNK (hormonally up-regulated neu-associated kinase) şeklinde sıralanmaktadır. (Manning ve ark., 2002).

İlginç bir şekilde; AMPK $\alpha1/\alpha2$ ile AMPK-ilişkili kinazların 12 tanesi (BRSK1 VE 2, NUAK1 VE 2, MARK1, 2, 3, 4, SIK1, 2, VE 3 VE SNRK), LKB1(liver kinase B1) Ste20-ile ilişkili adaptör protein 25 [MO25 (Mouse protein-25)] kompleksi ile fosforile olmaktadır (Lizcano ve ark., 2004). Bu fosforilasyon T-loop’unda korunmuş Thr (threonin) üzerinde olmaktadır. LKB1 knockout fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF) ve LKB1 olmayan HeLa hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, T-loop fosforilasyonun LKB1 Ste20-ile ilişkili adaptör protein 25 (MO25) kompleksi tarafından yapıldığı doğrulanmıştır (Lizcano ve ark., 2004; Al-Hakim ve ark., 2005). MELK, NIM1 ve TSSK 1, 2, 3 ve 4 otoposforile olmakta ve LKB1 kompleksinden bağımsız ve önemli bir kinaz aktivitesi göstermektedir (Lizcano ve ark., 2004). Ayrıca MARK, BRSK, NUAK ve SIK izoformunu da kapsayan bazı AMPK-ilişkili kinazlar, fosforilasyon ve ubiquitilasyon gibi ilave post-translasyonel olaylarla regüle edilmektedir (Bright ve ark., 2009).

AMPK-ilişkili kinazlar hücre çoğalması, hücre polarizasyonu, kanser ve metabolizma gibi birçok biyolojik süreçte önemli bir role sahiptir (Bright ve ark., 2009).



Şekil 5. AMPK-ilişkili Kinazlar.

Şeklin sol panelinde AMPK ve AMPK ilişkili kinazlar, insan kinom dendrogramının dalları şeklinde gösterilmiştir (Manning ve ark; 2002). En üstte tüm AMPK ilişkili kinazların aktivasyon looplarının sekans dizileri gösterilmiştir. İdentik rezidüer koyu yeşil renkle, %50'den fazla korunan rezidüer ise açık yeşil renkle gösterilmiştir. LKB-1 regüle Ser ve Thr ler (*) işareti kullanılarak gösterilmiştir. LKB-1 ilişkili fosforilasyon için gerekli Lys rezidüsü aşağı yönlü ok ucu ile gösterilmiştir (Shaw ve ark; 2004). LKB1-STRAD-MO25 kompleksi tarafından düzenlenen AMPK ilişkili kinaz en alta yer alan diagramda gösterilmiştir (Alessi ve ark; 2006).

2.5.2. SIK (Salt Inducible Kinase)

SIK1, 2 (QIK olarak bilinir) ve SIK3 (QSK olarak bilinir) AMPK ilişkili kinazların bir alt familyası olan serin/treonin protein kinazlardır (Dentin ve ark., 2007).

SIK1 ilk olarak yüksek tuz diyetiyle beslenen ratların adrenal bezlerinden tesbit edilmiştir. Bu yüzden ismi tuzla indüklenebilen kinazdır (Wang ve ark., 1999). Diğer 2 izoformu SIK2 ve SIK3 veritabanı taramaları sırasında SIK1 ile sekans homolojisi gösterdikleri tesbit edilerek tanımlanmıştır (Horike ve ark., 2003).

SIK1 geni 21q22.3 kromozomunda lokalize iken, SIK2 ve SIK3 sırasıyla 11q23.1 ve 11q23.3 kromozomunda lokalizedirler (Lin ve ark., 2000).

SIK izoformlarının doku dağılımı

Ratlarda ve farelerdeki doku panellerinden elde edilen total RNA, Northern blot tekniği kullanılarak incelenmiş ve SIK1 doku ekspresyon modeli değerlendirilmiştir. Sonuçta; SIK1 mRNA'sının adrenal bezlerde, overlerde, akciğerde, beyinde ve testiste çok fazla oranda bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca; bu organlardan başka, iskelet kası, kalp, karaciğer ve yağ dokusunda da eksprese edildiği bildirilmiştir (Feldman ve ark., 2000; Horike ve ark., 2003).

SIK2 mRNA'sının beyaz ve kahverengi yağ dokusunda aşırı miktarda eksprese edildiği; testis, akciğer, beyin ve karaciğerde ise daha az oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Du ve ark., 2008).

SIK3'ün ise bütün dokulardan exprese edildiği belirlenmiştir (Okamoto ve ark., 2004).

SIK1 başlıca nükleus, sitoplazma, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranında bulunurken; SIK2 golgi, sitoplazma, nükleus, mitokondri ve plazma membranında bulunmaktadır. SIK3 ise nükleus, sitoplazma, endoplazmik retikulum, mitokondri ve peroksizomda bulunmaktadır (<http://www.genecards.org>).

İnsan SIK1 geni 776 aminoasit (132), SIK2 931 aminoasit ve SIK3 ise 1263 aminoasit uzunluğundadır (Kato ve ark., 2004).

Her üç SIK izoformunun moleküler kütlelerinde farklılıklar vardır. Primer sekansları analiz edildiğinde; bu üç SIK izoformunun C-terminal düzenleyici bölgelerinin geniş bir değişkenlik gösterdiği ve uzunluklarının farklı olduğu görülmüştür ve farklı protein kinazlar için potansiyel fosforilasyon alanlarına sahip olması nedeniyle SIK'i özel yapan ve diğer proteinlerden ayıran bir bölgedir (Becker ve ark., 1996).

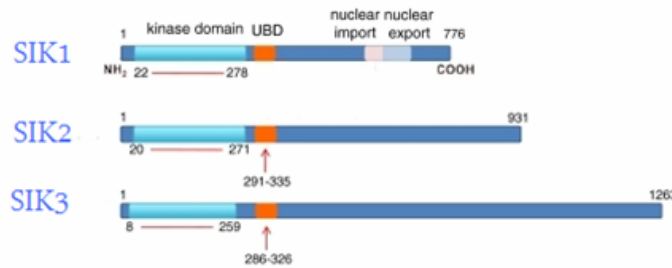
Tüm AMPK'larda olduğu gibi SIK'in her üç izoformunda da N-terminal serin/treonin kinaz bölgesinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği bulunmuştur. N-terminal kinaz bölgesi 11 katalitik subdomaini içeren önemli bir fonksiyonel bölgedir. N-terminal kinaz bölgesi kinaz aktivitesi için önemli olan T loop bölgesi bulundurmaktadır (Jaleel ve ark., 2006).

Hemen hemen tüm AMPK'larda olduğu gibi SIK izoformlarının katalitik aktivasyonu da LKB1 tarafından T loop bölgesinin fosforilasyonuna [SIK1–Thr182 (Threonin 182), SIK2–Thr175 (Threonin 175), SIK3–Thr221 (Threonin 221)] bağlıdır (Lizcano ve ark., 2004).

SIK, birçok AMPK'da olduğu gibi kinaz katalitik domainlerinin yakınındaki karboksil terminallerinde ubiquitin bağlantılı bir domaine sahiptir. Ancak UBA (ubiquitin-associated protein domain) domaininin, poliubikitin veya ubiquitin benzeri diğer moleküllerle etkileşime girmediği bulunmuştur. Fakat UBA önemli bir yapısal role sahiptir ve UBA domainlerinin uzaklaştırılması veya mutasyonunu, LKB1 ilişkili fosforilasyonu ve katalitik aktiviteyi belirgin derecede olumsuz etkilemesinden dolayı, LKB1 ilişkili fosforilasyon ve kinaz aktivasyonu için gereklidir (Jaleel ve ark., 2006).

Protein kinaz A'nın tüm izoformları, C-terminalinde nisbeten korunmuş bir bölgede serin rezidüleri üzerinden [SIK1–S575 (serin 575), SIK2–S587 (serin 587), SIK3-S551 (serin 551)] fosforilleği ileri sürülmektedir. Bu PKA fosforilasyon bölgesinin nukleus yerleşim sinyali (Nuclear localization signal, NLS) olarak yer aldığı düşünülmektedir. Bu serin rezidüsünün PKA tarafından fosforlanmasıyla SIK'in nukleustan sitoplazmaya göç ettiği ve fonksiyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Kato ve ark., 2004).

Bir diğer fosforilasyon bölgesi ise insülin sinyal yollarında fonksiyonu olan PKB (Protein Kinaz B) tarafından regüle edilmektedir. Bu fosforilasyon bölgesi, SIK2'de karaciğerdeki [S358 (serin 358)] ve kahverengi yağ dokusundaki (S587) serin rezidüleridir (Dentin ve ark., 2007). Ayrıca CaMK (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase)'in epitelyal hücrelerde sodyuma cevap olarak SIK1'i [Thr322 (treonin 322)], nöronal hücrelerde iskemiye cevap olarak SIK2'yi [Thr484 (treonin 484)] fosforilleği ileri sürülmektedir (Koo ve ark., 2005).



Şekil 6. SIK izoformları. Her üç izoformda korunmuş ve regülatuar alanların şematik gösterimi (Bertorello ve Zhu, 2009).

SIK1'in Genel Fonksiyonları

Serin/treonin protein kinaz olan SIK; glukoneogenezde ve lipogenezin regülasyonunda, kas büyümesinde ve diferansiyasyonunda, tümör baskılanmasında ve hücre döngüsü regülasyonunda önemli fonksiyonlara sahiptir. İyon dengesi üzerine yapılan çalışmalar Na/K-ATPaz plazma membran taşıyıcılarını hedefleyen intraselüler Na konsantrasyonundaki aşırı artışların baskılanmasında, SIK1'in önemli bir role sahip olduğunu desteklemektedir. Ayrıca SIK, intraselüler proteinlerle etkileşime girerek

apoptozis gibi multiple intraselüler sinyal yollarının da düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (Cheng ve ark., 2009).

SIK izoformları için ortak substratlar, sınıf 2 histon deasetilazlar (HDAC4, HDAC5) ve CRTC ailesi (CRTC1, CRTC2, CRTC3) proteinleridir. Aynı zamanda SIK izoformlarının en iyi karakterize edilen fonksiyonu, CRTC ve sınıf 2 HDAC üzerinden çeşitli regülatörleri üzerine etki ederek gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Temel durumda CRTC'nin SIK tarafından fosforilasyonu, 14-3-3 proteinleri ile CRTC'nin etkileşimini indükler ve ardından sitoplazmada hapseder (Screaton ve ark., 2004; Bittinger ve ark., 2004). cAMP sinyalizasyonu ve PKA tarafından fosforilasyonu SIK'in CRTC'ye doğru aktivitesini inhibe etmektedir. Böylece CRTC'nin defosforilasyonu sonucu nükleusa alınmaktadır (Koo ve ark., 2005). Nükleusta CRTC, CREB hedef gen transkripsiyonu düzenlenmesinde rol almaktadır.

Sınıf 2 HDAC'larında, 14-3-3 proteinleri bağlanması aracılığıyla SIK izoformları tarafından fosforillenmesi sonucu nükleusa geçişleri engellenerek, inhibisyonlarına yol açmaktadır (Takemori ve ark., 2009). Sınıf 2 HDAC'lar yaygın transkripsiyonel represörler olarak bilinmekte, karaciğer ve adipositlerde glukoz metabolizmasında rol oynayan genlerin düzenlenmesinde rol almaktadırlar.

SIK, Sınıf 2 HDAC inhibisyonu sonucu kas hücrelerinde regülatör olarak rol oynamaktadır. Ayrıca sınıf 2 HDAC'ların inhibisyonu sonucu SIK, myositlerde MEF2 (myocyte enhancer factor-2) hedef gen ekspresyonunun artışına yol açmaktadır (Chang ve ark., 2005). SIK1, bu proteinler dışında, PPME1 (Protein phosphatase methylesterase 1), SREBF1 (Sterol regulatory element binding transcription factor 1), p53/Tp53 (Tümör protein 53)'ü de fosforillemektedir.

SIK, CREB'i fosforillemek suretiyle aktivitesini inhibe ederek CREB spesifik koaktivatörler olan CRTC1/TORC1 (Transducer of regulated CREB activity1) ve CRTC2/TORC2'yi baskılayarak hepatik glukoneogenez üzerine negatif regülatuar etki göstermekte, hepatik lipogenez üzerine negatif regülatuar etkisini ise SREBF1'i fosforilasyonla inhibe ederek göstermektedir. SIK1 p53/Tp53 bağımlı anoikisin pozitif regülatörüdür ve böylece metastazı suprese etmektedir (Cheng ve ark., 2009, Shaw, 2009).

SIK1'in Na/K-ATPase aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla Na⁺/K⁺ taşınmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Bazal koşul altında, PP2A/PME1 (Protein fosfataz metilesteraz 1) kompleksi, Na/K-ATPase α-alt birim ile ilişkilendirilmektedir. PP2A'nın fosfataz aktivitesi PME tarafından inhibe edilir iken, Na/K-ATPase, PP2A aracılı defosforilasyon ile aktive edilebilmektedir. Bu bağlamda, aşırı veya aktive edilmiş SIK1, PME-1'i fosforile etmekte ve bunun PP2A/ Na/K-ATPase kompleksinden ayrışmasını tetiklemektedir. Bu etkinin sonucunda, bahsi geçen PP2A fosfataz aktivitesinin devamını, dolayısıyla da Na/K-ATPase üzerinde defosforilasyonu kolaylaştırır ve katyonun taşınmasını sağlar (Sjöström ve ark., 2007).

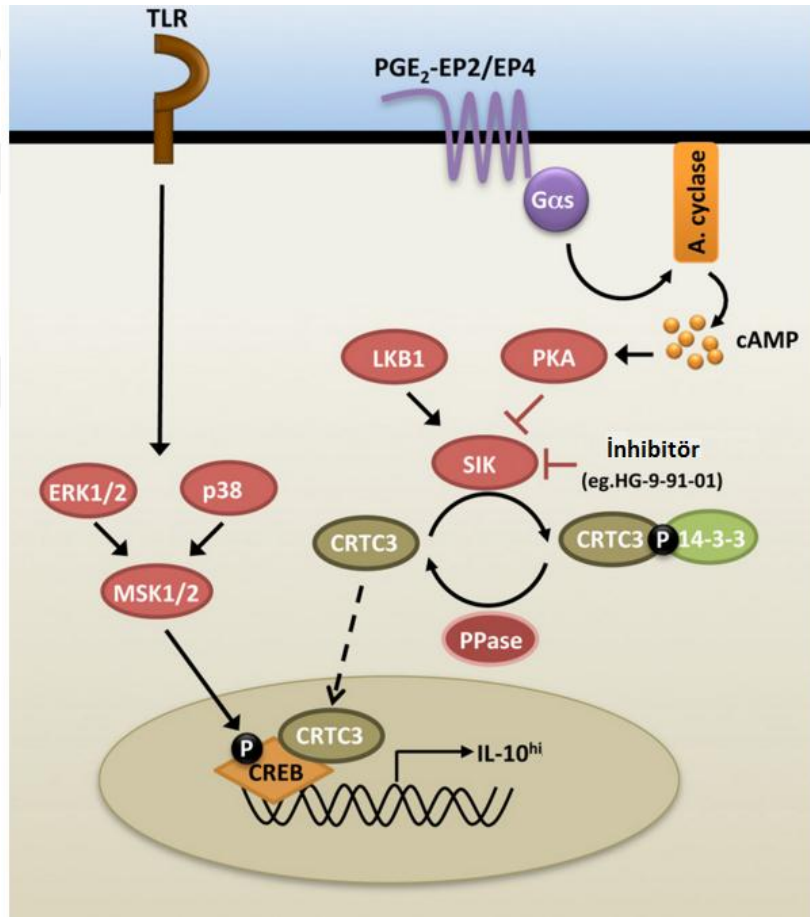
SIK ayrıca hücre büyümesi ve proliferasyonunda önemli yollardan biri olan TGF/Smad sinyalizasyonunun negatif regülasyonundan sorumlu olan ve TGFβR1 (TGF-β receptor 1) /ALK5 (activin A receptor type II-like kinase)' in degradasyonu ile ilişkili olan inhibitör Smad7 (SMAD family member 7) ve Smurf2 (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2)'e doğrudan bağlanmaktadır. Böylece TGFβR1/ALK5, Smad7, Smurf2, SIK1'i içeren bir protein kompleksi oluşturarak TGFβR1'in ubiquitinasyonuna ve down regülasyonuna yol açmaktadır (Kavsak ve ark., 2000; Ebisawa ve ark., 2001).

SIK-CRTC-CREB ve Makrofaj Polarizasyonu

SIK1'in fonksiyonu, nükleusta transkripsiyonel süreci başlatan bir transkripsiyon faktörü olan CREB aktivitesini baskılamaktır. Bu bağlamda; LKB1-SIK-CRTC sinyali, CREB aktivitesini inhibe etmede kritik bir rol oynamaktadır (Conkright ve ark., 2004).

CREB, fosforilasyon ile aktive edilir ancak, bu aktivasyon CRTC'ler olarak adlandırılan (CRTC1, CRTC2, CRTC3) transkripsiyonel koaktivatörlerin etkileşimiyle büyük oranda artırılmaktadır. CREB transkripsiyon faktörü, makrofajlarda antiinflamatuvar bir gen ekspresyon programını kontrol etmektedir. SIK'in makrofajlardaki CREB-bağımlı gen transkripsiyonunu, CRTC3'ü fosforile ederek baskıladığını, dolayısıyla da IL-10 üretimi ile düzenleyici makrofajların ekspresyonunu sınırladığı belirlenmiştir. Makrofajlar farmakolojik veya fizyolojik (PGE2 gibi) SIK inhibitörleri ile muameleye sokulduğunda CRTC3'ün defosforilasyonunu artırdığı, 14-3-3 proteinlerinden salınımının gerçekleştiği ve CRTC3'ün nukleusa transloke olduğu

ve bu translokasyonun IL-10 üretiminde dramatik bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bir kez salındığında, IL-10 otokrin bir biçimde, LIGHT (homologous to lymphotoxin, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for binding to herpesvirus entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes) ve SPHK1 (sfingozin kinaz 1) gibi düzenleyici makrofaj markırlarını up-regüle etmiştir. Böylece SIK enzimlerinin (SIK1, SIK2 ve SIK3) transkripsiyon faktörlerine etki ederek makrofaj polarizasyonunu düzenlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Clark ve ark., 2012; MacKenzie ve ark., 2013).



Şekil 7. SIK-CRTC3 Sinyal kaskadı tarafından IL-10 üretiminin kontrolü.

TLR sinyali Ser133 rezidüsünden CREB'i fosforile ederek antiinflamatuvar sitokin IL-10'nun düşük seviyeden üretimine neden olmaktadır. Bu hücre hattında SIK'ler LKB1 tarafından aktive edilen oldukça aktif bir enzimdir. SIK'ler 14-3-3 proteinleriyle etkileşimi indükleyen CREB ko-aktivatör CRTC3'ü fosforiller ve CRTC3'ün sitoplazmada kalmasına yol açarak CREB'i aktive etmesini engeller. SIK'lerin farmakolojik olarak inhibisyonu CRTC3'ün defosforilasyonunu artırmakta ve bu sayede CREB bağımlı gen transkripsiyonunu ve IL-10 üretimini indüklemektedirler. PGE2 gibi adenilat siklaz ile

birleşerek cAMP üretimini indükleyen sekonder sinyaller, TLR agonistleriyle sinerji göstererek yüksek seviyede IL-10 üretiminde yol açmaktadırlar. cAMP'nin sitoplazmik konsantrasyonunun artması SIK'leri baskılayan PKA'yı aktive etmektedir. SIK'lerin farmakolojik inhibisyonun etkileri CRTC3'ün defosforilasyonuna ve nükleusta CREB fonksiyonunun aktivasyonuna yol açmaktadır. PPase, protein fosfatase; EP2/EP4, PGE2 receptor 2/4 (Clark, 2014).

SIK2'in genel fonksiyonları

SIK2'nin substratları ise SIK1 ve SIK3 ile ortak olan CRTC ailesi ve class 2 HDAC proteinleri yanında IRS1 (İnsulin reseptör substrat 1) ve HAT olan p300'dür (Bricambert ve ark., 2010).

Adipoz dokuda bol miktarda bulunan SIK2, insulinle uyarılabilen adipositlerde IRS1'i Ser-794'den fosforile ederek insulin sinyal transdüksiyon etkinliğini negatif regüle etmektedir. İnsülin reseptörü, tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve IRS1'in insülin reseptörü tarafından insülin bağımlı tirozin fosforilasyonu, insülin yolağındaki öğelerin aktivasyonunu başlatmaktadır. Ancak IRS'nin Ser-789 bölgesinden fosforilasyonunun insülin sinyalini azalttığı bilinmektedir. Bu olgu, ya IRS'nin plazma membranında insülin reseptörü ile etkileşiminin engellenmesi ya da IRS yıkımı üzerinden gerçekleşmektedir (Gual ve ark., 2005).

SIK2'nin fosforillediği diğer bir protein, histon asetil transferaz olan p300 proteinidir. Karaciğerde, p300'ün (Ser89) fosforilasyonunun, ChREBP (Carbohydrate-responsive element-binding protein) üzerinden lipogenik genlerin negatif regülasyonunda önemli olduğu gösterilmiştir (Bricambert ve ark., 2010).

SIK3'ün genel fonksiyonları

SIK3, vücutta yaygın olarak eksprese edilen bir serin/treonin kinazdır. Hakkında kısıtlı sayıda çalışma olmakla birlikte son zamanlarda, SIK3'ün glukoz ve lipid homeostazı ile ilişkili olduğu keşfedilmiştir.

SIK3^{-/-} fare modelinde söz konusu olguyu destekler nitelikte olan hipolipidemi, hipoglisemi gibi çeşitli malnutrisyon fenotipleri gösterilmiştir. Ayrıca SIK3^{-/-} farelerde kolestaz gibi safra kanalı bozuklukları ve kolelitiazis gibi lipid metabolizma bozuklukları da gözlenmiştir. SIK3'ün enerji depolamasındaki rolü ve safra asidi ve de

kolesterol metabolizmasını düzenlemesindeki etkisinden dolayı yeni bir enerji regülatörü olduğu düşünülmektedir (Uebi ve ark., 2012).

Enerji metabolizmasına ek olarak, SIK3^{-/-} farelerde yapılan çalışmalarda kondrosit hipertrofinde önemli bir rol olması nedeniyle iskelet formasyonunda SIK3'ün rolü olduğu bildirilmiştir. SIK3^{-/-} farelerde kondrositlerin nükleuslarında HDAC4 birikimi sebebiyle kıkırdak dokusunda SIK3'ün sınıf 2 HDAC'leri regüle etmesi önemli bir olgu olma özelliğindedir (Sasagawa ve ark., 2012).

2.6. Sitokinler

2.6.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

TNF- α , başta monositler ve LPS ile aktive olmuş makrofajlar tarafından olmak üzere, T lenfositler, NK hücreleri (Natural killer hücreleri) ve diğer birçok hücre tarafından sentezlenmektedir. TNF-R1 (TNF reseptör 1) ve TNF-R2 (TNF reseptör 2) olmak üzere iki tip TNF reseptörü bulunmaktadır. TNF biyolojik etkilerinin çoğunu TNF-R1 aracılığıyla yapmaktadır.

TNF- α 'nın başlıca görevleri arasında, nötrofil ve monositlerin enfeksiyon bölgesine göçünün uyarılması ve bu hücrelerin mikroorganizmalar ortadan kaldırılmak üzere uyarılması bulunmaktadır. TNF- α ; vasküler endotelial hücreleri adezyon molekülleri sergilemeleri yönünde uyarmakta ve makrofajlarla, endotelial hücreleri ise kemokin sentezlemeleri için indüklemektedir. Ağır enfeksiyonlarda TNF- α yüksek miktarlarda sentezlenmekte ve ateş, karaciğerden akut faz reaktanlarının sentezi ve kaşeksi gibi sistemik etkiler oluşturmaktadır. Yüksek miktarda TNF- α salgılanması sonucunda damar içi tromboz ve septik şok klinik sendromu gelişmektedir (Erten ve ark., 2007).

2.6.2. İnterlökin 12 (IL-12)

IL-12, tip1 sitokin ailesinin bir üyesidir. Başlıca dentritik hücreler ve aktive makrofajlar tarafından üretilmektedir. IL-12 hücre içi mikroplara karşı doğal immün yanıtın bir mediyatörü olan ve bu mikroplara karşı hücre aracılı immün yanıtın temel indükleyicisi olarak görev yapan bir sitokindir.

IL-12; NK hücrelerini aktive etmekte, NK hücreleri ve T hücrelerinden IFN- γ salınımını artırmakta, NK hücrelerinin ve sitotoksik T lenfositlerin sitolitik aktivitesini yükseltmekte ve TH1 hücrelerinin gelişimini arttırmaktadır (Erten ve ark., 2007).

2.6.3. Lipopolisakkarit (LPS)

Makrofajların potent aktivatörlerinden biri olan lipopolisakkarit, ilk kez *Vibrio cholerae*'nin lizatlarında, hayvanlarda toksik şoka yol açan ısıya-dirençli bir toksin olarak belirlenmiştir. Bu toksin, ekzotoksinin tersine, bakteri tarafından salgılanmadığından endotoksin olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu toksinin başlıca toksik bileşeninin, gram-negatif bakterilerin dış membranını oluşturan LPS olduğu belirlenmiştir (Caroff ve ark., 2002).

LPS O-oligosakkarit zinciri, merkez oligosakkaridi ve bir lipid komponenti olan lipid A yapısı içermektedir. O-oligosakkarid zinciri LPS'in yüzeyinde bulunur ve her bakteri türü için spesifik özellikler taşımaktadır. LPS'nin orta kısmında heksoz ve heptoz şekerler bulunmaktadır. Lipid A kısmı, LPS'nin etkilerini oluşturan üçüncül yapısıdır ve LPS'nin bakteri duvarına yapışmasında önemli bir rol oynamaktadır (Scott ve ark., 2002; Raetz ve Whitfield, 2002).

LPS, makrofajlarda CD14 reseptörü üzerinden etkisini göstermektedir. Bu reseptör transmembran bölge içermediğinden, intraselüler sinyalleri başlatmak için TLR4'e gereksinim duymaktadır. TLR4, LPS'nin inflamatuvar cevabı indüklemesi ve sinyalizasyonu başlatması için gereklidir.

2.6.4. İnterferon Gamma (IFN- γ)

IFN- γ , tip 2 sitokin ailesinin bir üyesidir. İnterferonlar, pek çok farklı hücreyel programı, çok sayıdaki genin transkripsiyonel kontrolü aracılığı ile düzenleyen sitokinler olup reseptör özgüllüklerine ve sekans homolojilerine göre tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. IFN- γ tip 2 interferonların tek üyesidir (Bach ve ark., 1997). Ayrıca IFN- γ , makrofaj ve dentritik hücrelerden salınan IL-12 etkisi ile NK, CD4+ ve CD8+ T hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Antijene özgül CD4+ T

hücreleri, in vivo olarak IFN- γ 'nın en önemli kaynağını oluşturmaktadır (Torrado ve Cooper, 2013).

IFN- γ , esas olarak makrofaj aktive eden sitokindir ve doğal ve kazanılmış yanıt arasında kritik bir işlev görmektedir. Başlıca işlevleri; makrofaj aktivasyonu, naif CD4⁺ T hücrelerin TH1'e farklılaşmasının desteklenmesi, MHC sınıf I ve II moleküllerin ve kostimülator moleküllerin ekspresyonunun artırılmasıdır.

IFN- γ 'nın reseptörü IFN- γ R1 (IFN- γ reseptör 1) ve IFN- γ R2 (IFN- γ reseptör 2) olarak adlandırılan tip 2 sitokin reseptörü ailesine ait yapısal olarak homoloji gösteren 2 polipeptitten oluşmaktadır. IFN- γ 'nın bağlanması, bu 2 reseptör zincirinin dimerizasyonunu indüklemekte ve bu JAK1 ve JAK2 kinazlarla ilişkili aktivasyona ve sonunda çeşitli genlerin transkripsiyonunu stimüle eden STAT1'in dimerizasyona ve fosforilasyonuna yol açmaktadır. Böylece klasik aktive makrofaj yolağını uyarılmış olur (Abbas ve ark., 2007).

Anti-inflamatuvar sitokinler

TH1 hücre aracılı sitokinler antimikrobiyal etkiyi arttırmalarına rağmen, TH2 ve diğer bazı immün baskılayıcı sitokinler enfeksiyonlara karşı konak direncini azaltıcı etki göstermektedir. TH2 sitokinler, genel olarak TH1 sitokinlerin oluşumunu azaltmaktadırlar. İmmün baskılayıcı sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β), TH2 hücreleri ve enfekte makrofajlar tarafından oluşturulmaktadır. Böylelikle makrofajlar üzerine otokrin ve parakrin yoldan etki ederek RNI (Reaktif nitrojen ara ürünleri) ve ROI'lerin oluşumunu azaltarak makrofajın INF- γ ve TNF- α 'ya yanıtız hale gelmesine neden olmaktadır (Saenz ve ark., 2008).

2.6.5. İnterlökin 10 (IL-10)

IL-10 heterodimerik sitokinler ailesinin (IL-22, IL-27 gibi) bir üyesidir. IL-10 reseptörü ise tip 2 sitokin ailesinin bir üyesidir (İnterferonlarla benzer şekilde) ve 2 zincirden oluşur. JAK1 ve TYK2 (Tirozin Kinaz 2) Janus kinaz ailesiyle ilişkilidir ve STAT3'ü aktive ederek alternatif aktive makrofaj yolağını uyarmaktadır.

IL-10, TH1-TH2 hücreleri, regülatör T hücreleri, makrofajlar ve dentritik hücreler tarafından üretilmektedir. Makrofaj ve dentritik hücreler tarafından üretilen IL-10 bu hücrelerin fonksiyonlarını inhibe ettiği için negatif feed back inhibitör olarak fonksiyon göstermektedir.

IL-10'un biyolojik etkileri sonucunda aktive makrofaj ve dentritik hücrelerin birçok fonksiyonu inhibe edilmektedir. IL-10 bu hücreler tarafından üretilen IL-12'nin üretimini inhibe etmektedir. IL-10 intraselüler mikroorganizmalara karşı doğal ve kazanılmış bağışıklıkta önemli rolü olan IFN- γ sekresyonu için kritik bir uyarıcı olan IL-12'yi inhibe ettiği için tüm bu reaksiyonları süprese etmektedir.

IL-10 makrofaj ve dentritik hücrelerin üzerindeki sınıf II MHC molekülleri ve ko-stimulanlarının ekspresyonunu inhibe etmektedir. Bunun sonucunda IL-10, hücre aracılı bağışıklık reaksiyonlarını sonlandırmaktadır (Abbas ve ark., 2015).

2.6.6. İnterlökin 4 (IL-4)

IL-4, tip 1 sitokin ailesinin bir üyesidir ve TH2 alt grubunun ve fonksiyonlarının anahtar sitokinidir. IL-4, TH2 hücrelerinin hem indükleyici hem de efektör sitokinidir. IL-4 tip 1, dört- α -helikal sitokin ailesinin bir üyesidir. IL-4'ün esas hücre kaynakları TH2 alt grubunun CD4+ T lenfositleri ile aktive mast hücreleridir.

Lenfoid hücrelerin IL-4 reseptörü, bir sitokin bağımlı α zincirinden oluşmaktadır. Bu sitokin bağımlı α zinciri, tip 1 sitokin reseptör ailesinin bir üyesi olup diğer sitokin reseptörleri tarafından paylaşılmakta olan γc zinciri ile ilişkilidir. Bu IL-4R $\alpha\gamma c$ reseptörü; JAK1, JAK3 ve STAT6'yı da içeren bir JAK STAT yolağı ve IRS-2 (İnsulin reseptör substrat 2) adı verilen bir yolak ile bağlantılıdır. STAT6 proteini, IL-4'ün birçok fonksiyonunu sağlayan genlerin transkripsiyonunu indükler. IL-4 ayrıca IL-13 reseptörüne de bağlanmaktadır.

IL-4'ün fonksiyonları arasında; naif CD4⁺ prekürsörlerinden TH2 hücrelerinin farklılaşmasının sağlanması, B hücrelerinden IgE (İmmunoglobulin E) yapımının uyarılması ve IL-13 ile birlikte veya tek başına M2 tip alternatif makrofaj aktivasyonunu uyarılması ve IFN- γ bağımlı makrofaj fonksiyonlarının baskılanması sayılmaktadır (Abbas ve ark., 2007; Saenz ve ark., 2008; Harris ve ark., 2009).

2.6.7. İnterlökin 13 (IL-13)

IL-13 tip1 sitokin ailesinin bir üyesidir. Başlıca TH2 alt grupları tarafından üretilmekte, fakat bazofil, eozinofil ve NK hücreleri tarafından da üretilmektedir. IL-13 yapısal ve işlevsel olarak IL-4'e benzerdir ve helmintlere karşı savunmada ve alerjik reaksiyonlarda anahtar rol oynamaktadır. IL-13, IL-4 ile önemli yapısal benzerlikleri olan fakat sınırlı sekansta homolojisi olan tip 1 dört- α -helikal sitokin ailesinin bir üyesidir. Fonksiyonel IL-13 reseptörü IL-4R α zinciri ve IL-13R α 1 (IL-13 Receptor α 1) zincirinin bir heterodimeridir. Bu komplekse IL-13 ve IL-4 yüksek afiniteyle bağlanabilmekte ve ayrıca JAK1, JAK3 ve STAT6 yolakları aracılığı ile sinyal verebilmektedirler. Böylece M2 tip alternatif makrofaj aktivasyonu uyarılmakta ve doku tamiri ve fibrozi süreçlerine katılmaktadır. IL-13, helmintlere ve alerjik inflamasyona karşı savunmada da IL-4 ile birlikte çalışmaktadır (Abbas ve ark., 2015).

2.6.8. Transforming Growth Faktör Beta (TGF- β)

Başlıca Treg hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilmektedir. T hücrelerinin TH17 (T helper 17) ve Treg yönünde farklılaşmasına etki etmektedir, bunun yanında T hücrelerinin çoğalması ve efektör fonksiyonlarının baskılanması, B lenfositlerin çoğalmasını baskılanması, fibroblastlar üzerine kollajen sentezini artırıcı etki, makrofajları M2 tip alternatif aktivasyon yönünde uyarılması başlıca fonksiyonlarıdır. Ayrıca anjiogenik faktörleri stimüle etmektedir. TGF- β 1, TGF- β 2 (TGF- β Reseptör 2), TGF- β 3 (TGF- β Reseptör 3) olmak üzere 3 reseptör üzerinden etki etmektedir. TGF- β 2 aracılığıyla, TGF- β 1 reseptörünün aktivasyonuna TGF- β sinyalinin başlamasına neden olmaktadır. Aktive olan TGF- β 1, hücre nükleusuna sinyal taşıyan SMAD proteinlerini fosforile ve aktive etmektedir (Abbas ve ark., 2015).

2.7. U-937 ve THP-1 Hücreleri

Kendi kendine replike olan insan makrofaj hücre hattı halen yoktur. İki adet insan makrofaj hücre yolağı tanımlanmıştır. Bunlar 2MAC ve K1m'dir. Bu iki hücre hattı periferik kan hastalığı olmayan bireylerden spontan olarak elde edilmiştir. Ancak büyümeleri için T hücresi büyüme faktörü içeren conditioned medium gerekmektedir

(Dialynas ve ark., 1997; Lee ve ark., 1997). K1m medyum oluşturmak için kullanılan periferik kan lökositlerinin kaynağına bağlı olarak K1m hücre hattı çoğalmasında çeşitlilik gösterebilmektedir (Lee ve ark., 1997). Bu her iki makrofajın kan donörü tarafından primer izolasyonu zordur veya izolasyon için bronkoskopi ve doku biyopsisi gibi invaziv girişim gerektirmektedir. Bu sebeplerden dolayı bu hücre yolları günümüz çalışmalarında sık kullanılmamaktadır.

Araştırmacılar, hücre kültüründe makrofaj benzeri fonksiyonları çalışmak amacıyla insan U-937 veya THP-1 monosit hücre hatları kullanmıştır (Dockrell ve ark., 2010). U-937 hücreleri 37 yaşındaki histiyositik lenfomalı bir erkek hastanın plevral efüzyonundan elde edilmiş insan hemapoetik hücre hattıdır. U-937 hücreleri immatür monositlerin özelliklerini sergilemektedir. U-937 hücreleri lizozim üretir, yüzey immünglobulini veya immünglobulin sekresyonu yapmamaktadırlar. U-937 hücreleri küçük, ovoid şekillidir ve hücre morfolojisinde hemen hemen hiç çeşitlilik yoktur, nükleusları geniş ve düzensiz şekillidir (Sundstrom ve Nilsson, 1976). U-937 hücreleri, hematopoetik kanserli hastalarda hücre davranışı konusundaki çalışmalarda in vitro model olarak geniş ölçüde kullanılmıştır (Minafra ve ark., 2011). U-937 hücreleri makrofaj ailesine dönüştürüldüğünde insanlardaki makrofajlara benzer özellikler göstermektedirler.

PMA, bir forbol esteridir ve monositleri makrofajlara çevirmek için kullanılmaktadır. PMA reaktifi eklenmesiyle, serbest halde bulunan (non-adherent) U-937 hücreleri flask yüzeyine bağlanıp farklılaşmak için kendi hücre adezyon moleküllerini upregüle etmektedirler (Abbro ve ark., 2005). PMA ile muamele edilen U937 hücreleri yüksek oranda CD11b ve PKC (Protein kinaz C) eksprese etmektedirler. PMA eklenmesinden sonra beta-2 integrinler (CD11a,CD11c, CD18 ve CD11b) monositlerin flask yüzeyine bağlanmasını sağlamaktadır. PMA daha sonra; kalsiyum ve PKC'nin fosfolipid bağımlı izoformlarını aktive eder ve cAMP metabolizmasını uyarmaktadır. Bu uyarı da monositlerin makrofaj benzeri morfoloji yönünde maturasyonunu sağlamaktadır.

THP-1 hücre hattı ise, akut monositik lösemili 1 yaşındaki Japon erkek hastadan Tsuchiya ve arkadaşları tarafından elde edilmiştir (Tsuchiya ve ark., 1980). THP-1 hücre hattı ışık mikroskopisinde yuvarlak, büyük, soliter hücreler şeklinde

görülmektedir. Salgılanma ürünleri, membran antijenlerinin ekspresyonu, onkogenik ekspresyon, lipid metabolizması gibi birçok kritere göre morfolojik olarak insan makrofajına benzemektedir. Doğal İnsan makrofajlarının aksine, THP-1 gibi homojen popülasyona sahip bir hücre hattı olması ileri biyokimyasal çalışmalar açısından kolaylık sağlamaktadır. PMA'nın etkisiyle çoğalmaları durmakta ve makrofaj benzeri hücrelere diferansiye olmaktadır.

THP-1 hücre farklılaşmasıyla hücre morfolojisi dramatik bir değişikliğe uğramaktadır. Bu farklılaşma sürecinin başlamasından sonra, hücreler çeşitli şekillere sahip olmakta ve nükleusları daha düzensiz hale gelmektedir, stoplazmalarında birçok fagositik vakuoller tanımlanmaktadır. Bu farklılaşma süreci aynı zamanda doku kültür flaskına yapışmanın artışıyla da ilişkilidir (Auwerx ve ark., 1990).

3. MATERYAL – METOT

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Santrifüj (MSE, MISTRAL 3000I, seri no: 5691/02/075, U.K.)
2. Santrifüj (Jouan, C4i, seri no: 30411037, France)
3. Mikropipetler (Eppendorf 20, 100, 200, 1000, Germany).
4. Mikrosantrifüj (SIGMA 3K30, seri no: 76262, USA)
5. Mikrosantrifüj (Jouan A-14, seri no: 39903105, France)
6. 1,5 ml nükleaz içermeyen eppendorf (Cat No.616201 Grenier Bio-one, USA)
7. 0,2 ml PCR tüp (Cat No.683201 Grenier Bio-one, USA)
8. Derin dondurucu -70°C, (NUAIRE, Seri no: 9394248, USA)
9. Derin dondurucu -80°C, (NUAIRE, Seri no: Z17N-205195-ZN, USA)
10. Benmari (ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N seri: 3940517, Jouan, France)
11. Benmari (Termal Lab. Aletleri, seri no: 821911, Türkiye)
12. Vorteks VM3, (Windaus, 3392, Germany)
13. LightCycler 480 II, (seri no: 28218, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
14. BD FACSCanto II, (seri no: V87500089, BD (Becton, Dickinson and Company) Biosciences,USA)
15. Laminar-flow (Nuair, Model no: Nu-425-400E, seri no: 116026070307, USA)
16. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, (04729692001 white, lot: 09016400, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)Ultrasonic Cleaner, (seri no: 030607, Germany)
17. Ultrasonic Cleaner, (seri no: 030604, Germany)

18. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, seri no: 300258, Japan)
19. Cellstar Tissue Culture Flask (25 cm²) kırmızı kapak (Cat No.690175 Grenier bio-one, Austria)
20. Cellstar Tissue Culture Flask (75 cm²) red filter cap, steril (Cat No.658175 Greiner bio-one)
21. 10 µl (cat. no. 765288), 20 µl (cat. no.774288) 100 µl (cat. no.772288), 200 µl, 1000 µl (cat. no.740288) pipet uçları, steril, (Grenier bio-one, Austria)
22. Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)
23. CO₂ inkübatör, (Sanyo MCO-17AIC, seri no: 00605796, Japan)
24. İvert mikroskop, (Nikon eclipse TS100, seri no: 0101743, Japan)
25. pH metre, (Microprocessor pH meter, EDT Instruments RE 357, 702 U.K.)
26. 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
27. Pasteur pipet (LP Italiana SPA Milano, Italy)
28. 2 ml'lik kriyo tüp (greiner bio-one, LOT: 084901-94)
29. 1,5 ml'lik vial (Corning 430909, polypropylene, steril)
30. 50 ml'lik falkon tüp (Corning 430291, RNase/DNase free, polypropylene, steril)
31. 15 ml'lik falkon tüp (Corning 430766, RNase/DNase free, polypropylene, steril)

3.2. Kullanılan Kimyasallar

1. RPMI 1640 Medium, with L-Glutamin, with HEPES 25 mM 500 ml, (Cat. 01-106-1A, Biological Industries İsrail)
2. Fetal Bovine Serum(FBS), Sterile filtered, (Cat No: 3301-P2711601 Pan Biotech, South America)

3. Tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin, %0.02 EDTA) (Cat No; 03052-1B Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, ISRAEL)
4. 10.000 Ü. Penisilin/10 mg (miligram) Streptomisin 100X (Cat No; P0781, 100 ml, Sigma-Aldrich, USA)
5. 100 mM Sodium Pyruvate Solution (REF: 03-042-1B, 100 ml, Biological Industries)
6. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Cat. No: 802912, Germany)
7. Phosphat Buffer Salin (PBS), 10 mM, pH 7.4
 - NaCl, 136 mM (Merck, Cat. No: 6400) MW: 58,44 Germany)
 - KCl, 2.7 mM (Merck, Cat. No: 4935) MW: 74,56 Germany)
 - Na₂HPO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 6586) MW: 141,96 Germany)
 - KH₂PO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 4871) MW: 136,09 Germany)
8. pH 4, pH 7, pH 10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5, GmBh)
9. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), >%99
(abcam,ab120297,MW:616,83)
10. Lipopolisakkarides, Cell culture tested, γ -irradiated, from E.Coli 0111:B4 Powder (L-4391-1 MG, Sigma Aldrich)
11. İnterferon- γ (IFN- γ) (abcam, ab198566, 100 μ g)
12. İnterlökin-4 (IL-4) , >%98, MW:15 kDa (abcam, ab179620, 20 μ g, lyophilised)
13. İnterlökin-10 (IL-10), >%97, MW:17 kDa (abcam, ab187204, 10 μ g ,lyophilised)
14. İnterlökin-13 (IL-13), >%95, MW:13 kDa (abcam, ab191668, 10 μ g, lyophilised)
15. TGF- β (abcam, ab50036, 10 μ g lyophilised)

16. TNF- α -EASIA (Ref: KAP1751, Lot:152101, DIAsource ImmunoAssays S.A., Belgium)
17. Human IL-10 ELISA Research Regant (code:EK0416, SIZE 96T, Lot No.1361154708, Boster Biological Technology, Pleasanton CA, USA)
18. Human IL-12 (p70) ELISA Research Regant (code:EK0421, SIZE 96T, Lot No.1411167624, Boster Biological Technology, Pleasanton CA, USA)
19. High-pure RNA isolation kit (Cat. No.11 828 665 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
20. Transcriptor first strand complementary DNA (cDNA) synthesis kit (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
21. LightCycler 480 Probe Master (04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
22. Human Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) forward-reverse (19/19 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL60, Cat No.04688589001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
23. Human SIK1 forward-reverse (21/18) primer çifti-LNA Taqman probe seti (UPL77, Cat No. 04689003001 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)
24. Human SIK2 forward reverse (20/20) primer çifti- LNA Taqman probe seti UPL18 Cat No. 04686918001 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)
25. Human SIK3 forward-reverse (20/20) primer çifti-LNA Taqman probe seti (UPL36, Cat No. 04687949001 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)

3.3. U-937 ve THP-1 Hücre Kültürü

3.3.1. Hücre Kültür Solüsyonları

Çalışmamızda kullandığımız U-937 (Pasaj 18) hücreleri, Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden Prof. Dr. Hüveyda Başağa'dan, Pasaj 45 THP-1 hücreleri ise, Yeditepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden Doktora öğrencisi Ezgi İrem Bektaş tarafından temin edilmiştir.

U-937 ve THP-1 hücrelerine aynı hücre kültürü solüsyonları uygulandı.

RPMI 1640 Medyum

- Biological Industries ISRAEL Beit Haemek LTD.
- REF: 01-106-1A
- Lot: 1550636
- L-Glutamin ile 25 mM HEPES içerir
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

Fetal Bovin Serum (FBS)

- Pan Biotech, 100 ml, South America
- Katalog No: 3301-P2711601
- Steril filtre edilmiş
- 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alıktlandı ve 56 °C'de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi.
- -80 °C'de saklandı.

L- Na-pürivat, 100 mM

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Cat no: 03-042-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 2'şer ml alıktlanarak -80 °C'de saklandı.

Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03052-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml alıktlanarak -80 °C'de saklandı.

10.000 U Penisilin/10 mg Streptomisin

- Biological Industries 20 ml, ISRAEL Beit Haemek LTD.
- REF: 03-031-1C
- LOT: 1531284
- 1,5 ml'lik viallere 1'er ml olacak şekilde alikotlanarak -80 °C'ye kaldırıldı.

Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM pH;7,4 1 L

PBS solüsyonu hazırlığında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo I'de verilmiştir.

Tablo II. PBS solüsyon hazırlığı.

Madde	Miktar	Firma
NaCl 136 mM	8 g	Merck, cat. no.6400, S-12, Germany
KCl 2,7 mM	0,2 g	Merck, cat. no 4935, P-11, Germany
Na ₂ HPO ₄ , 10 mM	1,44 g	Merck, cat. no 6586, S-7a, Germany
KH ₂ PO ₄ , 2 mM	0,24 g	Merck, A997671 851, P-3, Germany
dH ₂ O (distile su)	800 ml	

- 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ tartılarak 800 ml dH₂O ile çözünmesi sağlandı.
- pH 7,4'e ayarlanarak dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.
- 0.22 µm'lik filtre ile filtre edildi. Otoklavda sterilizasyonu yapıldı ve 2-8°C'de saklandı.

Komplet Medyum (KM) Hazırlığı

- FBS, -80 °C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlandı.
- Penisilin/streptomisin stok solüsyonu, -80 °C'den oda ısısına alınarak çözüldü.
- Na-Pürivat, 100 mM, -80 °C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlandı.

- 40 ml RPMI 1640 KM hazırlanması için Tablo II'deki miktarlardaki solüsyonlar laminer flow kabininde steril şartlara dikkat edilerek karıştırıldı.
- 0,22 µm'lik filtre ile steril 50 ml'lik falkon tüpe konuldu ve ışıktan koruyarak 2-8 °C'de saklandı.

RPMI 1640 KM hazırlığında kullanılan kimyasallar ve volümleri Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II. RPMI 1640 KM hazırlığı

Madde	Volüm	Final konsantrasyon
FBS	4 ml	% 10
Penisilin/Streptomisin, 100x	400 µl	% 1 (1x)
Na-Pürivat, 100 Mm	400 µl	% 1 (1 mM)
RPMI 1640 medyum	35200 µl	

- Belirtilen miktarlar steril 50 ml'lik falkon tüpe pipetlendi ve 0,22 µm'lik filtre ile filtre edildi.

RPMI 1640 Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- RPMI 1640 KM benmaride 37 °C sıcaklığa getirildi.
- Freeze-medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanıldı.
- Taze hazırlandı.

RPMI 1640 Freeze-Medyum hazırlığında kullanılan kimyasallar, kimyasalların volümleri ve final konsantrasyonu Tablo III'de verilmiştir.

Tablo III. Freeze medyum

	Volüm	Final konsantrasyonu
RPMI 1640 KM	9 ml	% 90
DMSO	1 ml	% 10

3.3.2. U-937 Hücre Kültür Protokolleri

-196 °C Sıvı Azotta Dondurularak Saklanan Hücrelerin Çözülmesi

- -196 °C sıvı azottan çıkarılan vialdeki hücreler benmaride 37 °C'de hızla çözüldü. 3 ml RPMI-1640 komplet medyum eklenip 200 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Üzerine yaklaşık 2 ml komplet RPMI 1640 medyum eklenip, karıştırıldı.
- Hücreler pasteur pipeti ile 25 cm² flask'a pipetlendi ve üzerine RPMI 1640 KM eklenerek 5 ml'ye tamamlandı.
- CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

U-937 Hücrelerinin Pasajlanması

- Flasktaki hücreler 2x10⁶ hücre/ml olduğunda pasajlama yapıldı.
- Flasktaki RPMI 1640 KM-hücre karışımı 15ml'lik falkon tüpe alındı.
- 200 xg'de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak 4 ml RPMI 1640 KM ile resüspanse edildi.
- 4 flaska ~1'er ml dağıtıldı ve RPMI 1640 KM ile 5 ml'ye tamamlandı.
- CO₂ inkübatöre alındı.
- 2x10⁶ hücre/ml'nin üstüne çıkmayacak ve 4x10⁵ hücre/ml'nin altına düşmeyecek şekilde 2 günde 1 medyum ilave edildi.

U-937 hücrelerinin dondurulması

- 25 cm²'lik flasktaki U-937 hücreleri 2x10⁶ hücre/ml olduklarında 15ml'lik falkon tüpe alındı.
- 200 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atılıp üzerine 3 ml RPMI 1640 Freeze-Mediyum eklendi. Al-ver yapılarak homojenite sağlandı ve 3 tane 2 ml'lik kriyo tüpe bölündü.
- 5 dakika buz üzerinde bekletilip, ardından 2 saat -20°C 'de bekletildi. Ardından ise sıvı azota kaldırıldı.

3.3.3. THP-1 Hücre Kültür Protokolleri

-196 $^{\circ}\text{C}$ Sıvı Azotta Dondurularak Saklanan Hücrelerin Çözülmesi

- -196°C sıvı azottan çıkarılan vialdeki hücreler benmaride 37°C 'de hızla çözüldü. 3 ml RPMI-1640 komplet medyum eklenip 200 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Üzerine yaklaşık 2 ml komplet RPMI 1640 medyum eklenip, karıştırıldı.
- Hücreler pasteur pipeti ile 25 cm^2 flask'a pipetlendi ve üzerine RPMI 1640 KM eklenerek 5 ml'ye tamamlandı.
- CO_2 inkübatörüne kaldırıldı.

THP-1 Hücrelerinin Pasajlanması

- Flasktaki hücreler 8×10^5 hücre/ml olduğunda pasajlama yapıldı.
- Flasktaki RPMI 1640 KM-hücre karışımı 15ml'lik falkon tüpe alındı.
- 200 xg'de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak 4 ml RPMI 1640 KM ile resüspanse edildi.
- 4 flaska ~ 1 'er ml dağıtıldı ve RPMI 1640 KM ile 5 ml'ye tamamlandı.
- CO_2 inkübatöre alındı.
- 8×10^5 hücre/ml'nin üstüne çıkmayacak şekilde 2 günde 1 medyum değişimi yapıldı.

THP-1 hücrelerinin dondurulması

- 25 cm²'lik flastaki THP-1 hücreleri 8x10⁵ hücre/ml olduklarında 15ml'lik falkon tüpe alındı.
- 200 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp üzerine 3 ml RPMI 1640 Freeze-Medyum eklendi. Al-ver yapılarak homojenite sağlandı ve 3 tane 2 ml'lik kriyo tüpe bölündü.
- 5 dakika buz üzerinde bekletilip, ardından 2 saat -20 °C'de bekletildi. Ardından ise sıvı azota kaldırıldı.

U-937 ve THP-1 hücre kültüründe dikkat edilmesi gereken hususlar

- U-937 hücre konsantrasyonu 2x10⁶ hücre/ml'yi, THP-1 hücre konsantrasyonu 8x10⁵ hücre/ml geçmeyecek şekilde medyum ilavesi yapılmalıdır.
- Ayrıca, hücre konsantrasyonu çok düşük tutulmamalıdır (4x10⁵ hücre/ml'nin altında olmamalıdır).
- %0,4'lük Tripan mavisiyle (1/1 dilüsyon ile) boyanıp boyanmayan hücreler thoma lamında sayılarak hücre konsantrasyonu ve canlılık oranı değerlendirilebilir.
- Hücrelerin çoğalmasıyla ilgili bir sıkıntı yaşanması durumunda kullanılan FBS gözden geçirilmelidir.

3.4. Çalışmanın Yapılması

U-937 (pasaj 19) ve THP-1 (pasaj 46) hücrelerine ortak çalışma protokolü uygulandı.

3.4.1. U-937 ve THP-1 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

- U-937 (pasaj 19) ve THP-1 (pasaj 46) hücreleri 75 cm²'lik flastlarda çoğaltıldı.

- 75 cm²'lik flastaki RPMI-1640 KM-hücre süspaniyonu 15 ml'lik falkon tüplere pastör pipetiyle alındı.
- 200 xg'de, oda ısısında, 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak 8 ml RPMI 1640 KM ile resüspanse edildi.
- Yavaşça al-ver yapılarak hücrelerin eşit dağılımını sağlandı.
- Hücreler %0,4'lük Tripan mavisiyle boyanıp thoma lamında sayıldı ve 8 ayrı 25 cm²'lik flaska her flastta 5 mL RPMI 1640 KM içinde 2,5 x10⁶ hücre olacak şekilde dağıtıldı.

3.4.2 U-937 ve THP-1 hücrelerinin makrofaja (M0) diferansiye edilmesi

- 64 µM PMA solüsyonundan 15 µl alınıp, 135 µl RPMI-1640 KM içine eklenerek 6,4 µM konsantrasyonunda ara dilüsyon yapıldı.
- 6,4 µM PMA'dan da 12,5'er µl (10 ng/ml, 16 nM) alınıp tüm flastlara eklendi.
- Tüm flastlar yatay bir şekilde 37 °C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından medyum boşaltılarak RPMI 1640 KM ile 2 kez yıkandı.
- Tüm flastlara 5 ml RPMI 1640 KM eklendi.
- 37 °C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat inkübe edildi (Dinlenme fazı).

3.4.3. Çalışma gruplarının oluşturulması

Çalışma grupları Tablo IV’de verilmiştir.

Tablo IV. Çalışma grupları

Flask	Uygulanan Madde
1.Flask	Kontrol (RPMI-1640 komplet medyum)
2.Flask	Kontrol (RPMI-1640 komplet medyum)
3.Flask	10 ng/ml LPS
4.Flask	10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN- γ
5.Flask	20 ng/ml IL-4
6.Flask	20 ng/ml IL-4+20 ng/ml IL-13
7.Flask	20 ng/ml IL-10
8.Flask	10 ng/ml TGF- β

3.4.4. M1 ve M2 polarize edici kimyasalların hazırlanması ve uygulanması

- 48. saatin sonunda tüm flasklardaki medyumlar uzaklaştırıldı.
- Aşağıda açıklandığı şekilde polarize edici kimyasallar uygulandı.

1. ve 2. flaska: 5ml RPMI-1640 KM eklendi.

3. flaska: 50 ng/ μ l LPS solüsyonundan 5 μ l alınıp 45 μ l RPMI-1640 KM içine eklenerek 5 ng/ μ l LPS elde edildi. 5 ng/ μ l LPS’den de 10 μ l alınıp 5 ml RPMI-1640 KM içerisine eklendiğinde 10 ng/ml LPS içeren KM elde edildi.

4. flaska: 100 μ g/ml IFN- γ solüsyonundan 20 μ l alınıp 80 μ l RPMI-1640 KM eklenerek 20 μ g/ml (20 ng/ μ l) IFN- γ elde edildi. 20 ng/ μ l IFN- γ solüsyonundan da 5 μ l alınıp 5 ml RPMI-1640 KM içerisine eklendi. 50 ng/ μ l LPS stok solüsyonundan 5 μ l alınıp 45 μ l RPMI-1640 KM içine eklenerek 5 ng/ μ l LPS elde edildi. 5 ng/ μ l LPS’den de 10 μ l alınıp 20 ng/ml IFN- γ içeren KM içerisine eklendi.

5. flaska: 100 μ g/ml IL-4 solüsyonundan 5 μ l alınıp 20 μ l RPMI 1640 KM eklenerek 20 ng/ μ l IL-4 elde edildi. 20 ng/ μ l IL-4 solüsyonundan 5 μ l alınıp 5 ml RPMI-1640 KM içerisine eklendi.

6. flaska: 100 μ g/ml IL-13 solüsyonundan 5 μ l alınıp 20 μ l RPMI 1640 KM eklenerek 20 ng/ μ l IL-13 elde edildi. 100 μ g/ml IL-4 stok solüsyonundan 5 μ l alınıp 20

μ l RPMI 1640 KM eklendi ve 20 ng/ μ l IL-4 elde edildi. 20 ng/ μ l IL-4 solüsyonundan 5 μ l alınıp 20 ng/ μ l IL-13 içeren KM içerisine eklendi.

7. flaska: 100 μ g/ml IL-10 solüsyonundan 5 μ l alınıp 20 μ l RPMI 1640 KM eklenerek 20 ng/ μ l IL-10 elde edildi. 20 ng/ μ l IL-10 solüsyonundan 5 μ l alınıp 5 ml RPMI-1640 KM içerisine eklendi.

8. flaska: 10 μ g/ml TGF- β solüsyonundan 5 μ l alınıp 5 ml RPMI-1640 KM içerisine eklendi.

3.4.5. Süpernatantların elde edilmesi

- 24. saat sonunda tüm flaskaların süpernatantı 15 ml'lik falkonlarda toplandı.
- 1000 xg'de, oda ısısında 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantlardan 1,5 ml'lik 2 ayrı ependorf tüpe 1'er ml alındı.
- ELİSA çalışmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.5. Flow sitometri analizi

- CD 11b ve CD14 diferansiye makrofajlar (M0) tarafından eksprese edilmektedir (182). Bu sebeple çalışmamızda PMA ile oluşturulan diferansiyasyon flow sitometride CD 11b ve CD14 analizi yapılarak belirlenmiştir.
- Bunun için:
- Süpernatantı alınan birinci flaska pasteur pipeti ile ~2-3 ml 37 °C'ye ısıtılmış steril PBS alınarak flaska aktarıldı ve bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
- Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar tripsin-EDTA flaska ilave edildi.
- Flask 15 dakika CO₂ inkübatörde bekletildi.
- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile tripsin-EDTA'nın üzerine ~1 ml RPMI 1640 komplet medyum ilave edildi ve karıştırıldı.

- Hücre medyum karışımı 2 ml'lik eppendorfa alındı.
- Eppendorf 600 g' de 5 dakika santrifuj edildi.
- Süpernatant atılarak hücreler 1 ml RPMI 1640 KM ile resüspanse edildi ve BD FACSCanto II cihazıyla flow sitometrik analiz yapılarak CD14+ ve CD11b+ makrofajlar belirlendi.

3.6. U-937 ve THP-1 Hücrelerinden RNA izolasyonu

High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak birinci flask hariç tüm flasklardaki hücrelerden tablo V'de verilen RNA izolasyon protokolüne göre RNA izolatları elde edildi.

Tablo V. RNA izolasyon protokolü

1.	Flasklardaki medyum pasteur pipet ile tabana değmeden uzaklaştırılır.
2.	Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml 37 °C'ye ısıtılmış steril PBS alınarak flaska aktarılır ve 1 kez yıkanır. PBS uzaklaştırılır.
3.	Pasteur pipeti ile flaskı kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaska ilave edilir
4.	Flask 3 dakika CO ₂ inkübatörde bekletilir.
5.	Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA'nın üzerine ~ 1 ml RPMI 1640 komplet medyum ilave edilir ve karıştırılır.
6.	Hücre medyum karışımı 2 ml'lik eppendorfa alınır.
7.	Eppendorflar 600 g' de 5 dakika 8 °C'de santrifuj edilir.
8.	Süpernatant atılır.
9.	Hücreler, 200 µl PBS ile resüspanse edilir.
10.	Lysis/-Binding Buffer'dan 400 µl (yeşil kapak) eklenir ve 15 s. vortekslenir.
11.	Numuneyi High Pure filtreli tüpe transfer etmek için: <ul style="list-style-type: none"> • High filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir. • Numunenin tamamı filtreli tüpe pipetlenir (maksimum 700 µl).
12.	<ul style="list-style-type: none"> • Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm'de santrifuj edilir.
13.	Santrifuj sonrası: <ul style="list-style-type: none"> • Toplayıcı tüpten artık uzaklaştırılır ve filtreli tüp tekrar yerleştirilir.
14.	Filtreli tüp yerleştirildikten sonra: <ul style="list-style-type: none"> • Steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer

	<p>(beyaz kapak) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırılır. Solüsyon filtrelü tüpe transfer edilir.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 15 dakika, +15 +25°C’de inkübe edilir.
15.	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrelü tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edilir. • Artık uzaklaştırılır ve filtrelü tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
16.	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrelü tüpe 500 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edilir. • Artık uzaklaştırılır ve filtrelü tüp toplayıcı tüpe yerleştirilir.
17.	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrelü tüpe 200 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlenir ve oda sıcaklığında 2 dakika maksimum hızda (~14000 rpm) santrifüj edilerek gerideki Wash buffer’ın uzaklaşması sağlanır. ✓ Ekstra santrifügasyon ile rezidü wash bufferın uzaklaşması sağlanır.
18.	<ul style="list-style-type: none"> • Toplayıcı tüp atılarak filtrelü tüp temiz, steril 1,5 ml’lik mikro-santrifüj tüpüne yerleştirilir.
19.	<p>RNA’yı elüe etmek için:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Filtrelü tüpe 100 µl Elution Buffer pipetlenir. • Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm’de santrifüj edilir.
20.	<ul style="list-style-type: none"> • Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA’dır. • Elüe RNA direk Real Time-PCR (Polymerase Chain Reaction) için kullanılır ya da –80°C’de daha sonra analiz edilmek üzere saklanır.

RNA izolasyon çalışmasında kullanılan solüsyonların hazırlığı Tablo VI’da verilmiştir.

Tablo VI. RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı

İçerik	Rekonstitüsyon/Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1	DNase I, 0,55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır ve –15 –25 °C’de saklanır.12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için
Wash Buffer 1	20 ml absölüt etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır.	15 –25 °C’de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.
Wash Buffer II	40 ml absölü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15–25 °C’de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

3.7. RNA izolatlarından cDNA sentezi

Transcriptor first strand cDNA synthesis kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak Thermal Cycler cihazında Tablo VII’de gösterilen protokol ile cDNA sentezi yapıldı.

Her bir RNA izolatından Revers Transkriptaz ile 1’er tane cDNA elde edildi.

Tablo VII. cDNA sentez protokolü

Thermal Cycler’da cDNA sentez Protokolü																							
1.	<ul style="list-style-type: none">• Kullanmadan önce tüm reaktifler çözölmelidir.• Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edilmelidir.• Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutulmalıdır.																						
2.	<ul style="list-style-type: none">• Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan steril, nuclease-free, thin-walled PCR tüpte, aşağıdaki sırada pipetleme yapılarak template-primer karışımı reaksiyon başına 50 µl olacak şekilde hazırlanır.<ul style="list-style-type: none">➤ RNA numunesine daima eldiven ile temas edilmelidir. <p>Template-primer miks (1 reaksiyon için)</p> <p>Her bir örnek için kullanılan total RNA ve PCR-grade distile su miktarları final konsantrasyonu 1 µg total RNA olacak şekilde düzenlenir.</p> <table border="1"><thead><tr><th></th><th>Komponent</th><th>Hacim</th><th>Final konsantrasyonu</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>PCR-grade distile su</td><td>25 µl</td><td>Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl</td></tr><tr><td>2</td><td>Total RNA</td><td>5 µl</td><td>1 µg total RNA</td></tr><tr><td>3</td><td>Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl</td><td>2,5 µl</td><td>2,5 µM</td></tr><tr><td></td><td>Total Hacim</td><td>32,5 µl</td><td></td></tr></tbody></table>		Komponent	Hacim	Final konsantrasyonu	1	PCR-grade distile su	25 µl	Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl	2	Total RNA	5 µl	1 µg total RNA	3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µM		Total Hacim	32,5 µl			
	Komponent	Hacim	Final konsantrasyonu																				
1	PCR-grade distile su	25 µl	Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl																				
2	Total RNA	5 µl	1 µg total RNA																				
3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µM																				
	Total Hacim	32,5 µl																					
3.	<ul style="list-style-type: none">• Template-primer karışımı içeren tüp 10 dakika 65 °C’de termal cycler cihazında tutularak denatürasyon sağlanır.• Bu basamak RNA sekonder yapısının denaturasyonunu sağlar.• Bu amaçla GeneAmp 9700 Thermal Cycler, ‘cdna1’ programı kullanıldı.• Tüp daha sonra acele olarak soğutulmuş alüminyum bloğa alınır																						

4.	Template-primer karışımını içeren tüpe sırasıyla aşağıdaki maddeler pipetlenir.																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Komponent</th> <th>Hacim (1 reaksiyonluk)</th> <th>Final kons.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.</td> <td>10 µl</td> <td>1×(8mM MgCl₂)</td> </tr> <tr> <td>Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl</td> <td>1,25 µl</td> <td>20 U</td> </tr> <tr> <td>Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri</td> <td>5 µl</td> <td>1 mM her biri</td> </tr> <tr> <td>Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl</td> <td>1,25 µl</td> <td>10 U (reaks başına)</td> </tr> <tr> <td>Total Hacim</td> <td>17,5 µl</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Final Hacim</td> <td>50 µl</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.	Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.	10 µl	1×(8mM MgCl ₂)	Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U	Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri	Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)	Total Hacim	17,5 µl		Final Hacim	50 µl	
Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.																				
Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.	10 µl	1×(8mM MgCl ₂)																				
Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U																				
Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri																				
Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)																				
Total Hacim	17,5 µl																					
Final Hacim	50 µl																					
5.	<ul style="list-style-type: none"> Tüpteki reaktifler iyice karıştırılır. Vorteks yapılmamalıdır! Tüp termal Cycler cihazına yerleştirilir. 																					
6.	<ul style="list-style-type: none"> 60 dakika, 50°C’de inkübasyona bırakılır. Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüp, 85°C’de 5 dakika bekletilir. GeneAmp 9700 Thermal Cycler cihazında ‘cdna-oligo-trans’ programı kullanıldı. 																					
7.	<ul style="list-style-type: none"> Tüp buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulur. Bu noktada reaksiyon tüpü +2 +8°C’de 1-2 saat ya da -15 -25°C’de daha uzun süre saklanabilir. 																					
8.	<ul style="list-style-type: none"> cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanılabilir. PCR için bir LightCycler® aleti için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2–5 µl cDNA kullanılmalıdır. 																					

3.8. Real Time Q-PCR ile gen ekspresyon analizi

Housekeeping gen olarak GAPDH genini kullanarak SIK1, SIK2 ve SIK3 mRNA ekspresyon düzeylerini belirledik.

3.8.1. Biyoinformatik analiz

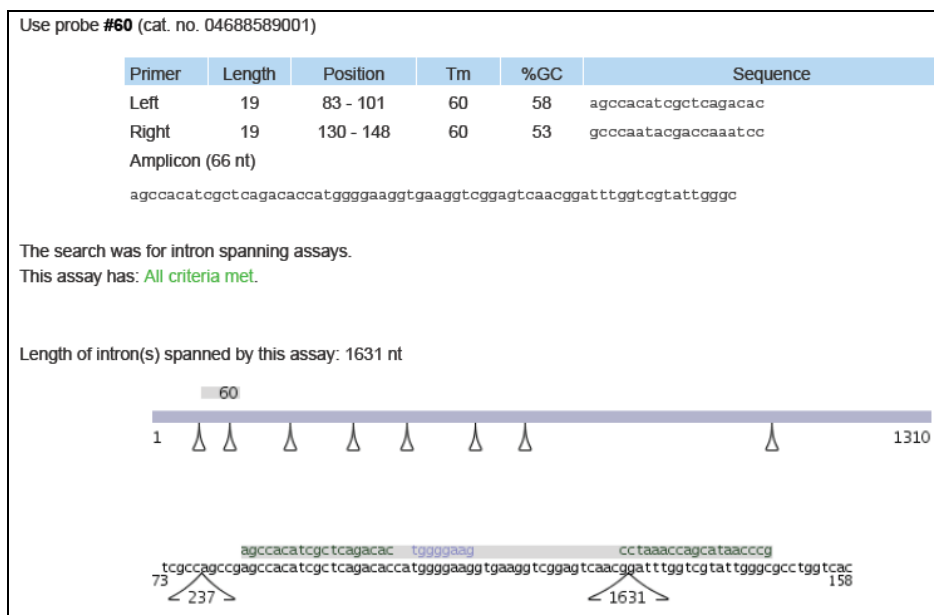
İyi düzenlenmiş primerler ve probalar doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlamakta ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilmektedirler. Primer ve problemlerin düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

- Tm dereceleri, primer için 58-60 °C, prob için 68-70 °C olmalı.
- G(Guanin)-C(Sitozin) içerikleri % 30-80 aralığında olmalı.
- Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı.
- Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
- Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp(base pair)'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
- Problar ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G).
- Problardaki %30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı.
- Probların 5' ucunda G olmamalı

Çalışmada Referans gen olarak Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. GAPDH ekspresyonunun belirlenmesi için primer-prob dizaynı, Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak yapıldı. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

(NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Aşağıdaki şekillerde primer-prop dizaynları görülmektedir (Şekil 8,9,10,11).

GAPDH Primer-Prob Dizaynı



Şekil 8. GAPDH primer-prob dizaynı (GAPDH UPL prob 60:tggggaag)

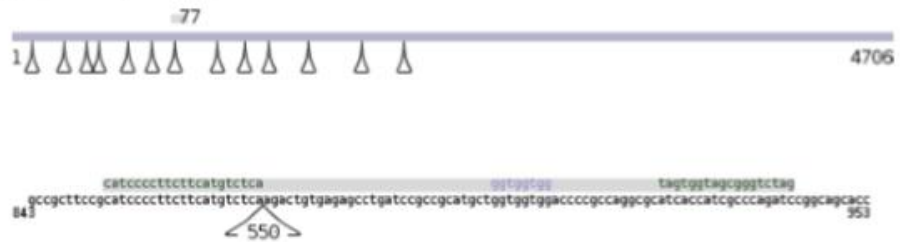
SIK1 Primer-Prob Dizaynı

Use probe #77 (cat. no. 04689003001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	853 - 873	60	48	catcccccttcttcgatgtctca
Right	18	926 - 943	59	56	gatctggggcgatgggtgat
Amplicon (91 nt)					
catcccccttcttcgatgtctcaagactgtgagagcctgatccgccgatgctgggtgggacccccgccaggcgcacaccatcgcccagatcc					

The search was for intron spanning assays.
This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 550 nt



Şekil 9. SIK1 primer-prob dizaynı (SIK1 UPL prob 77)

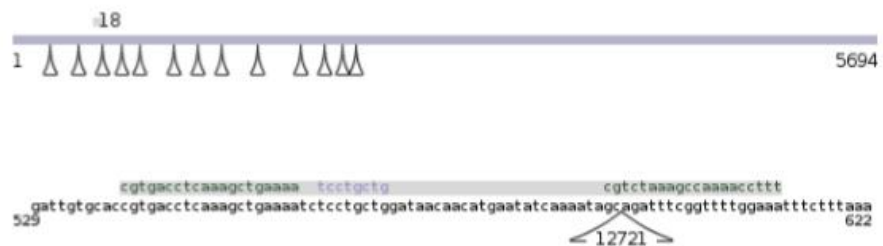
SIK2 Primer-Prob Dizaynı

Use probe #18 (cat. no. 04686918001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	539 - 558	59	45	cgtgacctcaaaagctgaaaa
Right	20	593 - 612	60	40	tttccaaaaaccgaaatctgc
Amplicon (74 nt)					
cgtgacctcaaaagctgaaaaatctcctgctggataaacaacatgaatatcaaaatagcagatttcggttttgaaa					

The search was for intron spanning assays.
This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 12721 nt



Şekil 10. SIK2 primer-prob dizaynı (SIK2 UPL prob 18: cagcagga)

Use Universal ProbeLibrary probe: #36, cat.no. 04687949001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	20	1610 - 1629	60	60	cagttaccacctgtggacgag
Right Primer	20	1686 - 1705	60	60	ggaggtgcagagtgttgag
Amplicon (96 nt)					
cagttaccacctgtggacgaggagagctcagacggggagccagaccaggaagctgtgcaga gctctacctacaaggactccaacactctgcacctcc					

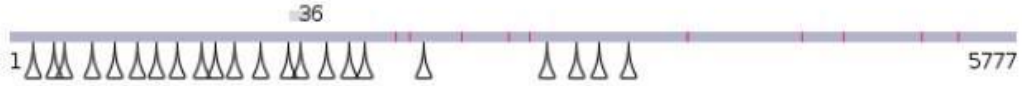
Download pack insert

PDF report

Text report

Order probes or set

Transcript overview:



Şekil 11. SIK3 primer-prob dizaynı (SIK3 UPL prob 36: ctggtctcc)

3.8.2. GAPDH için Real Time Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µl olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo VIII).

Tablo VIII. GAPDH Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
PCR-grade distile su	5,8 µl		
GAPDH Forward Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
GAPDH Reverse Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (LNA 60)	0,2 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.

- LightCycler 480 II cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

Real Time Q-PCR programı aşamaları Tablo IX’da verilmiştir.

Tablo IX. Real Time Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (⁰ C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 ⁰ C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 ⁰ C	10 sn.	Quantification
		55 ⁰ C	15 sn	
		72 ⁰ C	1 sn	
Soğutma	1	40 ⁰ C	10 sn.	None

3.8.3. SIK1 için Real Time Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo X).

Tablo X. SIK1 Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
PCR-grade distile su	5,8 µl		
SIK1 Forward Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
SIK1 Reverse Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (Prob 77)	0,2 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18’er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2’şer µL cDNA template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

3.8.4. SIK2 için Real Time Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo XI).

Tablo XI. SIK2 Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
PCR-grade distile su	5,8 µl		
SIK2 Forward Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
SIK2 Reverse Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (prob 18)	0,2 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

3.8.5. SIK3 için Real Time Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (Tablo XII).

Tablo XII. SIK3 Real Time Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Başlangıç Konsantrasyonu	Final Konsantrasyonu
PCR-grade distile su	5,8 µl		
SIK3 Forward Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
SIK3 Reverse Primer	1 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (prob 18)	0,2 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl		

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 2'şer µL cDNA template pipetlendi.

- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

Real Time Quantitative (Q-PCR) çalışmasında relatif gen ekspresyon analizi yapılırken dikkat edilmesi gereken konular:

- RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmalı ve elüsyon hacmi hücre sayısı az ise RNA dilüsyonunu önlemek amacıyla düşük volümle yapılmalı (~ 50 µl)
- İzolasyon sonrası RNA'lar nanospektrofotometre ile ölçülerek cDNA sırasında kullanılacak RNA miktarı belirlenmeli. Eğer düşük miktarda RNA izole edilmişse cDNA sentezi sırasında olabildiğince yüksek RNA kullanılmalı.
- cDNA sentezi için kullanılacak RNA konsantrasyonları, farklı gruplar arasında birbirine yakın olmalıdır. Gerekirse RNA dilüsyonu yapılarak yakın konsantrasyonlara getirilebilir.
- cDNA sentezi Transkriptör First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak yapılmalı.
- cDNA sentezi oligod(T) primer kullanılarak, her bir mRNA'ya ait tek bir cDNA sentezi sağlanarak daha spesifik yapılabilir. (Random heksamer ile bir mRNA'dan birkaç cDNA oluşabilir).
- Düşük konsantrasyondaki RNA kullanılarak yapılan cDNA sentezinde Random heksamer kullanılarak verim artırılabilir.
- Real Time Quantitative PCR (QPCR)'da kullanılacak primer ve proplar Roche UPL programı kullanılarak dizayn edilebilir.
- Kullanılacak primerler sipariş edilmeden önce mutlaka biyoinformatik analize tabi tutulmalı.
- Primerler 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra alikotlanarak saklanmalı. PCR çalışılacağı zaman alikot 10 pmol/µl'e dilüe edilerek kullanılmalı.
- Proplar tekrarlayan dondur-çözlerden kaçınmak için alikotlanarak saklanmalı.

- Normalizasyon için kullanılacak referans genin ekspresyonu, hücrenin maruz kaldığı koşullardan etkilenmeden eksprese olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'lerden en sık kullanılanları GAPDH, β -actin, siklofilin ve 28S ribozomal RNA'dır.
- Seçilen referans gen, çalışılacak genin ekspresyon düzeyine yakın olmalıdır. Örneğin yüksek oranda eksprese olan bir gen için düşük düzeylerde ekspresyonu olan bir referans gen uygun değildir.
- Yapılan çalışmada numuneler standart deviasyonun hesaplanabilmesi için en az 3 tekrarlı olarak çalışılmalı.
- Çalışılacak olan her bir gen background hesabında yanlışlığa yol açmaması için mutlaka ayrı pleytte çalışılmalı veya aynı pleytte çalışılacaksa ayrı ayrı subsetler tanımlanarak çalışılmalı.
- QPCR relative kantitasyon komparatif CP Metodu ($\Delta\Delta$ CP metodu) ile çalışılacaksa Efficiency mutlaka 2'ye ayarlanmalı.
- 15 CP'nin altı ve 40 CP'nin üzeri analizde değerlendirmeye alınmamalıdır. 35-40 CP gri zondur gen ekspresyonu çok düşük düzeydedir ve "0" kabul edilebilir.

Yapılan çalışmada her bir cDNA'dan 2'ser tane QPCR çalışılmıştır.

3.9. TNF- α , IL-10 ve IL-12p70 ELISA Çalışmaları

Çalışma sırasında flasklardan toplanarak -80 °C'ye kaldırılan süpernatantlar oda ısısında çözüldü ve;

- Human IL-10 ELISA Research Regant kiti kullanılarak ELİSA yöntemiyle IL-10 miktarı ölçüldü.
- Human IL-12p70 ELISA Research Regant kiti kullanılarak ELİSA yöntemiyle IL-12p70 miktarı ölçüldü.
- TNF- α -EASIA kiti kullanılarak ELİSA yöntemiyle TNF- α miktarı ölçüldü.

3.10. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

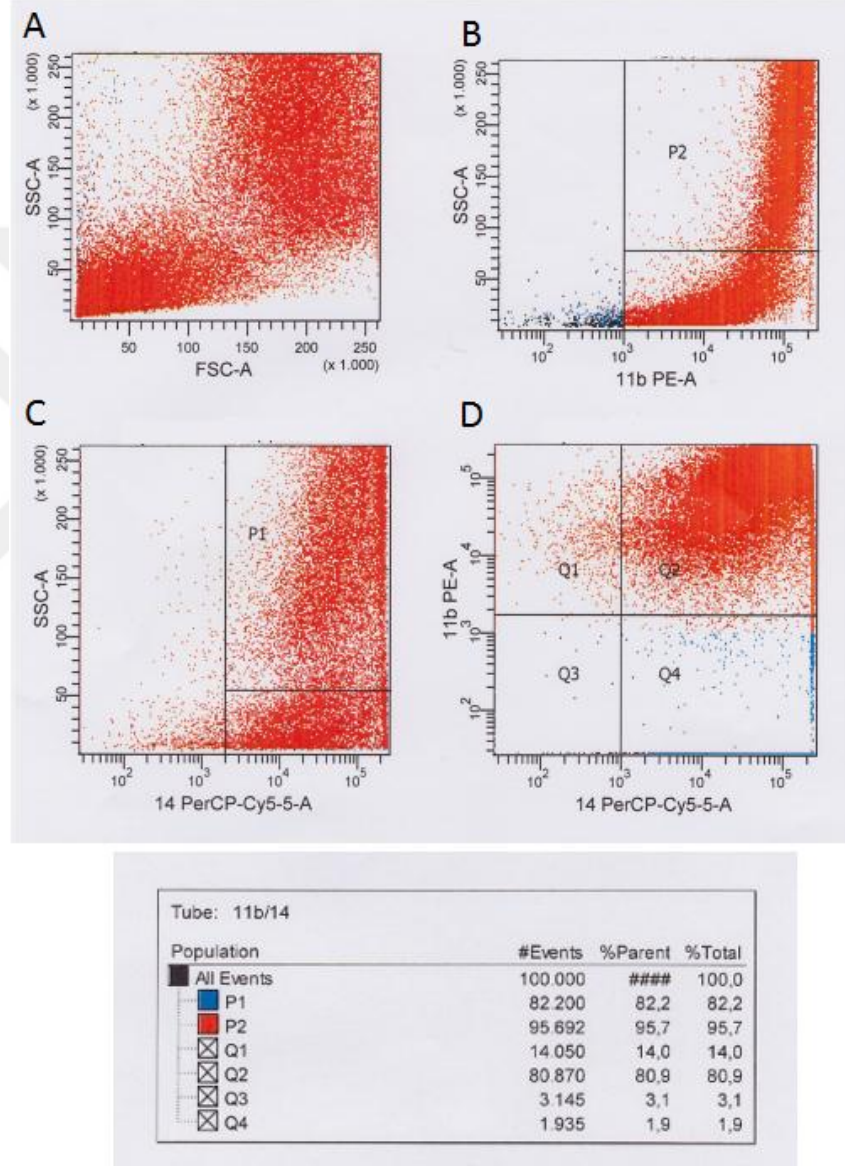
GAPDH geni referans gen olarak kabul edilerek, komparatif crossing point (Cp) metodunu esas alan QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak iki farklı relatif gen ekspresyon analizi yapıldı. İlk analizde LPS ve/veya IFN- γ uygulamasının SIK genleri üzerine etkisini görmek için kalibratör olarak herhangi bir kimyasal uygulanmayan M0 makrofajı kullandık. İkinci analizde ise M2 makrofaj polarize edici kimyasalların (IL-4, IL-4+IL-13, IL-10, TGF β) SIK genleri üzerine etkisini gözlemlemek için kalibratör olarak M(LPS+IFN γ) grubunu kullandık.

TNF- α , IL-10, IL-12p70, IL-10/ IL-12 oranının gruplar arası karşılaştırmasında, grup sayısı 2'den fazla ve örnek sayısı az olduğu için non parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi Kruskal Wallis testi için $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

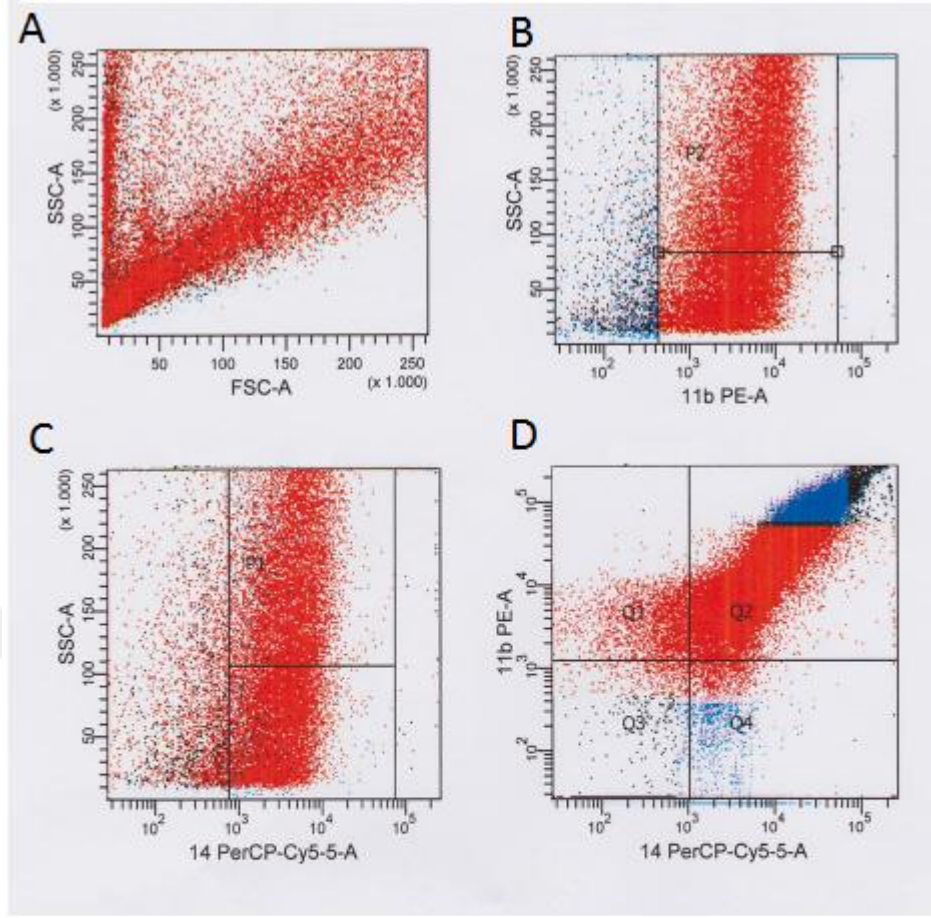
4.1. Flow Sitometri Analizi

CD 11b ve CD 14 ortak pozitifliği diferansiye edilen THP-1 hücrelerinde % 80.9, diferansiye U-937 hücrelerinde ise % 81.5 olarak bulundu (Şekil 12 ve Şekil 13).



Şekil 12. THP-1 Hücrelerinin Flow sitometri Analiz Sonuçları.

A) X eksenini hücre büyüklüğünü, Y eksenini hücre granülitesini, B) P2 Alanı CD11b pozitifliğini, C) P1 Alanı CD14 pozitifliğini, D) Q2 Alanı CD11b ve CD14 ortak pozitifliğini göstermektedir. SSC-A, Side Scatter Channel Antikor, FSC-A, Forward scatter channel Antikor, PE-A, Polyethene Antikor, PerCP-Cy5-5-A, Peridin Chlorophyll Protein.



Tube: 11b/14

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	100.000	###	100,0
P1	84.555	84,6	84,6
P2	70.726	70,7	70,7
Q1	6.862	6,9	6,9
Q2	81.531	81,5	81,5
Q3	8.889	8,9	8,9
Q4	2.718	2,7	2,7

Şekil 13. U-937 Hücrelerinin Flow sitometri Analiz Sonuçları.

A) X eksenini hücre büyüklüğünü, Y eksenini hücre granülitesini, B) P2 Alanı CD11b pozitifliğini, C) P1 Alanı CD14 pozitifliğini, D) Q2 Alanı CD11b ve CD14 ortak pozitifliğini göstermektedir. SSC-A, Side Scatter Channel Antikor, FSC-A, Forward scatter channel Antikor, PE-A, Polyethene Antikor, PerCP-Cy5-5-A, Peridinin Chlorophyll Protein.

4.2. THP-1 Hücrelerinde RNA Konsantrasyonları

THP-1 hücrelerinden elde edilen RNA'ların nanofotometre ile ölçüm sonuçları Tablo XIII'de gösterilmiştir.

Tablo XIII THP-1 hücrelerinin RNA kantitasyon sonuçları

THP-1 RNA	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
KONTROL	279	6,975	3,409	2,05	2,25
10 ng/ml LPS	263,5	6,587	3,243	2,03	2,23
10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN- γ	216,8	5,42	2,685	2,02	2,26
20 ng/ml IL-4	195,8	4,895	2,435	2,01	2,26
20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13	228	5,7	2,839	2,01	2,26
20 ng/ml IL-10	213,6	5,339	2,617	2,04	2,21
10 ng/ml TGF- β	217,3	5,432	2,677	2,03	2,24

4.3. U-937 Hücrelerinde RNA Konsantrasyonları

U-937 hücrelerinden elde edilen RNA'ların nanofotometre ile ölçüm sonuçları Tablo XIV'de gösterilmiştir.

Tablo XIV. U-937 hücrelerinin RNA kantitasyon sonuçları

U-937 RNA	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
KONTROL	237,6	5,941	2,872	2,07	2,19
10 ng/ml LPS	278,3	6,956	3,358	2,07	2,21
10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN- γ	206,3	5,159	2,479	2,08	2,18
20 ng/ml IL-4	261,1	6,528	3,145	2,08	2,17
20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13	266,3	6,657	3,250	2,05	2,21
20 ng/ml IL-10	259	6,474	3,131	2,07	2,17
10 ng/ml TGF- β	220,2	5,504	2,643	2,08	2,18

4.4. Kantitatif Real Time-PCR Sonuçları

Farklı çalışma gruplarındaki GAPDH, SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Cp değerleri tablo XV ve tablo XVI'da gösterilmiştir.

Tablo XV. THP-1 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Cp değerleri

THP-1	GAPDH	SIK1	SIK2	SIK3
KONTROL	26,31	25,91	31,29	24,23
KONTROL	26,12	25,77	30,99	24,37
10 ng/ml LPS	25,91	25,19	30,79	24,25
10 ng/ml LPS	25,7	25,51	31,02	24,29
10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN-γ	27,27	25,17	31,3	23,28
10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN-γ	26,88	24,96	31,18	23,33
20 ng/ml IL-4	26,54	25,63	31,63	25,28
20 ng/ml IL-4	27,02	25,75	31,67	25,26
20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13	25,63	25,33	30,82	24,33
20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13	25,5	25,23	30,88	24,52
20 ng/ml IL-10	26,47	25,97	31,47	24,87
20 ng/ml IL-10	26,91	25,93	31,49	24,84
10 ng/ml TGF-β	27,28	25,94	31,24	25,24
10 ng/ml TGF-β	27,2	26,03	31,27	25,03

Tablo XVI. U-937 ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Cp değerleri

U-937	GAPDH	SIK1	SIK2	SIK3
KONTROL	26,61	26,47	28,99	26,8
KONTROL	26,86	26,81	29,12	27,09
10 ng/ml LPS	26,18	25,58	28,18	25,97
10 ng/ml LPS	25,06	25,35	28,17	26,08
10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN- γ	26,77	25,63	29,45	26,24
10 ng/ml LPS+ 20 ng/ml IFN- γ	26,89	25,38	29,62	26,20
20 ng/ml IL-4	26,99	26,82	29,69	26,71
20 ng/ml IL-4	27,31	26,88	29,62	26,63
20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13	26,49	26,36	29,03	26,21
20 ng/ml IL-4 + 20 ng/ml IL-13	26,61	26,50	29,03	26,1
20 ng/ml IL-10	25,81	25,52	28,29	26
20 ng/ml IL-10	25,77	25,47	28,16	26,02
10 ng/ml TGF- β	26,37	25,76	28,38	26,72
10 ng/ml TGF- β	26,57	26,71	28,49	26,63

4.5. REST analizi

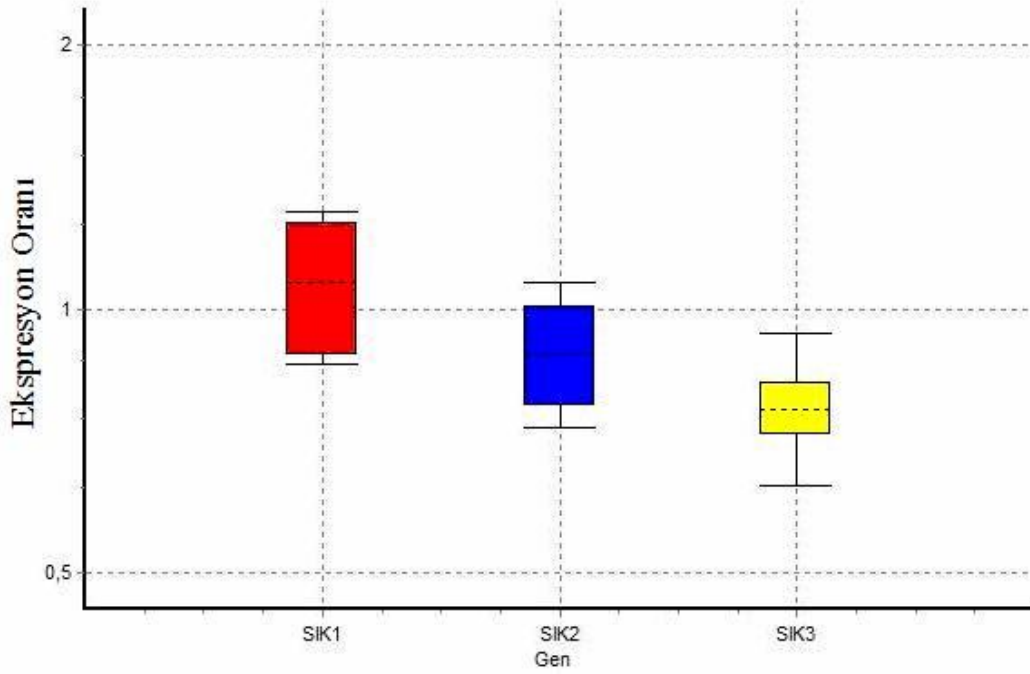
4.5.1. M0'a göre REST analizi

THP-1 hücrelerine LPS uygulandığında SIK1 gen ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artışa neden olurken SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu. Üstelik SIK3 gen ekspresyondaki azalma anlamlıydı (Tablo XVII ve Şekil 14).

Tablo XVII. THP-1 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	1,057	0,879 - 1,271	0,867 - 1,289	0,680	
SIK2	0,886	0,760 - 1,034	0,736 - 1,066	0,498	
SIK3	0,768	0,685 - 0,868	0,637 - 0,928	0,000	DOWN

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



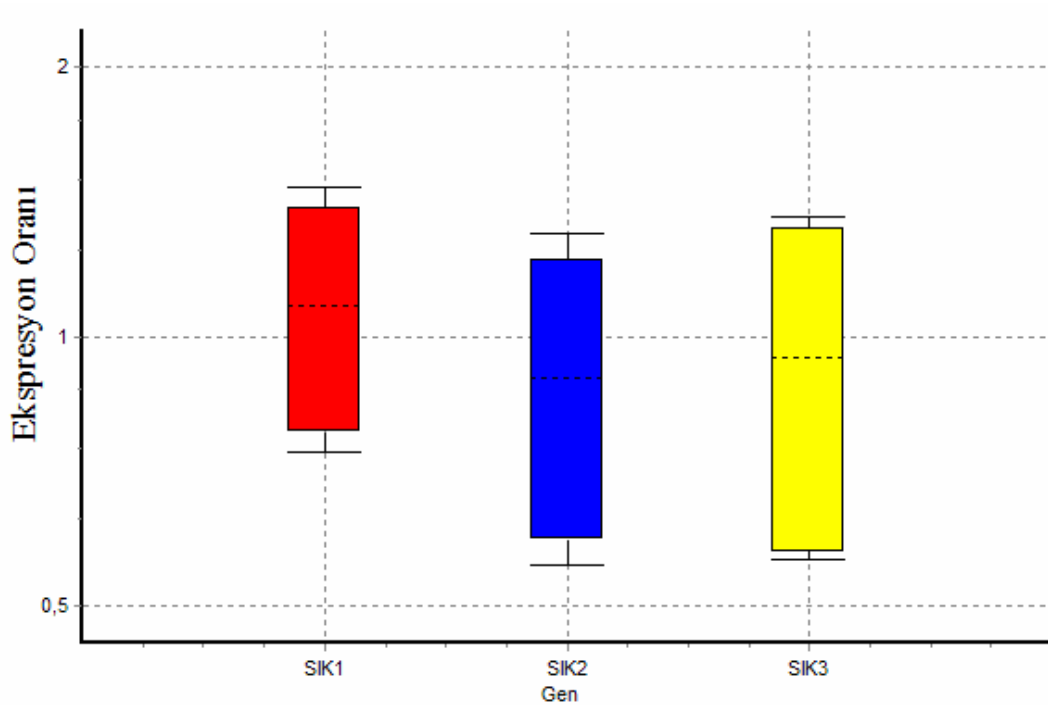
Şekil 14. THP-1 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

U-937 hücrelerine LPS uygulandığında SIK1 gen ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artışa neden olurken, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonlarında ise anlamlı olmayan bir azalmaya neden oldu (Tablo XVIII ve Şekil 15).

Tablo XVIII. U-937 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	1,042	0,765 - 1,422	0,746 - 1,457	0,680	
SIK2	0,850	0,578 - 1,252	0,558 - 1,294	0,834	
SIK3	0,874	0,570 - 1,339	0,564 - 1,354	0,834	

(P: Anlamlılık değeri, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



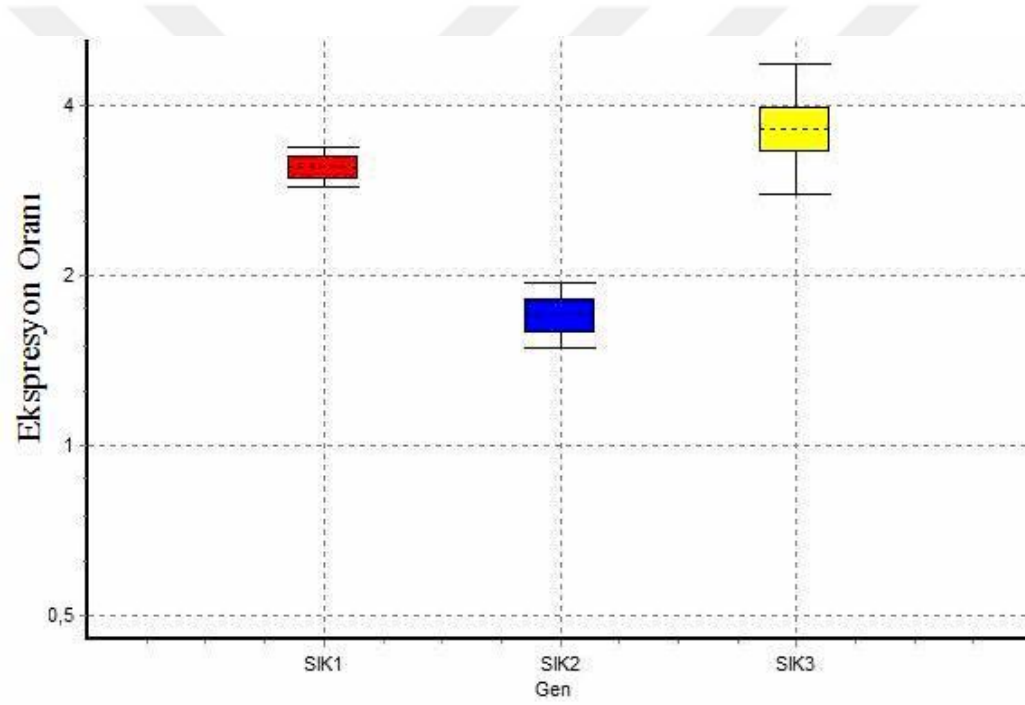
Şekil 15. U-937 hücrelerinde LPS uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

THP-1 hücrelerine LPS+IFN- γ uygulandığında SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonlarında anlamlı bir artış oldu (Tablo XIX ve Şekil 16).

Tablo XIX. THP-1 hücrelerinde LPS+ IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	3,106	2,916 - 3,309	2,875 - 3,355	0,000	UP
SIK2	1,693	1,541 - 1,864	1,493 - 1,921	0,000	UP
SIK3	3,618	3,110 - 4,263	2,824 - 4,652	0,000	UP

(P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



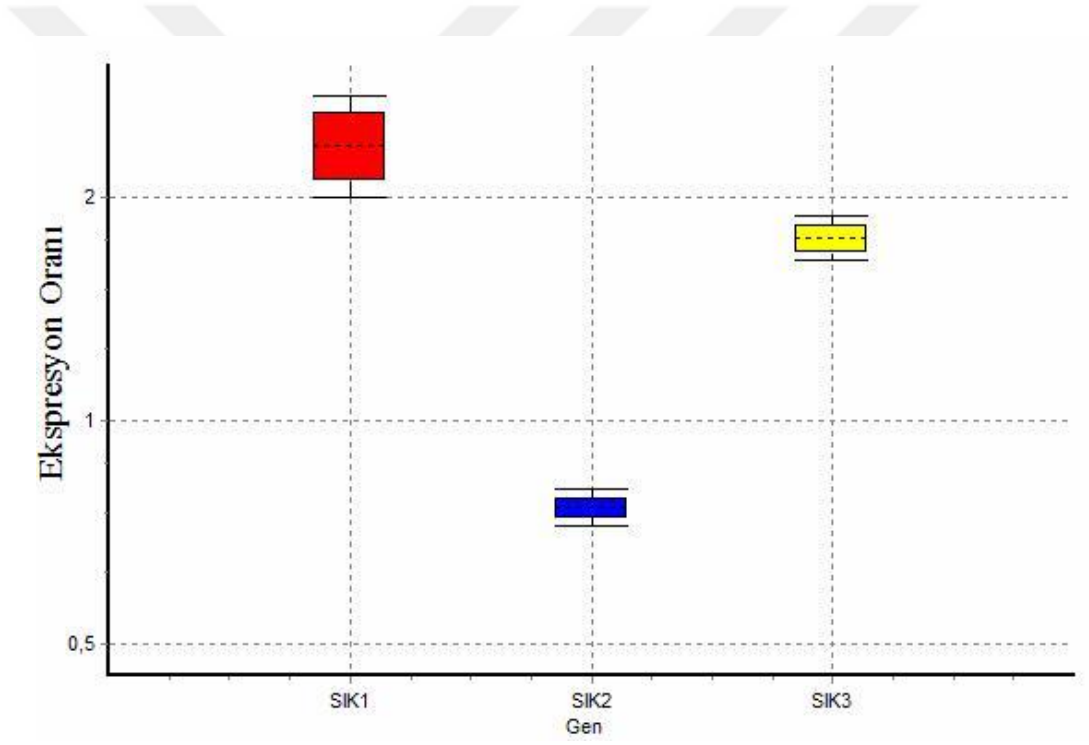
Şekil 16. THP-1 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

U-937 hücrelerine LPS+IFN- γ uygulandığında SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarında artışa neden oldu, üstelik bu artış anlamlıydı. SIK2 gen ekspresyonunda ise anlamlı olmayan bir azalma gösterilmiştir (Tablo XX ve Şekil 17).

Tablo XX. U-937 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	2,346	2,061 - 2,672	2,010 - 2,739	0,000	UP
SIK2	0,766	0,734 - 0,799	0,724 - 0,810	0,175	
SIK3	1,765	1,669 - 1,867	1,651 - 1,888	0,000	UP

(P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



Şekil 17. U-937 hücrelerinde LPS+IFN- γ uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

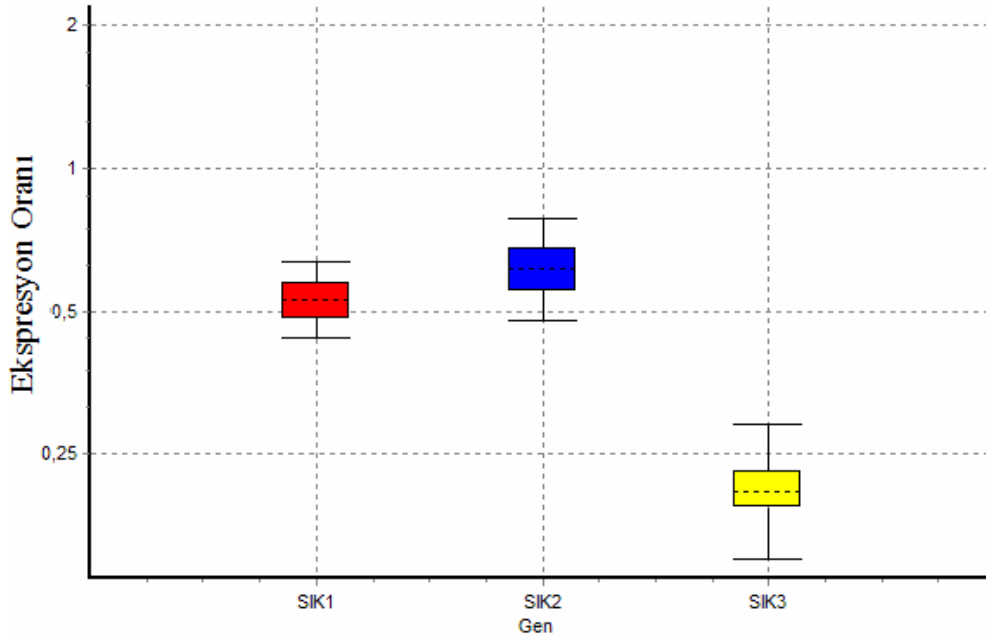
4.5.2. M (LPS+IFN- γ)'ya göre REST analizi

THP-1 hücrelerine IL-4 uygulandığında SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonlarında azalma oldu, üstelik SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarındaki azalma anlamlıydı. (Tablo XXI ve Şekil 18)

Tablo XXI THP-1 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,529	0,466 - 0,602	0,443 - 0,632	0,000	DOWN
SIK2	0,613	0,527 - 0,721	0,487 - 0,775	0,175	
SIK3	0,209	0,176 - 0,253	0,155 - 0,283	0,000	DOWN

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



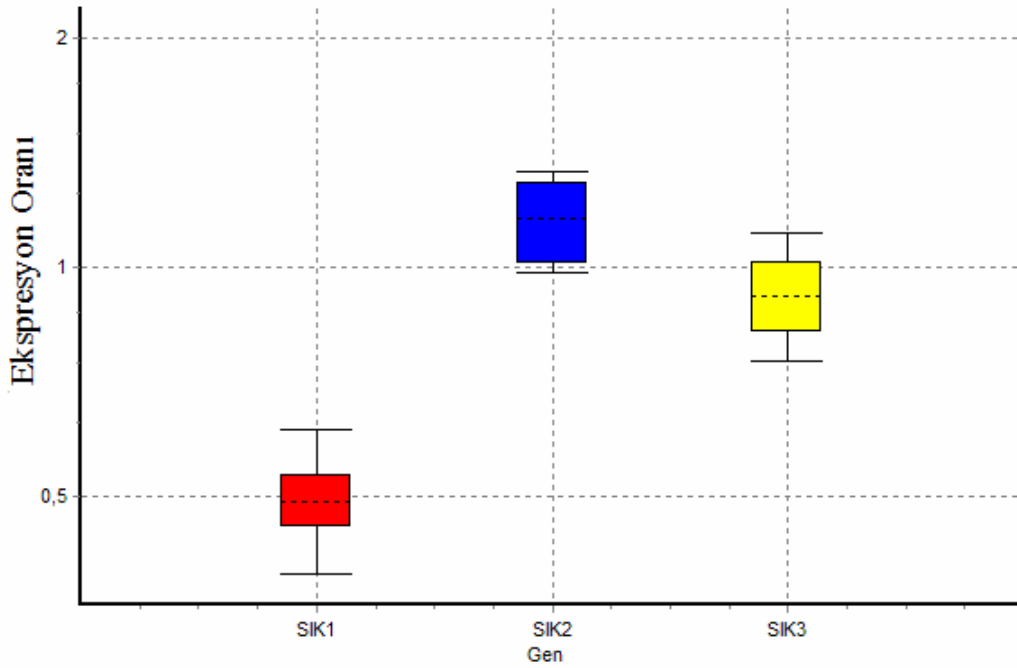
Şekil 18. THP-1 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

U-937 hücrelerinde IL-4 uygulandığında SIK2 gen ekspresyonunda anlamlı olmayan bir artış, SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarında ise azalma oldu, üstelik SIK1 genindeki bu azalma anlamlıydı. (Tablo XXII ve Şekil 19)

Tablo XXII. U-937 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,491	0,432 - 0,563	0,401 - 0,604	0,000	DOWN
SIK2	1,149	1,003 - 1,316	0,989 - 1,335	0,498	
SIK3	0,914	0,795 - 1,054	0,759 - 1,101	0,336	

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



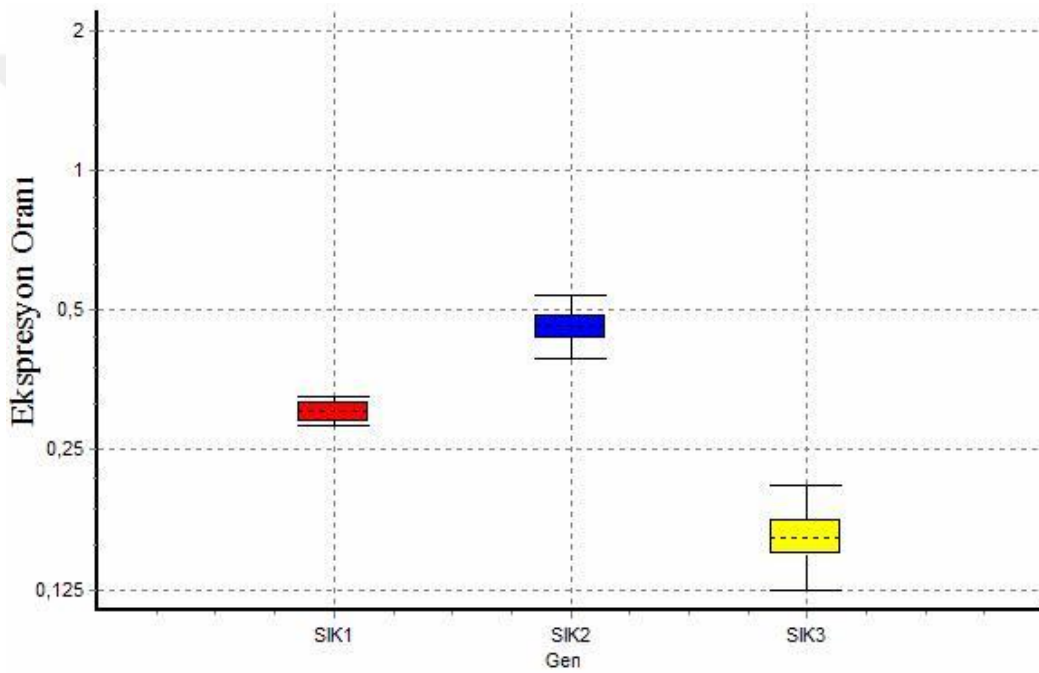
Şekil 19. U-937 hücrelerinde IL-4 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

THP-1 hücrelerine IL-4 + IL-13 uygulandığında SIK2 gen ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma, SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarının ise anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. (Tablo XXIII ve Şekil 20)

Tablo XXIII. THP-1 hücrelerinde IL-4 + IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,302	0,284 - 0,322	0,282 - 0,325	0,000	DOWN
SIK2	0,460	0,419 - 0,508	0,396 - 0,535	0,166	
SIK3	0,162	0,139 - 0,190	0,126 - 0,207	0,000	DOWN

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



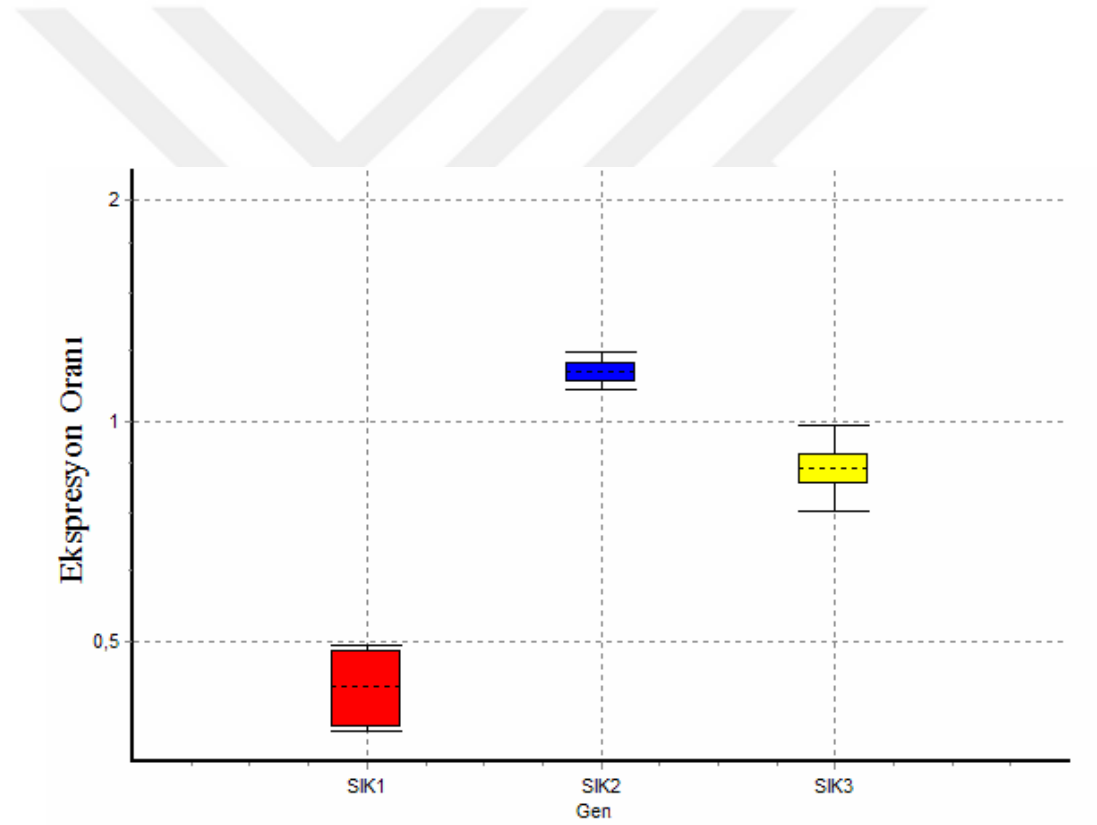
Şekil 20. THP-1 hücrelerinde IL-4+IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

U-937 hücrelerine IL-4+IL-13 uygulandığında SIK3 gen ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalma, SIK1 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma ve SIK3 gen ekspresyonunda ise anlamlı bir artış oldu. (Tablo XXIV ve Şekil 21)

Tablo XXIV. U-937 hücrelerinde IL-4+IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,434	0,381 - 0,493	0,379 - 0,496	0,000	DOWN
SIK2	1,169	1,120 - 1,220	1,105 - 1,237	0,000	UP
SIK3	0,862	0,795 - 0,937	0,759 - 0,978	0,175	

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, UP: Upregülasyon,C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



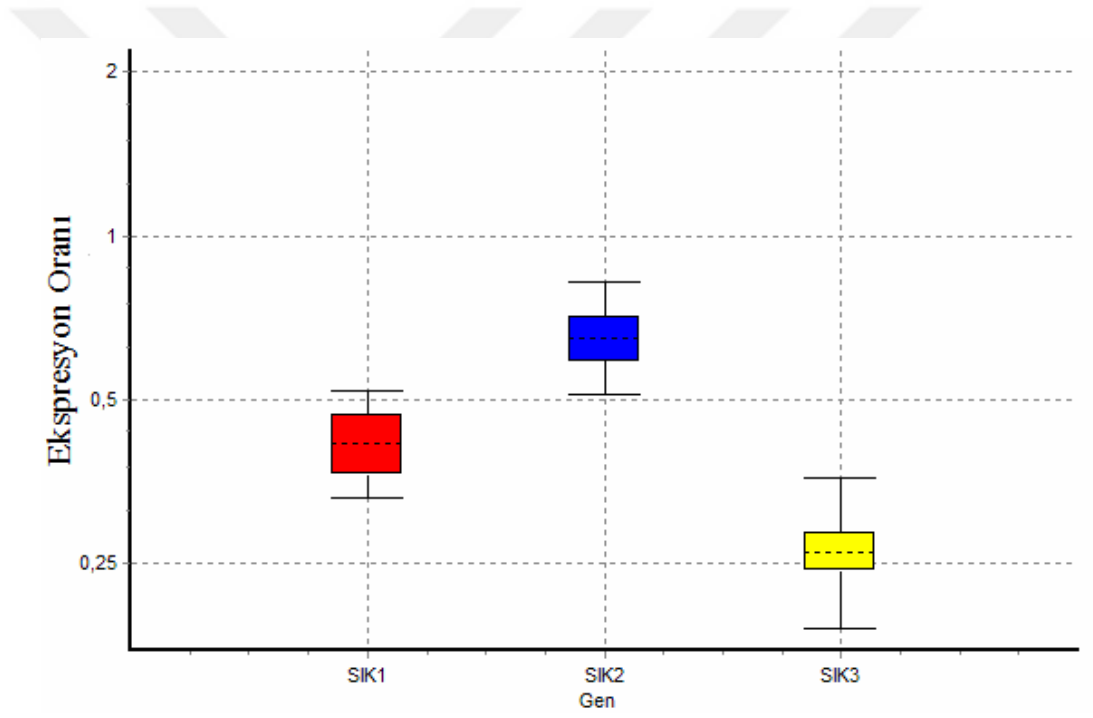
Şekil 21. U-937 hücrelerinde IL-4 +IL-13 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

THP-1 hücrelerinde IL-10 uygulandığında SIK2 gen ekspresyonunun anlamlı olmayan bir şekilde azaldığı, SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarının ise anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. (Tablo XXV ve Şekil 22)

Tablo XXV. THP-1 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,415	0,351 - 0,492	0,333 - 0,517	0,000	DOWN
SIK2	0,648	0,561 - 0,757	0,518 - 0,813	0,162	
SIK3	0,262	0,223 - 0,314	0,196 - 0,351	0,000	DOWN

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



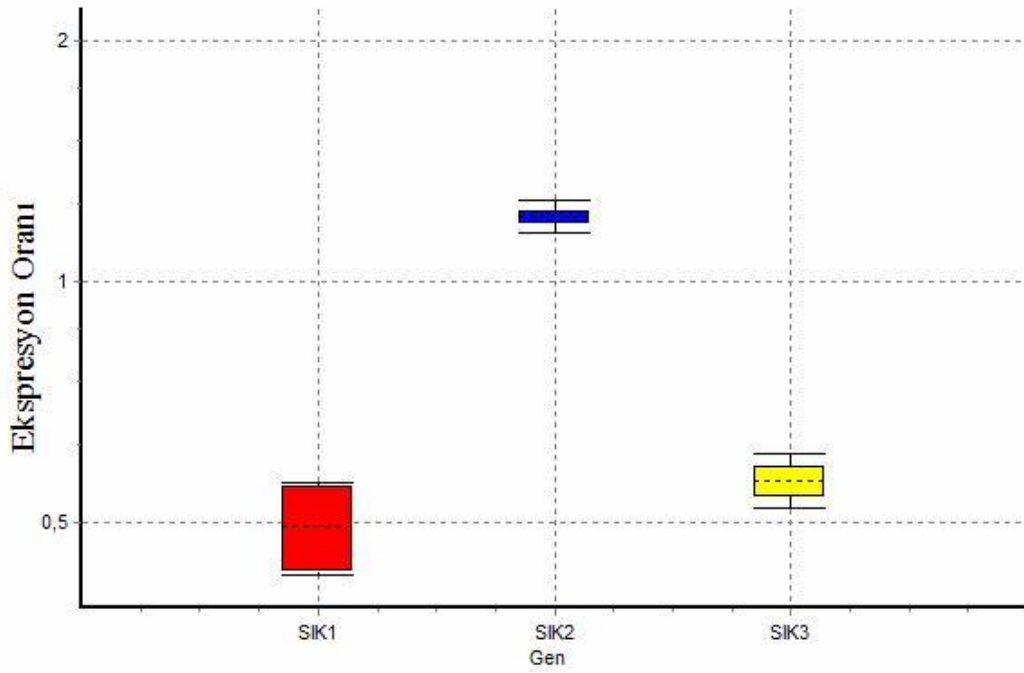
Şekil 22. THP-1 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

U-937 hücrelerinde IL-10 uygulandığında SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarının ise anlamlı olmayan bir azalma, SIK2 gen ekspresyonunda ise anlamlı bir artış oldu (Tablo XXVI ve Şekil 23).

Tablo XXVI. U-937 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,490	0,431 - 0,557	0,430 - 0,558	0,339	
SIK2	1,206	1,168 - 1,245	1,152 - 1,263	0,000	UP
SIK3	0,563	0,532 - 0,595	0,523 - 0,605	0,166	

(P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



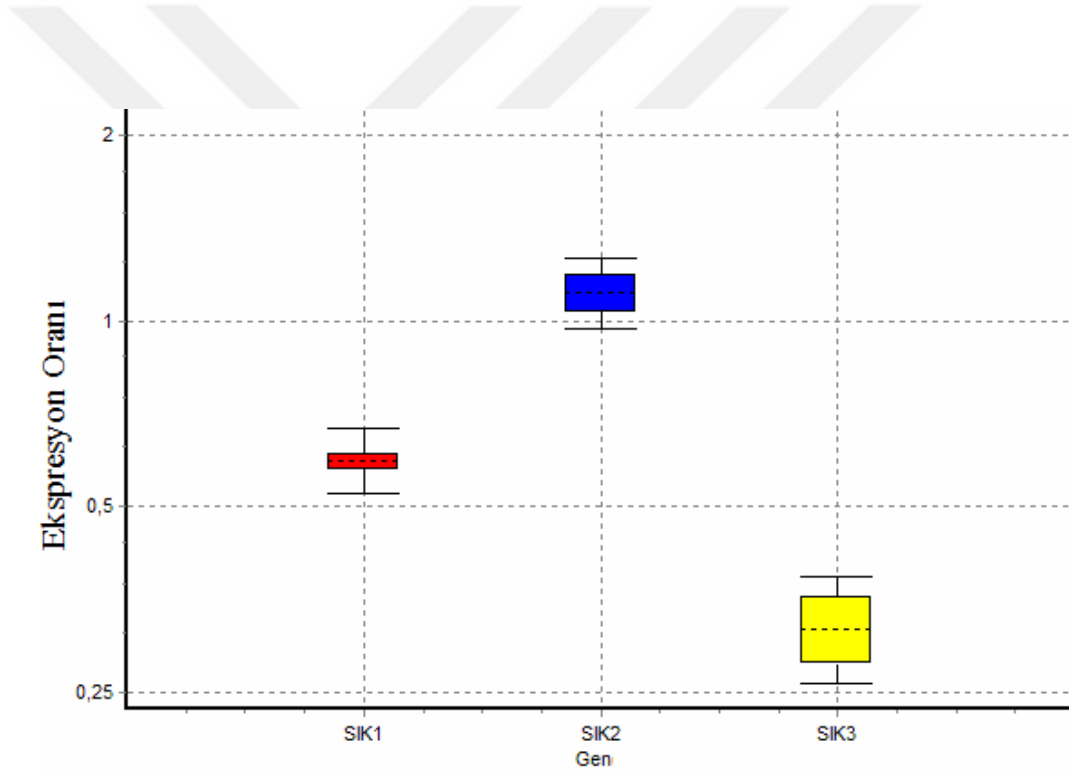
Şekil 23. U-937 hücrelerinde IL-10 uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

THP-1 hücrelerinde TGF- β uygulandığında SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarında azalma oldu ve SIK3 geninde ki bu azalma anlamlı idi. SIK2 gen ekspresyonunda ise anlamlı olmayan bir artış oldu (Tablo XXVII ve Şekil 24).

Tablo XXVII. THP-1 hücrelerinde TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,593	0,556 - 0,633	0,530 - 0,663	0,170	
SIK2	1,110	1,009 - 1,221	0,978 - 1,259	0,343	
SIK3	0,315	0,270 - 0,368	0,261 - 0,382	0,000	DOWN

(P: Anlamlılık değeri, DOWN: Downregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



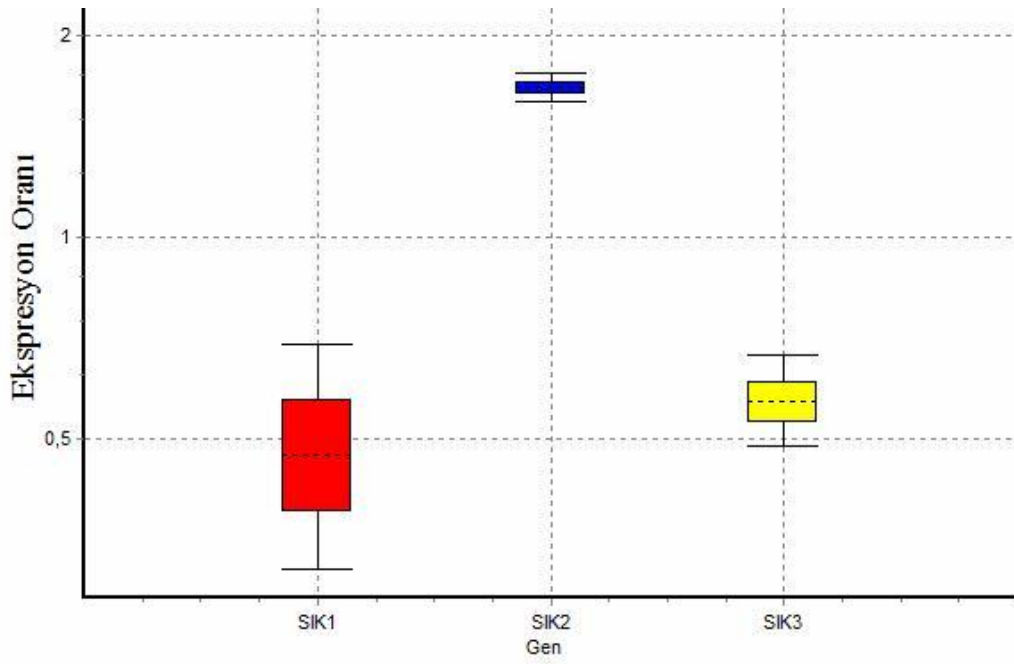
Şekil 24. THP-1 hücrelerinde TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

U-937 hücrelerinde TGF- β uygulandığında SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonlarında anlamlı olmayan bir azalma ve SIK2 gen ekspresyonunda ise anlamlı bir artış oldu (Tablo XXVIII ve Şekil 25).

Tablo XXVIII. U-937 hücrelerinde TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
GAPDH	1,000				
SIK1	0,470	0,363 - 0,618	0,326 - 0,681	0,162	
SIK2	1,670	1,618 - 1,725	1,595 - 1,749	0,000	UP
SIK3	0,568	0,514 - 0,631	0,491 - 0,659	0,162	

(P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.:Confidens İntervale, Güven Aralığı)



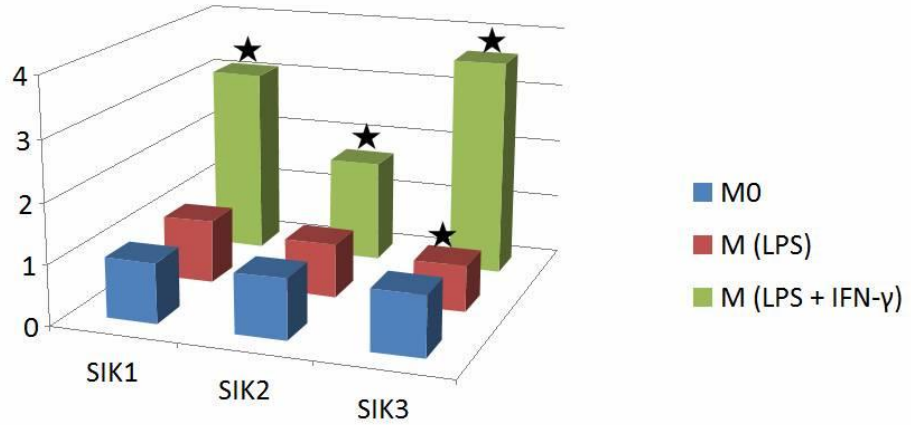
Şekil 25. U-937 hücrelerinde 10 ng/ml TGF- β uygulama sonrası gen ekspresyon oranları

Tablo XXIX. THP-1 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları

GRUPLAR	Gen Ekspresyonu Artış Miktarı*		
	SIK1	SIK2	SIK3
M (LPS)	1,057	0,886	0,768 ^a
M (LPS+ IFN- γ)	3,106 ^a	1,693 ^a	3,618 ^a
M (IL-4)	0,529 ^b	0,613	0,209 ^b
M (IL-4+IL-13)	0,302 ^b	0,460	0,162 ^b
M (IL-10)	0,415 ^b	0,648	0,262 ^b
M (TGF- β)	0,593	1,11	0,315 ^b

* Artış miktarı kontrol grubunun katı olarak ifade edilmektedir.
^a; M0'a göre anlamlı p < 0,05
^b; M (LPS+IFN- γ)'ya göre anlamlı p < 0,05

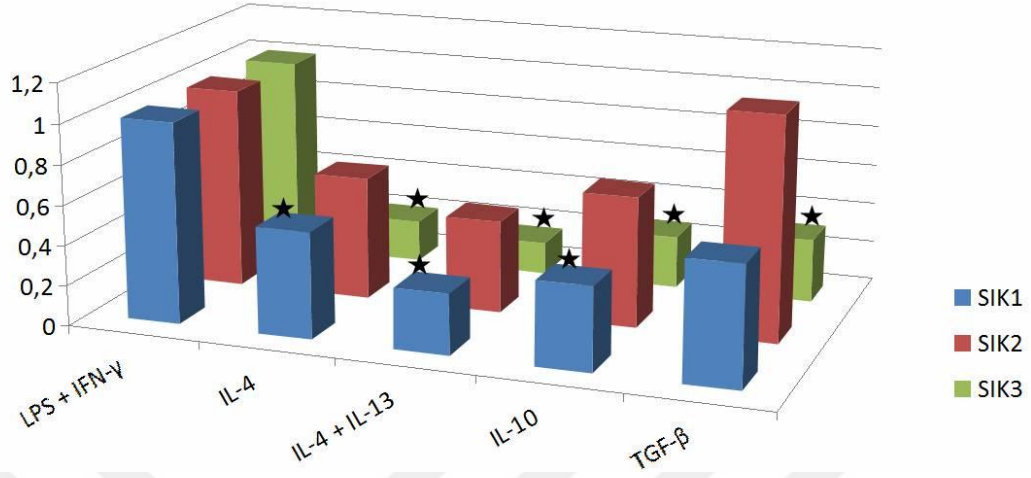
THP-1



Şekil 26. THP-1 hücrelerinde M0'a göre SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeyleri

★ Kontrolle göre anlamlı artış veya azalmayı gösterir

THP1



Şekil 27. THP-1 hücrelerinde M (LPS+IFN-γ)'ya göre SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeyleri

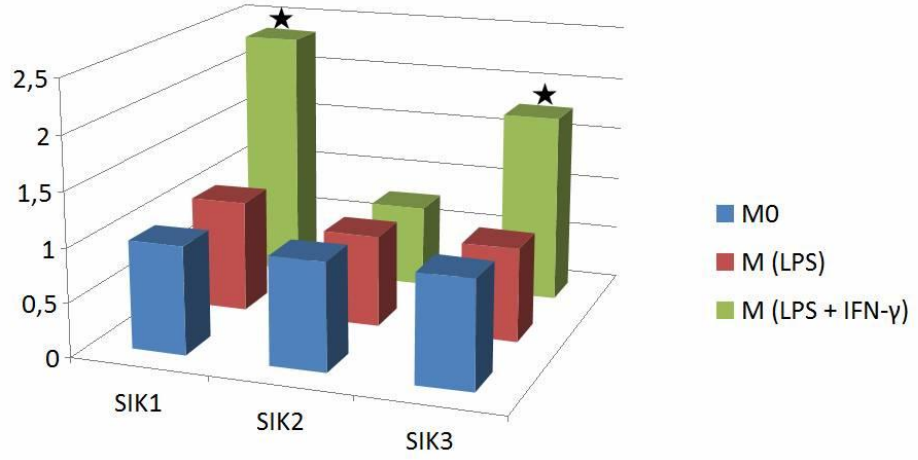
★ Kontrolle göre anlamlı artış veya azalmayı gösterir

Tablo XXX. U-937 hücrelerinde gen ekspresyonu analiz sonuçları

GRUPLAR	Gen Ekspresyonu Artış Miktarı*		
	SIK1	SIK2	SIK3
M (LPS)	1,042	0,85	0,874
M (LPS+ IFN-γ)	2,346 ^a	0,766	1,765 ^a
M (IL-4)	0,491 ^b	1,149	0,914
M (IL-4+IL-13)	0,434 ^b	1,169 ^b	0,862
M (IL-10)	0,490	1,206 ^b	0,563
M (TGF-β)	0,47	1,67 ^b	0,568

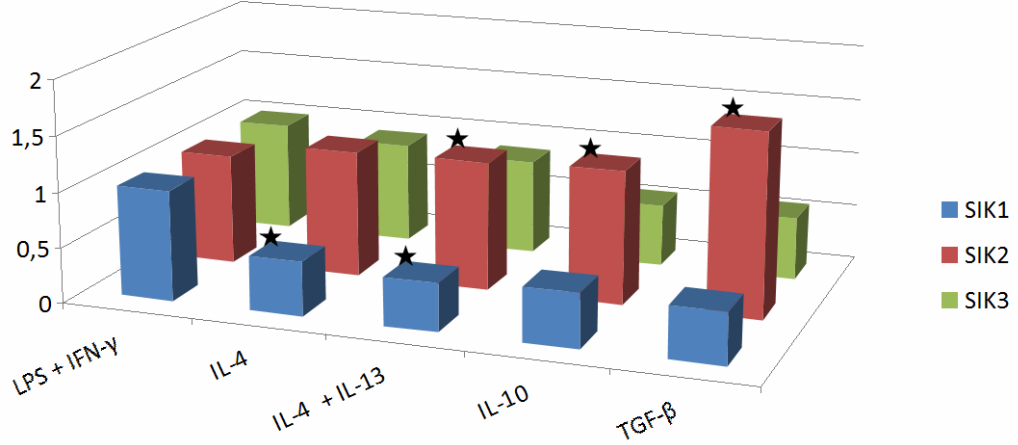
* Artış miktarı kontrol grubunun katı olarak ifade edilmektedir.
^a; M0'a göre anlamlı p < 0,05
^b; M(LPS+IFN-γ)'ya göre anlamlı p < 0,05

U-937



Şekil 28. U-937 hücrelerinde M0'a göre SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeyleri
★ Kontrol'e göre anlamlı artış veya azalmayı gösterir

U937



Şekil 29. U-937 hücrelerinde M (LPS+IFN-γ)'ya göre SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon düzeyleri
★ Kontrol'e göre anlamlı artış veya azalmayı gösterir

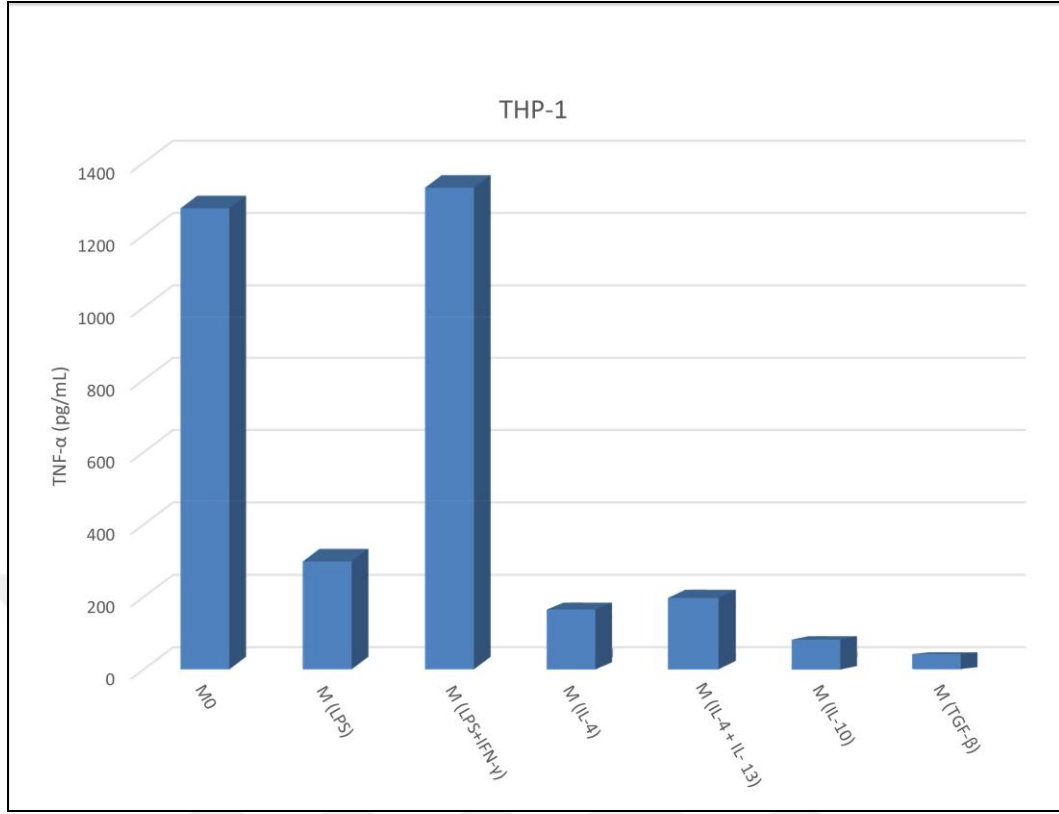
4.6. Sitokin Düzeyleri

4.6.1. THP-1 hücreleri sitokin düzeyleri

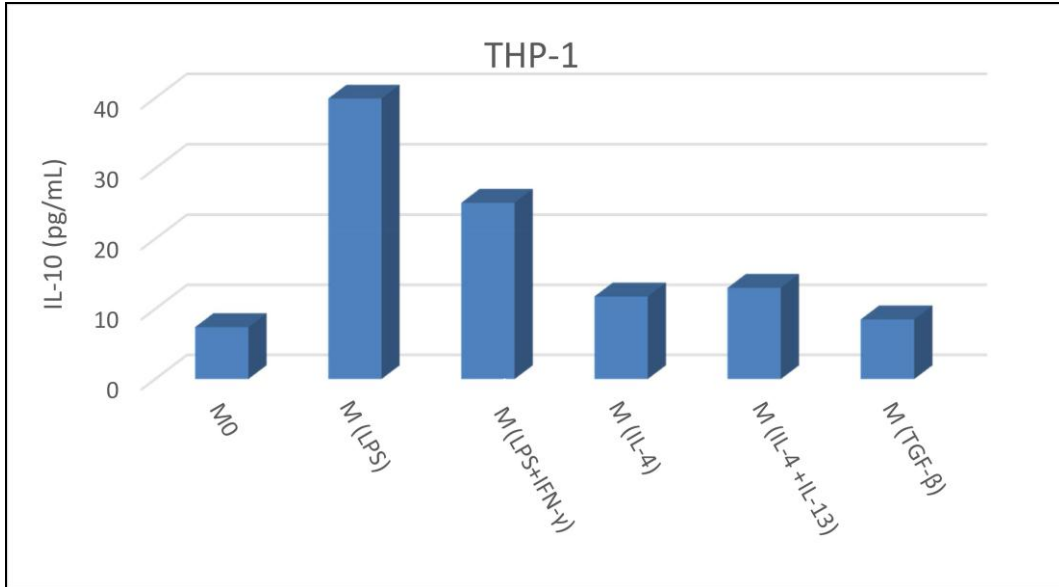
Tablo XXXI. THP-1 hücreleri sitokin düzeyleri

GRUPLAR	Sitokin Düzeyleri			
	TNF- α	IL-10	IL-12p70	IL-10/ IL-12p70
M0	1273,85 ^a	7,419 ^b	80 ^c	0,1 ^d
M (LPS)	297,75 ^a	39,927 ^b	7,84 ^c	5,1 ^d
M (LPS+IFN- γ)	1330,85 ^a	25,135 ^b	44,7 ^c	0,6 ^d
M (IL-4)	22,914 ^a	11,79 ^b	8,119 ^c	1,5 ^d
M (IL-4 + IL-13)	28,304 ^a	13,022 ^b	7,645 ^c	1,7 ^d
M (IL-10)	12,485 ^a		3,233 ^c	
M (TGF- β)	15,201 ^a	8,524 ^b	0,24 ^c	35,5 ^d

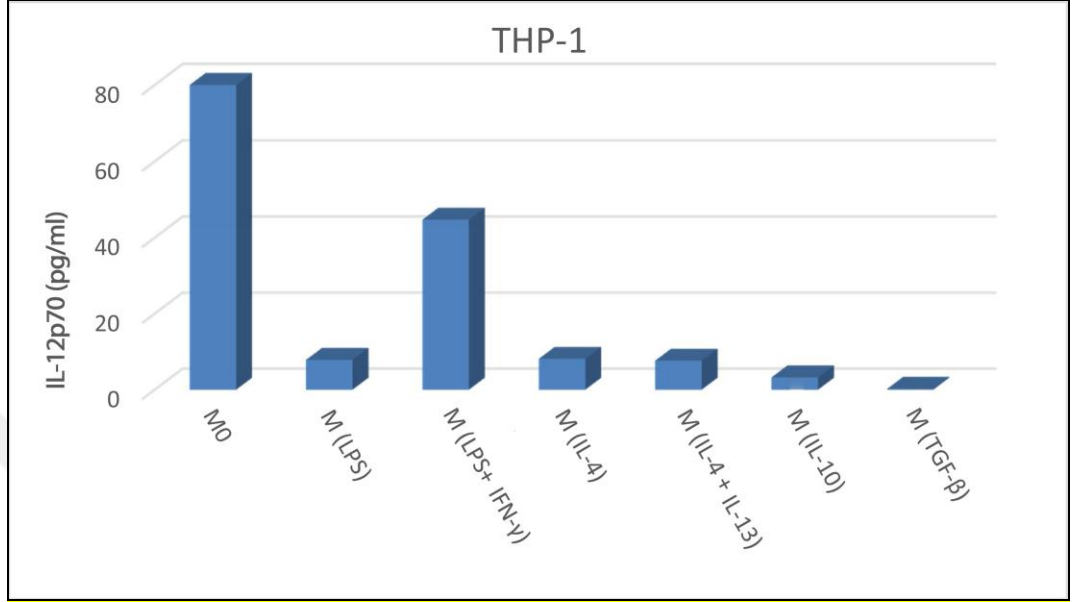
^a; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,04
^b; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,05
^c; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,04
^d; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,05



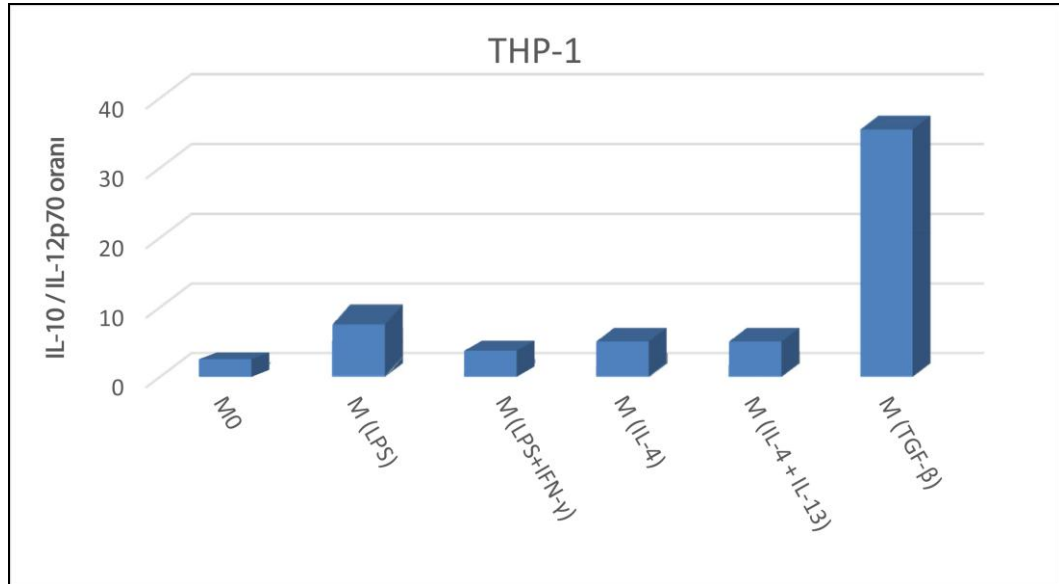
Şekil 30. THP-1 hücreleri TNF- α düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır.)



Şekil 31. THP-1 hücreleri IL-10 düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır)



Şekil 32. THP-1 hücreleri IL-12p70 düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır)



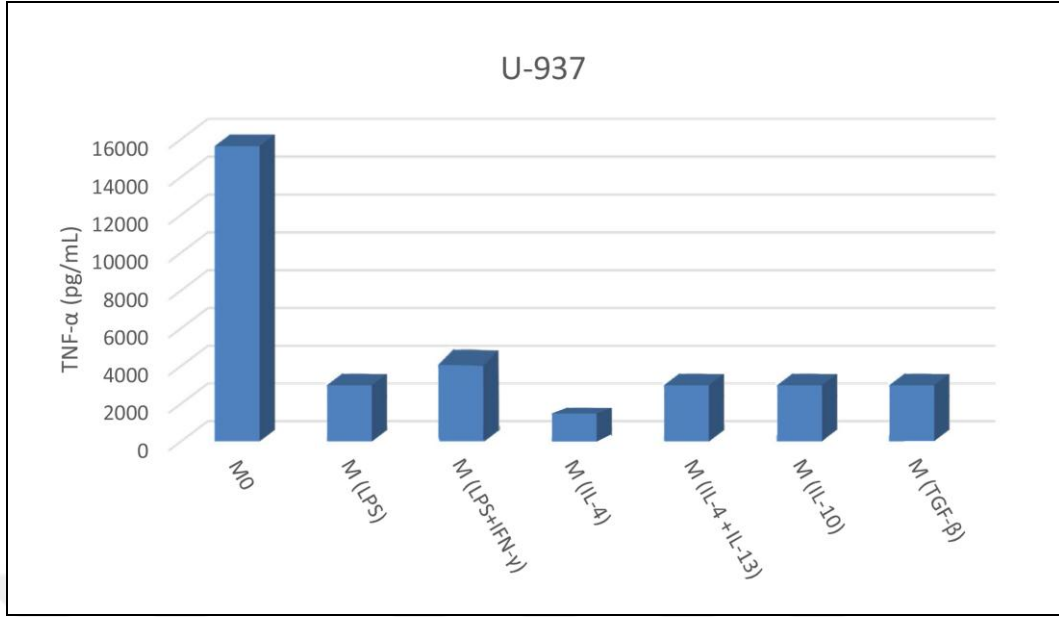
Şekil 33. THP-1 hücreleri IL-10/ IL-12p70 oranı (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır.)

4.6.2. U-937 hücreleri sitokin düzeyleri

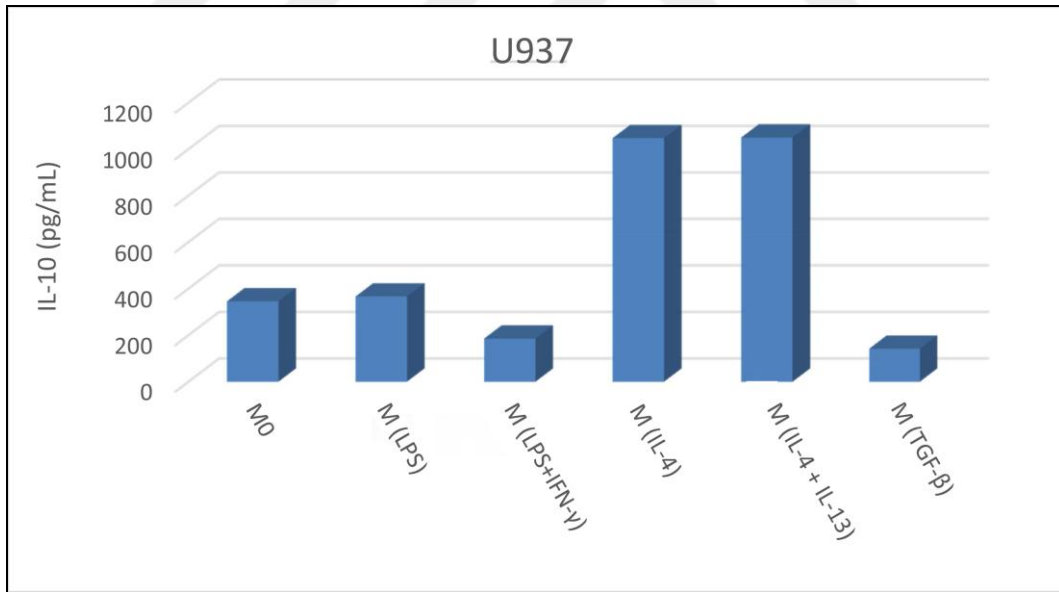
Tablo XXXII. U-937 hücreleri sitokin düzeyleri

GRUPLAR	Sitokin Düzeyleri			
	TNF- α	IL-10	IL-12p70	IL-10/ IL-12p70
M0	15641,65 ^a	345,675 ^b	5,94 ^c	58,2 ^d
M (LPS)	177,25 ^a	366,069 ^b	29,68 ^c	12,3 ^d
M (LPS+IFN- γ)	209,05 ^a	185,262 ^b	8,56 ^c	21,6 ^d
M (IL-4)	115,99 ^a	1047,562 ^b	3,38 ^c	309,9 ^d
M (IL-4+IL-13)	292,369 ^a	1050 ^b	2,92 ^c	359,6 ^d
M (IL-10)	293,421 ^a		0,18 ^c	
M (TGF- β)	306,194 ^a	141,576 ^b	0,12 ^c	1179,8 ^d

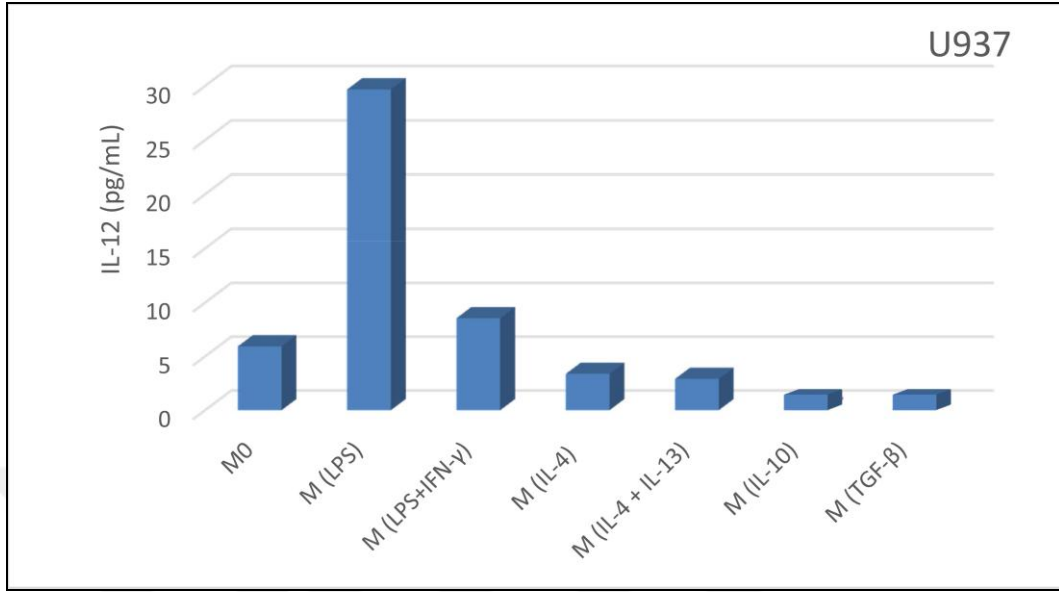
^a; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p=0,04
^b; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,05
^c; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,05
^d; Diğer gruplardan farklı, Kruskal-Wallis testinden elde edilen anlamlılık değeri p= 0,04



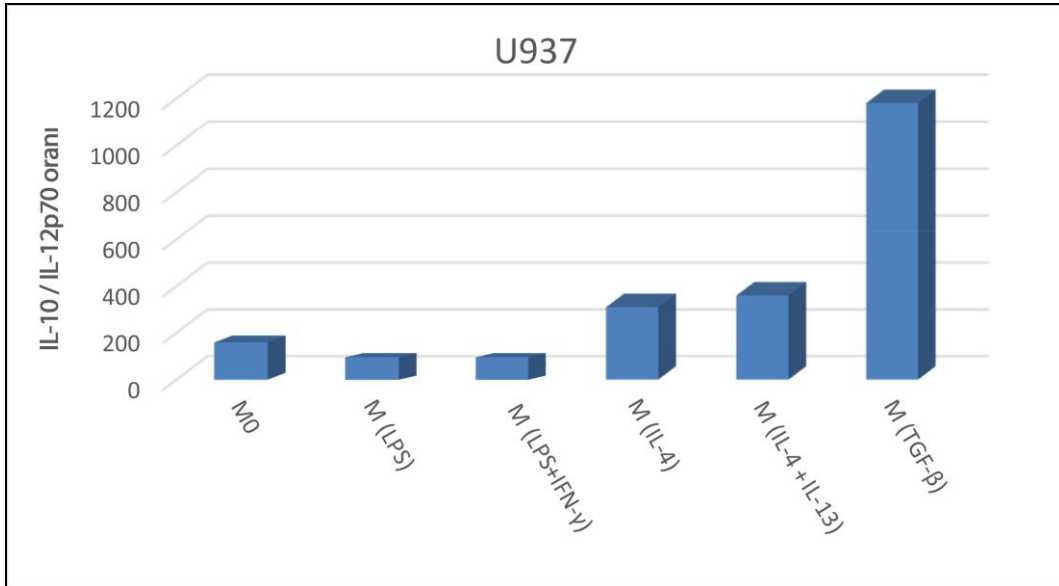
Şekil 34. U-937 hücreleri TNF-α düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır.)



Şekil 35. U-937 hücreleri IL-10 düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır.)



Şekil 36. U-937 hücreleri IL-12p70 düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır.)



Şekil 37. U-937 hücreleri IL-10/ IL-12p70 düzeyleri (Tüm gruplar birbirinden anlamlı olarak farklıdır.)



5. TARTIŞMA

Günümüzde kanser hücrelerinin mikroçevresinde inflamatuvar bir ortam oluştuğu ve inflamasyonun kanser progresyonunu artırdığı bilinmektedir. Kanser mikroçevresini oluşturan inflamatuvar hücrelerin büyük kısmını ise TAM'lar oluşturmaktadır. Tümör hücresinin büyümesi, invazyonu, metastazı, immun regülasyonu ve anjiyogenez dahil kanser gelişiminin tüm aşamalarında TAM'ların etkili olduğu görülmektedir. Yeni çalışmalar TAM'ların kemoterapiye cevabın sınırlı kalmasına ve nüks oranının artmasına da katkısını ortaya koymaktadır. Bu bulgular araştırmacıları TAM ile bağlantılı moleküller üzerinde çalışmaya sevk etmiştir. Özellikle TAM'ların tümörün başlangıç evresinde etkin olan anti tümör potansiyellerinin aktivasyonunu etkinleştirmek veya TAM'ların ortadan kaldırılmasını sağlamak tedavi stratejileri arasındadır (Biswas ve ark., 2013).

SIK, yüksek tuz diyeti ile beslenen sıçanların böbrek üstü bezlerinden klonlanan AMPK ailesine ait olan bir serin/treonin protein kinazdır (Horike ve ark., 2003). SIK enzimlerinin transkripsiyon faktörlerini hassas bir şekilde regüle ederek makrofaj polarizasyonu üzerinde etkin bir rol oynadığı bildirilmişse de (Ozanne ve ark., 2015) literatürde makrofaj polarizasyonunda SIK gen profiliyle ilgili az sayıda çalışma mevcuttur.

Bu çalışmalardan birinde Clark ve ark. (2012) kemik iliğinden köken alan makrofajları (BMDM) farklı SIK inhibitörleri ile muamele ettikten sonra 24 saat çeşitli TLR agonistleri (LPS, Pam₃CSK₄, lipoteikoik asit) ile uyarmışlardır. Sonuçta SIK inhibisyonunun CRT3'ün defosforile olarak nükleusa geçmesine ve burada CREB bağımlı olarak IL-10 gen ekspresyonunun artışına neden olduğunu gözlemişlerdir. IL-10'un ise otokrin etki ile arg1 gibi düzenleyici markırları artırarak M2 makrofaj dönüşümüne sebep olduğu bildirilmiştir (Clark ve ark., 2012).

Ozanne ve ark. (2015) da BMDM hücrelerinde pan-SIK inhibitörü olan HG-9-91-01 ile aynı etkinliğe sahip olan dasatinib ve bosutinib ile SIK inhibisyonunu takiben bir saatlik LPS stimülasyonu yapmışlardır. Stimülasyon sonrasında yapılan analizde IL-10 ve transkripsiyon faktörü olan CREB bağımlı genler olan Nurr77 ve c-FOS'un mRNA seviyelerinde artış gözlenmiştir. Ayrıca Raw264.7 hücrelerinde dasatinib,

bosutinib ve HG-9-91-01 uygulamasının CRTC3'ün Ser¹⁶² ve Ser³⁷⁰ bölgelerinden defosforilasyonuna neden olduğu da gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada ise SIK-CRTC3 yolağının, makrofajların 'düzenleyici' benzeri fenotipe dönüşmesi için MSK1/2-CREB [pSer¹³³] yolağı ile sinerjik olarak çalıştığı belirtilmiştir. CREB aktivitesi MSK1/2 kinaz aracılı Ser¹³³ bölgesinden direk fosforilasyonla CRTC ile etkileşerek düzenlenmektedir (MacKenzie ve ark., 2013).

Ozanne ve ark. (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise dasatinib, bosutinib ve HG-9-91-01 ile SIK inhibisyonu sonrası 0, 10, 30 ve 60 dakikalık LPS stimülasyonunun MAPK (p-MSK1, p-ERK1/2, p-p38 MAPK, p-JNK1/2) türlerinin aktivasyon kinetiğine etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Lombardi ve ark. (2016) M0 makrofaja diferansiye ettikleri BMDM hücrelerini HG-9-91-01 ile bir saat inkübe ettikten sonra, TLR4 agonisti olan LPS ve TLR2 agonisti olan Pam₃CSK₄ ile üç saat stimüle etmişlerdir. Sonuç olarak her iki reseptör agonisti de proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α miktarında azalmaya, antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 düzeylerinde ise artışa neden olmuştur. Yine Lombardi ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada M0 makrofaja diferansiye edilen BMDM hücreleri LPS+IFN- γ ile dört saat stimüle edildiğinde SIK1 ve SIK3 protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmazken 24 saat stimülasyon sonucunda protein düzeylerinin dört kat arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmalardan SIK inhibisyonunun makrofajları antiinflamatuvar M2 fenotipine, SIK overekspresyonunun ise, özellikle de SIK1 ve SIK3'ün, proinflamatuvar M1 fenotipine yönlendirdiği sonucunu çıkarılabilir.

Ayrıca SIK inhibisyonunun makrofajlarda HDAC4 enziminin defosforilasyonuna neden olarak dolaylı olarak antiinflamatuvar etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Luan ve ark., 2014). Defosforile olan HDAC4 enzimi nukleusa transloke olmakta ve nukleusta NF- κ B altbirimi olan p65'i deasetile ederek TNF- α ve IL-12 gibi inflamatuvar gen ekspresyonunu engelleyerek antiinflamatuvar etki oluşturmaktadır.

Kim ve ark. (2013) ise farklı bir hücre tipinde çalışarak yukarıdaki çalışmalardan farklı bir sonuca ulaşmışlardır. Transfeksiyon ile SIK1 ve SIK3 overekspresyonu oluşturdukları murin makrofaj hücre hattı olan Raw264.7 hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunun azaldığını görmüşlerdir. Bu veriyi doğrulamak için NF- κ B'nin p65 ve p50 DNA bağlayıcı aktivitesi değerlendirilmiş ve SIK1 ve SIK3 over ekspresyonu

sonucu her iki aktivite de zayıflamıştır. SIK1 ve SIK3 over eksprese olan hücreler üç ve altı saat LPS ile inkübe edildiğinde ise TNF- α ve IL-6 gen ekspresyonlarında azalma ile birlikte hücre süpernatantında ölçülen IL-6 protein düzeylerinde de azalma görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada SIK1 ve SIK3 varlığında TAB2 (TGF- β activated kinase 1-binding protein 2) ve TRAF6 ubiquitinasyonunda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Üstelik bu etki TLR4 stimülasyonuna rağmen görülmüştür. Bu nedenle araştırmacılar SIK1 ve SIK3'ün TAK1 (TGF- β activated kinase 1)-TAB2-TRAF6 kompleksine etki ettiğini düşünmektedirler. SIK1 ve SIK3'ün TAB2-TRAF6 etkileşimini engelleyerek ve TRAF6'nın ubiquitinasyonunu inhibe ederek TLR4 sinyal yolağının aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. SIK1 ve SIK3'ün TAB2'nin N-terminali ile etkileşime girerek TAB2-TRAF6 etkileşimini engellediği gösterilmiştir. Bunu destekler nitelikte ise SIK knockdown hücrelerde LPS uyarımı NF- κ B aktivitesinde ve TLR downstream uyarımında (TAK1, p38, JNK gibi) artışa neden olmuştur.

Raw264.7 hücrelerinde Sanosaka (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise 16 saat LPS uyarımından sonra SIK1 ve SIK2 mRNA ekspresyonunda bir değişim olmazken SIK3 mRNA ekspresyonunda artış gösterilmiştir. Raw264.7 hücrelerinde transfeksiyon ile SIK3 overekspresyon oluşturulmuş ve LPS ile stimülasyon sonucunda IL-6, iNOS, IL-12p40 mRNA ekspresyon seviyelerinde azalma, IL-10 mRNA ekspresyon seviyelerinde ise artma görülmüştür. Aynı çalışmada SIK3 knockdown TEMP (Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages) hücrelerinde dört saatlik LPS uyarımı sonrası Wild type TEMP hücrelerine kıyasla yüksek IL-6, iNOS, IL-12p40 mRNA ekspresyon seviyeleri tesbit edilmesi de bunu desteklemiştir.

Kendi kendine replike olan insan makrofaj hücre hattı halen yoktur (Lee ve ark., 1997). Bu nedenle hücre kültüründe makrofaj benzeri fonksiyonları çalışmak amacıyla insan U937 veya THP-1 monosit hücre hatları kullanılmaktadır (Dockrell ve ark., 2010). Bizde çalışmamızda U-937 ve THP-1 hücrelerinde M1 veya M2 makrofaj polarizasyona neden olduğu düşünülen bazı maddelerin SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonu üzerine etkisini araştırdık. Monositleri makrofaja diferansiye etmek için bir forbol esteri olan PMA kullandık. Daha sonra bu hücrelerde diferansiye makrofajlar (M0) tarafından eksprese edilen CD11b ve CD14 (182) yüzey antijenlerini flow sitometri ile değerlendirdik. CD11b ve CD14 ortak pozitifliğini THP-1 hücrelerinde % 82.2, U-937 hücrelerinde ise % 84.6 olarak bulduk.

Literatürde makrofaj polarizasyonu için kullanılan başlıca uyaranlar M1 polarizasyon için LPS, IFN- γ , LPS+IFN- γ , M2 polarizasyon için ise IL-10, IL-13, IL-4, IL-4+IL-13, TGF- β , immun kompleksler, glukokortikoidlerdir (Gratchev ve ark., 2008; Fleetwood ve ark., 2009).

Diferansiye makrofajlara (M0) 24 saat LPS, LPS+IFN- γ , IL-4, IL-4+IL-13, IL-10 ve TGF- β uyguladık. Burada LPS ve LPS+IFN- γ M1 makrofaj uyarıcı, IL-4, IL-4+IL-13, IL-10 ve TGF- β ise M2 makrofaj uyarıcı olarak kullanıldı. Makrofaj polarizasyonu için kullanılan bu maddeler ve etkin dozları için daha önce yapılan çalışmalar ve yapılan tezleri referans aldık (Kigerl ve ark., 2009).

U-937 ve THP-1 hücre hatlarına ortak polarizasyon protokolü uyguladık.

LPS+IFN- γ kombinasyonu U-937 hücrelerinde, SIK1 ve SIK3, THP-1 hücrelerinde ise SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonunu anlamlı bir şekilde upregüle etmiştir. Her iki hücrede LPS+IFN- γ kombinasyonunun uygulanması tek başına LPS'ye göre farklılık göstermiştir. Tek başına LPS gen ekspresyonlarında artışa neden olmadığı gibi anlamlı olmayan bazı azalmalara bile neden olmuştur. Bu farklılığı açıklayacak literatür bilgisine sahip olmamamıza rağmen LPS ve IFN- γ 'nın farklı reseptörler üzerinden etki etmesi ve LPS'nin uygulama süresinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. LPS ile birlikte IFN- γ kullanılması M1 fenotipinde makrofaja dönüşümü uyardığını kabul edersek hücreler arasındaki ufak farklılıklara rağmen M1 makrofajlarda SIK genlerinin özellikle de SIK1 ve SIK3'ün upregüle olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca M1 makrofaja dönüşüm için tek başına LPS yeterli görülmemektedir.

U-937 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonunu tüm M2 polarize makrofaj gruplarında [M (IL-4), M (IL-4+IL-13), M (IL-10), M (TGF- β)], M1 polarize makrofaja [M (LPS+IFN- γ)] göre düşük bulduk. M (IL-4) ve M (IL-4+IL-13)'deki bu azalma anlamlıydı. Tam tersine tüm M2 polarize makrofaj gruplarında SIK2 gen ekspresyonunun M1 polarize makrofajlara göre arttığı ve bu artışın M (IL-4+IL-13), M (IL-10), M (TGF- β)'da anlamlı olduğu görüldü. SIK3 gen ekspresyonu ise tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre azalmış ama bu azalma anlamlı düzeyde değildi.

THP-1 hücrelerinde SIK1 gen ekspresyonu tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre azalmış, özellikle M (IL-4), M (IL-4+IL-13) ve M (IL-10)'da bu azalma anlamlıydı. SIK2 gen ekspresyonunda ise M (TGF- β) hariç tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre anlamlı olmayan bir azalma görüldü. THP-1 hücrelerinde SIK3 gen ekspresyonu tüm M2 polarize makrofaj gruplarında M1 polarize makrofajlara göre anlamlı olarak azalmıştı.

Bizim elde ettiğimiz sonuçlar bazı ufak farklılıklarla birlikte özellikle BMDM hücreleri ile yapılan çalışmalarla uyumlu görülmektedir. Genel olarak her iki hücre grubunda da M2 fenotipine dönüşen makrofajlarda SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. SIK2 gen ekspresyonu ise hücreden hücreye farklılık gösterdiği, U-937 hücrelerinde artarken, THP-1 hücrelerinde ise anlamlı olmasa da azaldığını görmekteyiz. Bu bulgulardan SIK1 ve SIK3'ün biribiri ile eşgüdümlü hareket ederken SIK2'nin ters yönde bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda ayrıca M1 ve M2 polarize edici maddelerin TNF- α , IL-10 ve IL-12p70 protein düzeyleri ve IL-10/IL-12p70 oranına etkisini inceledik. Her iki hücre tipinde de bu protein düzeyleri tüm gruplarda anlamlı olarak farklılık gösterdi. Ayrıntılı olarak incelediğimizde ise THP-1 hücrelerinde M (LPS+IFN- γ) polarize makrofajda TNF- α ve IL-12p70 düzeylerinin beklenildiği gibi, IL-10 düzeylerinin ise beklenildiğinin aksine diğer gruplardan daha yüksek olduğu görüldü. M2 makrofaja özgü bir marker olarak kullanılan IL-10/ IL-12p70 oranı ise M (TGF- β) makrofajda diğerlerinden daha yüksek olarak bulundu. U937 hücrelerinde ise IL-10 protein düzeyleri ve IL-10/ IL-12p70 oranını beklenildiği gibi M (IL-4) ve M (IL-4+IL-13) makrofajda M (LPS) veya M (LPS+IFN- γ) makrofaja göre daha yüksek bulduk. Yine beklenildiği gibi IL-12p70 protein düzeyleri M (LPS) ve M (LPS+IFN- γ) makrofajda diğerlerine göre daha yüksekti. TNF- α düzeyleri ise en yüksek M0 makrofajlarda gözlemlendi.

Çalışmamızdaki sitokin düzeyi sonuçları değerlendirildiğinde gen ekspresyonunda olduğu gibi hücresel farklılıklara rastlandı. Bununla birlikte genel olarak M1 makrofaj gruplarında TNF- α ve IL-12p70 düzeylerinin daha yüksek, M2 makrofaj gruplarında ise IL-10 düzeyi ve IL-10/ IL-12p70 oranının daha yüksek olduğunu gördük.

Elde ettiğimiz sonuçlar yapılan az sayıdaki çalışmalarla kısmen örtüşmektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız iki hücre tipinde bile sonuçların tam olarak uyumlu olmamasını gözönüne alırsak, literatürde kullanılan hücrelerin hem tür (insan, mürin ve fare) hem de köken (kemik iliği, periferik kan gibi) olarak farklı olması sonuçlarımızın diğer çalışmalarla tam uyumlu olmamasını açıklamaktadır. Ayrıca literatürde genelde SIK genleri inhibe edilerek veya overeksprese edilerek yapılan çalışmalara rastladık. Bu çalışmalarda gözlem süreleri genelde 2-6 saat arasında idi. Biz ise makrofajları M1 veya M2 fenotipine dönüşüm için uyararak SIK genleri ve sitokin düzeylerinin 24 saat değişimini gözlemledik. Gözlem sürelerinin farklılığının da sonuçların farklı olmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak kullandığımız hücreler arasında farklılıklar olsa da hem SIK gen ekspresyon düzeyleri hem de sitokin düzeyleri açısından bazı genel çıkarımlar yapabileceğimizi gördük. Makrofaj polarizasyonunda SIK gen profiliyle ilgili çalışmaların azlığı verimli bir analiz yapmayı zorlaştırmaktadır. Bundan sonra aynı hücrelerle farklı sürelerdeki SIK gen ekspresyonları ile birlikte SIK protein düzeylerinin de ölçüldüğü çalışmaların yapılması hem makrofaj polarizasyonunda SIK genlerinin rolüne açıklık getirecek hem de tümör mikroçevresini gözönünde bulunduran tedavilere yeni bir hedef gösterecektir.

6. SONUÇLAR

1. Gen ekspresyonu ve sitokin düzeyleri hücreden hücreye farklılık göstermektedir.
2. M1 makrofaj uyarıcı etki oluşturmak için tek başına LPS'den ziyade LPS+IFN- γ kullanmak daha etkili görülmektedir.
3. LPS+IFN- γ kombinasyonu U-937 hücrelerinde, SIK1 ve SIK3, THP-1 hücrelerinde ise SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyonunu anlamlı bir şekilde artırmaktadır
4. Makrofaj polarizasyonunda SIK1 ve SIK3 genleri birlikte hareket ederken, SIK2 geninin ise bunlara zıt etki göstermektedir.
5. U-937 hücrelerinde M2 fenotip makrofaja polarizasyon SIK1 ve SIK3 gen ekspresyonunu azaltırken SIK2 gen ekspresyonunu ise artırmaktadır.
6. THP-1 hücrelerinde ise M2 fenotip makrofaja polarizasyon SIK1, SIK2 ve SIK3 genlerinin ekspresyonunu da azaltmaktadır.
7. M1ve M2 makrofaj uyarıcı maddelerin 2, 6, 12 ve 24 saat gibi farklı sürelerde uygulanması çalışmayı zenginleştirecektir.
8. SIK1, SIK2 ve SIK3 gen ekspresyon analiziyle eş zamanlı olarak SIK1, SIK2 ve SIK3 protein miktarlarına da bakılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. 2010. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders; 2009. *Acceso Marzo, 9.*
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Poper, J. 2015. 8. Edition Differentiation and Functions of CD4+ Effector T Cells, Cellular and Molecular Immunology. Baker D., Baker A. Eds, Philedelphia, USA, Elsevier Saunders, pp. 213-231 ve 493-496.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Poper, J. 2015. 8. Edition Immunologic Tolerance and Autoimmunity, Cellular and Molecular Immunology. Baker D., Baker A. Eds, Philedelphia, USA, Elsevier Saunders, pp. 315-339.
- Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., De Vries, E., Marland, G., Menon, S., Bacon, K. B. 1997. A dendritic-cell-derived CC chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 387(6634), 713-716.
- Alessi, D. R., Sakamoto, K., Bayascas, J. R. 2006. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 137-163.
- Al-Hakim, A. K., Göransson, O., Deak, M., Toth, R., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Alessi, D. R. 2005. 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *Journal of cell science*, 118(23), 5661-5673.
- Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Mantovani, A. 1998. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *European journal of immunology*, 28(1), 359-369.
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., Mantovani, A. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical reviews in oncology/hematology*, 66(1), 1-9.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Geissmann, F. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, 317(5838), 666-670.
- Auwerx, J., Staels, B., Van Vaeck, E, Verhoeven, G., and Ceuppens, J. 1990. IgG Fc receptor expression during macrophage differentiation of the monocytic leukemia cell line, THP-1. Submitted.
- Bach, E. A., Aguet, M., Schreiber, R.D. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 15:563-91.

- Bachelder, R. E., Wendt, M. A., Mercurio, A. M. 2002. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer research*, 62(24), 7203-7206.
- Balkwill, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 540-550.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., Hagemann, T. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, 125(23), 5591-5596.
- Balkwill, F., Charles, K. A., Mantovani, A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*, 7(3), 211-217.
- Balkwill, F., Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The lancet*, 357(9255), 539-545.
- Becker, W., Heukelbach, J., Kentrup, H., Joost, H. G. 1996. Molecular cloning and characterization of a novel mammalian protein kinase harboring a homology domain that defines a subfamily of serine/threonine kinases. *European Journal of Biochemistry*, 235(3), 736-743.
- Bertorello, A. M., Zhu, J. K. 2009. SIK1/SOS2 networks: decoding sodium signals via calcium-responsive protein kinase pathways. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 458(3), 613-619.
- Bingle, L., Brown, N. J., Lewis, C. E. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology*, 196(3), 254-265.
- Bingle, L., Lewis, C. E., Corke, K. P., Reed, M. W. R., Brown, N. J. 2006. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British journal of cancer*, 94(1), 101-107.
- Biswas, S. K., Allavena, P., Mantovani, A. 2013. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 35, No. 5, pp. 585-600). Springer Berlin Heidelberg.
- Biswas, S. K., Chittezhath, M., Shalova, I. N., Lim, J. Y. 2012. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research*, 53(1-3), 11-24.

- Biswas, S. K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Vago, L. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, *107*(5), 2112-2122.
- Biswas, S. K., Lopez-Collazo, E. 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology*, *30*(10), 475-487.
- Biswas, S. K., Mantovani, A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*, *11*(10), 889-896.
- Biswas, S. K., Sica, A., Lewis, C. E. 2008. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *The Journal of Immunology*, *180*(4), 2011-2017.
- Bittinger, M. A., McWhinnie, E., Meltzer, J., Iourgenko, V., Latario, B., Liu, X., Labow, M. 2004. Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. *Current Biology*, *14*(23), 2156-2161.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sinigaglia, F. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *The Journal of experimental medicine*, *187*(1), 129-134.
- Bottazzi, B. A. R. B. A. R. A., Walter, S. A. B. I. N. E., Govoni, D. E. A. N. N. A., Colotta, F. R. A. N. C. E. S. C. O., Mantovani, A. L. B. E. R. T. 1992. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *The Journal of Immunology*, *148*(4), 1280-1285.
- Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C., Dentin, R. 2010. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, *120*(12), 4316-4331.
- Bright, N. J., Thornton, C., Carling, D. 2009. The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta physiologica*, *196*(1), 15-26.

- Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D. M., Zanovello, P. 2003. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends in immunology*, 24(6), 301-305.
- Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q. H., Jia, H. L., He, P., Zanetti, K. A., Wang, X. W. 2006. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer cell*, 10(2), 99-111.
- Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J. M., Haeffner-Cavaillon, N. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and infection*, 4(9), 915-926.
- Chang, S., Bezprozvannaya, S., Li, S., Olson, E. N. 2005. An expression screen reveals modulators of class II histone deacetylase phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8120-8125.
- Chawla, A. 2010. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circulation research*, 106(10), 1559-1569.
- Cheng, H., Liu, P., Wang, Z. C., Zou, L., Santiago, S., Garbitt, V., Hahn, W. C. 2009. SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis. *Science signaling*, 2(80), ra35.
- Chow, A., Brown, B. D., Merad, M. 2011. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 788-798.
- Clark, K. 2014. Protein kinase networks that limit TLR signalling. *Biochemical Society Transactions*, 42(1), 11-24.
- Clark, K., MacKenzie, K. F., Petkevicius, K., Kristariyanto, Y., Zhang, J., Choi, H. G., Gray, N. S. 2012. Phosphorylation of CRT3 by the salt-inducible kinases controls the interconversion of classically activated and regulatory macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16986-16991.
- Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cline, G. W. 2014. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, 513(7519), 559-563.

- Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., Werb, Z. 2000. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103(3), 481-490.
- Coussens, L. M., Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Firestein, G. S. 2003. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, 112(5), 645-657.
- Dave, S. S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., Miller, T. P. 2004. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *New England Journal of Medicine*, 351(21), 2159-2169.
- De Palma, M., Mazzieri, R., Politi, L. S., Pucci, F., Zonari, E., Sitia, G., Falini, A. 2008. Tumor-targeted interferon- α delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer cell*, 14(4), 299-311.
- De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi, L. S., Politi, L. S., Sampaolesi, M., Naldini, L. 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer cell*, 8(3), 211-226.
- Deepak, P., Kumar, S., Acharya, A. 2007. Interleukin-13-induced type II polarization of inflammatory macrophages is mediated through suppression of nuclear factor- κ B and preservation of I κ B α in a T cell lymphoma. *Clinical and experimental immunology*, 149(2), 378.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M. 2006. Innate immunity. In: Roitt's Essential Immunology, Eleventh Edition, USA, Blackwell publishing, p.: 1-20.
- Dentin, R., Liu, Y., Koo, S. H., Hedrick, S., Vargas, T., Heredia, J., Montminy, M. 2007. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature*, 449(7160), 366-369.
- Dialynas, D. Tan, P. Huhn, G. Yu, J. 1997. Characterization of a new human macrophage cell line 2MAC. *The Journal of Cellular Immunology* 177:182-193.
- Dockrell, D. Daigneault, M. Preston, J. Marriot, H. Whyte, M. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA- Stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 5(1):e8668.

- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Mulligan, R. C. 1993. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(8), 3539-3543.
- Du, J., Chen, Q., Takemori, H., Xu, H. 2008. SIK2 can be activated by deprivation of nutrition and it inhibits expression of lipogenic genes in adipocytes. *Obesity*, 16(3), 531-538.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., Miyazono, K. 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12477-12480.
- Egeblad, M., Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 161-174.
- Eguchi, J., Wang, X., Yu, S., Kershaw, E. E., Chiu, P. C., Dushay, J., Rosen, E. D. 2011. Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell metabolism*, 13(3), 249-259.
- Erten G. 2007. Ek II, Camcıoğlu Y., Deniz G. Editörler, Temel İmmünoloji (çeviri), 1. Baskı, İstanbul, İstanbul medikal yayıncılık, 263-291.
- Escribese, M. M., Casas, M., Corbí, Á. L. 2012. Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization. *Immunobiology*, 217(12), 1233-1240.
- Fang, H. Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S. B., Biswas, S. K., Harris, A. L., Greten, F. R. 2009. Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*, 114(4), 844-859.
- Feldman, J. D., Vician, L., Crispino, M., Hoe, W., Baudry, M., Herschman, H. R. 2000. The salt-inducible kinase, SIK, is induced by depolarization in brain. *Journal of neurochemistry*, 74(6), 2227-2238.
- Fleetwood, A. J., Dinh, H., Cook, A. D., Hertzog, P. J., Hamilton, J. A. 2009. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *Journal of leukocyte biology*, 86(2), 411-421.
- Gartner, L. P., Hiatt, J. L. 2001. Colour textbook of histology. London: WB Saunders.

- Giraudo, E., Inoue, M., Hanahan, D. 2004. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 114(5), 623-633.
- Gordon, S., Martinez, F. O. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604.
- Gordon, S., Taylor, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 953-964.
- Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Kannookadan, S., Ochsenreiter, M., Popova, A., Yu, X., Goerdt, S. 2008. Activation of a TGF- β -specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF- β receptor II. *The Journal of Immunology*, 180(10), 6553-6565.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 87(1), 99-109.
- Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. A., Kulbe, H., Thompson, R. G., Balkwill, F. R. 2008. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *The Journal of experimental medicine*, 205(6), 1261-1268.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hansen, G., Hercus, T. R., McClure, B. J., Stomski, F. C., Dottore, M., Powell, J., McKinstry, W. J. 2008. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*, 134(3), 496-507.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., Hawley, S. A. 2012. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chemistry & biology*, 19(10), 1222-1236.
- Harris, J., Hope, J. C., Lavelle, E. C. 2009. Autophagy and the immune response to TB. *Transboundary and emerging diseases*, 56(6-7), 248-254.
- Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Nonaka, Y. 2003. Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18440-18447.
- Hotchkiss, K. A., Ashton, A. W., Klein, R. S., Lenzi, M. L., Zhu, G. H., Schwartz, E. L. 2003. Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the

- angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration. *Cancer research*, 63(2), 527-533.
- Imtiyaz, H. Z., Williams, E. P., Hickey, M. M., Patel, S. A., Durham, A. C., Yuan, L. J., Simon, M. C. 2010. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 120(8), 2699-2714.
- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A. R., van Aalten, D. M., Alessi, D. R. 2006. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochemical Journal*, 394(3), 545-555.
- Karin, M., Greten, F. R. 2005. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 749-759.
- Katoh, Y., Takemori, H., Horike, N., Doi, J., Muraoka, M., Min, L., Okamoto, M. 2004. Salt-inducible kinase (SIK) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 217(1), 109-112.
- Katoh, Y., Takemori, H., Horike, N., Doi, J., Muraoka, M., Min, L., Okamoto, M. 2004. Salt-inducible kinase (SIK) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 217(1), 109-112.
- Katoh, Y., Takemori, H., Min, L., Muraoka, M., Horike, N., Okamoto, M. 2004. Salt-inducible kinase-1 represses cAMP response element-binding protein activity both in the nucleus and in the cytoplasm. *European Journal of Biochemistry*, 271(21), 4307-4319.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., Wrana, J. L. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Molecular cell*, 6(6), 1365-1375.
- Kigerl, K. A., Gensel, J. C., Ankeny, D. P., Alexander, J. K., Donnelly, D. J., Popovich, P. G. 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 29(43), 13435-13444.
- Klimp, A. H., Hollema, H., Kempinga, C., van der Zee, A. G., de Vries, E. G., Daemen, T. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in

- human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer research*, 61(19), 7305-7309.
- Knowles, H. J., Mole, D. R., Ratcliffe, P. J., Harris, A. L. 2006. Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1. *Cancer research*, 66(5), 2600-2607.
- Koo, S. H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreaton, R. A., Jeffries, S., Takemori, H. 2005. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437(7062), 1109-11.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Udalova, I. A. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology*, 12(3), 231-238.
- Krecicki, T., Zalesska-Krecicka, M., Jelen, M., Szkudlarek, T., Horobiowska, M. 2001. Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 26(6), 469-472.
- Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., Zhu, G., Wei, S., Mottram, P., Lackner, A. 2006. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *The Journal of experimental medicine*, 203(4), 871-881.
- Kütükçüler N. 2007. Hüresel İmmüitenin Efektör Mekanizmaları, Camcıoğlu Y., Deniz G. Editörler, Temel İmmünoloji (çeviri), 1. Baskı, İstanbul, İstanbul medikal yayıncılık, 105-123.
- Lawrence, T., Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willoughby, D. A. 2001. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nature medicine*, 7(12), 1291-1297.
- Lawrence, T., Natoli, G. 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews immunology*, 11(11), 750-761.
- Lee, M., Dialynas, D. Shao, L. Tan, P. Yu, J. 1997. Phenotypic and functional characterization of a new macrophage cell line K1m demonstrating immunophagocytic activity and signaling through HLA class II. *The Journal of Immunology* 90: 470-476.

- Leek, R. D., Lewis, C. E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., Harris, A. L. 1996. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer research*, 56(20), 4625-4629.
- Lehtonen, A., Ahlfors, H., Veckman, V., Miettinen, M., Lahesmaa, R., Julkunen, I. 2007. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 82(3), 710-720.
- Lewis, C. E., Pollard, J. W. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research*, 66(2), 605-612.
- Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Pollard, J. W. 2006. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer research*, 66(23), 11238-11246.
- Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., Pollard, J. W. 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine*, 193(6), 727-740.
- Lin, X. Z., Takemori, H., Doi, J., Katoh, Y., Okamoto, M. 2000. Sik (Salt-Inducible Kinase): Regulation of Acth-Mediated Steroidogenic Gene Expression and Nuclear/Cytosol Re-Distribution. *Endocrine research*, 26(4), 995-1002.
- Liu, Y., Stewart, K. N., Bishop, E., Marek, C. J., Kluth, D. C., Rees, A. J., Wilson, H. M. 2008. Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*, 180(9), 6270-6278.
- Lizcano, J. M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N. A., Boudeau, J., Alessi, D. R. 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *The EMBO journal*, 23(4), 833-843.
- Lombardi, M. S., Gilliéron, C., Dietrich, D., Gabay, C. 2016. SIK inhibition in human myeloid cells modulates TLR and IL-1R signaling and induces an anti-inflammatory phenotype. *Journal of leukocyte biology*, 99(5), 711-721.
- Lönn, P., Vanlandewijck, M., Raja, E., Kowanetz, M., Watanabe, Y., Kowanetz, K., Moustakas, A. 2012. Transcriptional induction of salt-inducible kinase 1 by transforming growth factor β leads to negative regulation of type I receptor signaling in cooperation with the Smurf2 ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 12867-12878.

- Luan, B., Goodarzi, M. O., Phillips, N. G., Guo, X., Chen, Y. D. I., Yao, J., Montminy, M. 2014. Leptin-mediated increases in catecholamine signaling reduce adipose tissue inflammation via activation of macrophage HDAC4. *Cell metabolism*, 19(6), 1058-1065.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., Saltiel, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, 117(1), 175-184.
- Luster, A. D. 1998. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*, 338(7), 436-445.
- Luzina, I. G., Keegan, A. D., Heller, N. M., Rook, G. A., Shea-Donohue, T., Atamas, S. P. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. *Journal of leukocyte biology*, 92(4), 753-764.
- MacKenzie, K. F., Clark, K., Naqvi, S., McGuire, V. A., Nöhren, G., Kristariyanto, Y., Pedrioli, P. G. 2013. PGE2 induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A–SIK–CRTC3 pathway. *The Journal of Immunology*, 190(2), 565-577.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., Sica, A. 2004. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 14, No. 3, pp. 155-160). Academic Press.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L. 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology today*, 13(7), 265-270.
- Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M., Biswas, S. K. 2011. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: New vistas and open questions. *European journal of immunology*, 41(9), 2522-2525.
- Mantovani, A., Romero, P., Palucka, A. K., Marincola, F. M. 2008. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *The Lancet*, 371(9614), 771-783.

- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, 23(11), 549-555.
- Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*, 27, 451-483.
- Martinez, F. O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B. N., Draijer, C., Ten Hacken, N. H. 2013. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*, 121(9), e57-e69.
- Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C., Oppenheim, J. J. 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *The Journal of experimental medicine*, 169(4), 1485-1490.
- Mills, C. 2012. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Critical Reviews™ in Immunology*, 32(6).
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., Hill, A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166-6173.
- Minafra, L., Di Cara, G., Albanese, N. N., Cancemi, P. 2011. Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leukemia research*, 35(2), 226-236.
- Monti, P., Leone, B. E., Marchesi, F., Balzano, G., Zerbi, A., Scaltrini, F., Di Carlo, V. 2003. The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer research*, 63(21), 7451-7461.
- Mosser, D. M. 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*, 73(2), 209-212.
- Mosser, D. M., Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology*, 8(12), 958-969.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., ... & Van Ginderachter, J. A. (2010). Different tumor microenvironments contain

- functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes. *Cancer research*, 70(14), 5728-5739.
- Mukundan, L., Odegaard, J. I., Morel, C. R., Heredia, J. E., Mwangi, J. W., Ricardo-Gonzalez, R. R., Nguyen, K. D. 2009. PPAR- δ senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nature medicine*, 15(11), 1266-1272.
- Murdoch, C., Giannoudis, A., Lewis, C. E. 2004. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 104(8), 2224-2234.
- Murdoch, C., Lewis, C. E. 2005. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *International Journal of Cancer*, 117(5), 701-708.
- Murray P ,Rosenthal K., Faller M., 2016. Elements of host protective responses, *Medical Microbiology*,8. Edition, 33-44.
- Murray, P., Rosenthal, K., Faller, M. 2016. Innate Host Responses, *Medical Microbiology*,8. Edition, 45-58.
- Nagakawa, Y., Aoki, T., Kasuya, K., Tsuchida, A., Koyanagi, Y. 2002. Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer. *Pancreas*, 24(2), 169-178.
- Narayana, Y., Balaji, K. N. 2008. NOTCH1 up-regulation and signaling involved in Mycobacterium bovis BCG-induced SOCS3 expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), 12501-12511.
- Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T., Bernasconi, S., Balkwill, F. R. 1995. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2391.
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., Paul, W. E. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology*, 17(1), 701-738.
- Nevala, W. K., Vachon, C. M., Leontovich, A. A., Scott, C. G., Thompson, M. A., Markovic, S. N., Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. 2009. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 15(6), 1931-1939.

- Nizet, V., Johnson, R. S. 2009. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(9), 609-617.
- O'Shea, J. J., Paul, W. E. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 327(5969), 1098-1102.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Chawla, A. 2007. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447(7148), 1116-1120.
- Orr, J. S., Puglisi, M. J., Ellacott, K. L., Lumeng, C. N., Wasserman, D. H., Hasty, A. H. 2012. Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes*, 61(11), 2718-2727.
- Otte, A., Mandel, K., Reinstrom, G., Hass, R. 2011. Abolished adherence alters signaling pathways in phorbol ester-induced human U937 cells. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 1.
- Ozanne, J., Prescott, A. R., & Clark, K. 2015. The clinically approved drugs dasatinib and bosutinib induce anti-inflammatory macrophages by inhibiting the salt-inducible kinases. *Biochemical Journal*, 465(2), 271-279.
- Pagliara, P., Lanubile, R., Dwikat, M., Abbro, L., Dini, L. 2005. Differentiation of monocytic U937 cells under static magnetic field exposure. *European journal of histochemistry: EJH*, 49(1), 75.
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Hiller, W. 2004. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(27), 2817-2826.
- Parham, P. 2009. *The Immune System (Third Edition)*. Garland Publishing Incorporated. 1- 608.
- Park-Min, K. H., Antoniv, T. T., Ivashkiv, L. B. 2005. Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology*, 210(2), 77-86.
- Parslow, T.G., Stites, D.B., Terr, A.I., Imboden, JB. 2001. *Medical Immunology*. Mc Graw Hill, Newyork, USA.
- Pawelek, J. M., Chakraborty, A. K. 2008. Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 377-386.

- Pollard, J. W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 71-78.
- Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., Benveniste, E. N. 2012. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *The Journal of Immunology*, 189(7), 3439-3448.
- Raes, G., Van den Bergh, R., De Baetselier, P., Ghassabeh, G. H. 2005. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *The Journal of immunology*, 174(11), 6561-6562.
- Raetz, C. R., Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71, 635.
- Rauh, M. J., Sly, L. M., Kalesnikoff, J., Hughes, M. R., Cao, L. P., Lam, V., Krystal, G. 2004. The role of SHIP1 in macrophage programming and activation. *Biochemical Society Transactions*, 32(5), 785-788.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Karin, M. 2008. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature*, 453(7196), 807-811.
- Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B., Lemke, G. 2007. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*, 131(6), 1124-1136.
- Rothwell, P. M., Wilson, M., Price, J. F., Belch, J. F., Meade, T. W., Mehta, Z. 2012. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *The Lancet*, 379(9826), 1591-1601.
- Saccani, A., Schioppa, T., Porta, C., Biswas, S. K., Nebuloni, M., Vago, L., Sica, A. 2006. p50 nuclear factor- κ B overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer research*, 66(23), 11432-11440.
- Saenz, S. A., Taylor, B. C., Artis, D. 2008. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological reviews*, 226(1), 172-190.
- Salcedo, R., Wasserman, K., Young, H. A., Grimm, M. C., Howard, O. Z., Anver, M. R., Oppenheim, J. J. 1999. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial

- cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α . *The American journal of pathology*, 154(4), 1125-1135.
- Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., Colombo, M. P. 2008. Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer research*, 68(21), 9050-9059.
- Sanosaka, M., Fujimoto, M., Ohkawara, T., Nagatake, T., Itoh, Y., Kagawa, M., Takemori, H. 2015. Salt-inducible kinase 3 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of pro-inflammatory molecules in mice. *Immunology*, 145(2), 268-278.
- Sasagawa, S., Takemori, H., Uebi, T., Ikegami, D., Hiramatsu, K., Ikegawa, S., Tsumaki, N. 2012. SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. *Development*, 139(6), 1153-1163.
- Sasaki, T., Takemori, H., Yagita, Y., Terasaki, Y., Uebi, T., Horike, N., Hatano, O. 2011. SIK2 is a key regulator for neuronal survival after ischemia via TORC1-CREB. *Neuron*, 69(1), 106-119.
- Sauer, R. S., Hackel, D., Morschel, L., Sahlbach, H., Wang, Y., Mousa, S. A., Rittner, H. L. 2014. Toll like receptor (TLR)-4 as a regulator of peripheral endogenous opioid-mediated analgesia in inflammation. *Molecular pain*, 10(1), 1.
- Scarpino, S., Stoppacciaro, A., Ballerini, F., Marchesi, M., Prat, M., Stella, M. C., Ruco, L. P. 2000. Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells. *The American journal of pathology*, 156(3), 831-837.
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Mantovani, A. 2003. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *The Journal of experimental medicine*, 198(9), 1391-1402.
- Schoppmann, S. F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kerjaschki, D. 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *The American journal of pathology*, 161(3), 947-956.
- Schutysse, E., Struyf, S., Proost, P., Opdenakker, G., Laureys, G., Verhasselt, B., Mantovani, A. 2002. Identification of biologically active chemokine isoforms

- from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24584-24593.
- Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., Dieter, P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of leukocyte biology*, 59(4), 555-561.
- Scott, M. G., Vreugdenhil, A. C., Buurman, W. A., Hancock, R. E., Gold, M. R. 2000. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *The Journal of Immunology*, 164(2), 549-553.
- Screaton, R. A., Conkright, M. D., Katoh, Y., Best, J. L., Canettieri, G., Jeffries, S., Okamoto, M. 2004. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium-and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell*, 119(1), 61-74.
- Semenza, G. L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews cancer*, 3(10), 721-732.
- Sharma, N., Lu, Y., Zhou, G., Liao, X., Kapil, P., Anand, P., Jain, M. K. 2012. Myeloid Krüppel-like factor 4 deficiency augments atherogenesis in ApoE^{-/-} mice—brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(12), 2836-2838.
- Shaw, R. J. 2009. Tumor suppression by LKB1: SIK-ness prevents metastasis. *Science signaling*, 2(86), pe55-pe55.
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., Cantley, L. C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3329-3335.
- Shimichitsutsui, K. Y., Suzuki, K., Tahara, K. 2005. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology reports*, 14, 425-431.
- Shirey, K. A., Pletneva, L. M., Puche, A. C., Keegan, A. D., Prince, G. A., Blanco, J. C., Vogel, S. N. 2010. Control of RSV-induced lung injury by alternatively

- activated macrophages is IL-4R α -, TLR4-, and IFN- β -dependent. *Mucosal immunology*.
- Sica, A., Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*, 122(3), 787-795.
- Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., Van Damme, J., Mantovani, A. 2000. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- κ B activation in tumor-associated macrophages. *The Journal of Immunology*, 164(2), 762-767.
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European journal of cancer*, 42(6), 717-727.
- Sjöström, M., Stenström, K., Eneling, K., Zwiller, J., Katz, A. I., Takemori, H., Bertorello, A. M. 2007. SIK1 is part of a cell sodium-sensing network that regulates active sodium transport through a calcium-dependent process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 16922-16927.
- Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B. J., Teh, T., Kemp, B. E. 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 611-614.
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Bast, M. A. 2010. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 362(10), 875-885.
- Stout, R. D., Watkins, S. K., Suttles, J. 2009. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 86(5), 1105-1109.
- Strieter, R. M., Poverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Chan, S. Y. 1995. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27348-27357.
- Sun, Z., Yao, Z., Liu, S., Tang, H., Yan, X. 2006. An oligonucleotide decoy for Stat3 activates the immune response of macrophages to breast cancer. *Immunobiology*, 211(3), 199-209.

- Sundström, C., Nilsson, K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International journal of cancer*, 17(5), 565-577.
- Takemori, H., KATOH HASHIMOTO, Y., Nakae, J., Olson, E. N., Okamoto, M. 2009. Inactivation of HDAC5 by SIK1 in AICAR-treated C2C12 myoblasts. *Endocrine journal*, 56(1), 121-130.
- Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D., Gordon, S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 901-944.
- Torrado, E., Cooper, A. M. 2013. Cytokines in the balance of protection and pathology during mycobacterial infections. In *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis* (pp. 121-140). Springer New York.
- Tripathi, C., Tewari, B. N., Kanchan, R. K., Baghel, K. S., Nautiyal, N., Shrivastava, R., Bhadauria, S. 2014. Macrophages are recruited to hypoxic tumor areas and acquire a pro-angiogenic M2-polarized phenotype via hypoxic cancer cell derived cytokines Oncostatin M and Eotaxin. *Oncotarget*, 5(14), 5350-5368.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26(2), 171-176.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M. 2004. İmmünoloji, Asya Mikrobiyoloji, 4. Baskı, Asya Tıp Kitabevi, 563-627.
- Uebi, T., Itoh, Y., Hatano, O., Kumagai, A., Sanosaka, M., Sasaki, T., Morii, E. 2012. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PloS one*, 7(5), e37803.
- Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Matsushima, K. 2000. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(8), 3282-3289.
- Vega, M. A., Corbí, A. L. 2006. Human macrophage activation: too many functions and phenotypes for a single cell type. *Immunologia*, 25(4), 248-272.
- Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Hoeve, M. A., Kramer, M., Vaisberg, E., Ottenhoff, T. H. 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote

- but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13), 4560-4565.
- Wang, N., Liang, H., Zen, K. 2015. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1–m2 polarization balance. *M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease*, 230.
- Wang, Y. C., He, F., Feng, F., Liu, X. W., Dong, G. Y., Qin, H. Y., Liang, Y. M. 2010. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer research*, 70(12), 4840-4849.
- Wang, Z. N., Takemori, H., Halder, S. K., Nonaka, Y., Okamoto, M. 1999. Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS letters*, 453(1), 135-139.
- Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A., O'Shea, J. J. 2003. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & growth factor reviews*, 14(5), 361-368.
- Whyte, C. S., Bishop, E. T., Ruckerl, D., Gaspar-Pereira, S., Barker, R. N., Allen, J. E., Wilson, H. M. 2011. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of leukocyte biology*, 90(5), 845-854.
- Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J. F., Goswami, S., Stanley, E. R., Condeelis, J. 2007. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer research*, 67(6), 2649-2656.
- Yong Kim, S., Jeong, S., Chah, K. H., Jung, E., Baek, K. H., Kim, S. T., Lee, K. Y. 2013. Salt-inducible kinases 1 and 3 negatively regulate Toll-like receptor 4-mediated signal. *Molecular Endocrinology*, 27(11), 1958-1968.
- Zhang, Q. W., Liu, L., Gong, C. Y., Shi, H. S., Zeng, Y. H., Wang, X. Z., Wei, Y. Q. 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one*, 7(12), e50946.
- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIK1&keywords=SIK1>. 2016
- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIK2&keywords=SIK2>. 2016
- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIK3&keywords=SIK3>. 2016