

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

**TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ RESEPTÖR 1'İN (TNFR1)
SİNYAL İLETİM MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Fatma Zehra HAPİL

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

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

**TÜMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ RESEPTÖR 1'İN (TNFR1)
SİNYAL İLETİM MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Fatma Zehra HAPİL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1272 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 13/02/2017

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Özgül ALPER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Sadi KÖKSOY
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Mehmet ÖZTÜRK
Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Işık YULUĞ
İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi

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

Prof.Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Fatma Zehra HAPİL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ
İmza

TEŞEKKÜR

Biraz yorucu, bol kahkahalı, arada gözyaşlı, bazen bezdiren, bazen şevke getiren bir sürecin ardından doktora tezime hazır. Bu sürecin sonunda, teşekkür borçlu olduğum birçok insan var:

Herkesten önce, beni öğrencisi olarak kabul ettiği günden bu yana bir çırak gibi yetiştiren, hem ustam, hem hocam olan Prof.Dr. Osman Nidai Özeş'e teşekkür etmeliyim. Kendisine bir ömür boyu minnettar kalacağım.

Doktora tez sınavım için beni kırmayıp gelen sayın hocalarım Prof.Dr. Mehmet Öztürk ve Doç.Dr. Işık Yuluğ'a; hem sınav jürim olmayı kabul ettikleri, hem de lisans eğitimimizde bize vizyon kazandırdıkları için; Doktora jürimde ve tez izleme komitemde yer alan sayın hocalarım Prof.Dr. Özgül Alper'e ve Prof.Dr. Sadi Köksoy'a; yedek jüri üyelerimiz Prof.Dr. Hakan Akça ile kendisine açık bir hayranlık beslediğim Prof.Dr. Ahter Dilşad Şanlıoğlu'na; Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Sibel Berker Karazüm'e ve Yüksek Lisans/Doktora aşamasında kendilerinden ders aldığım ya da almadığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Hepsini tek tek çok sevdiğim Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü asistanları ve teknik ekibine; Turhan Abi başta olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına; günlerimizi güzel kılan, SBAUM ve Doku Tipleme ekibine;

Neşesiyle deneylere renk katan atom karınca Ece Çopuroğlu'na; hafta içi hafta sonu demeden ne zaman başım sıkışsa imdadıma yetişen Ufuk Mert'e; isterse olduramayacağı iş olmayan Mustafa Gökhan Ertosun'a; her ihtiyacım olduğunda yardımına koşan sevgi pıtırıcığımız Özlem Yılmaz'a; dostluklarına paha biçemeyeceğim Ufuk Mert, Melisa Arısoy ve Merve Duman'a;

“Olur öyle bazen” doktoramın ilk yılına;

Bebeler'e ve bütün bu süreçte bana destek olmuş fakat isimlerini tek bir sayfaya sığdıramayacağım bütün arkadaşlarıma;

Ve her zaman yanımda duran, hangi deneyin neden yapıldığını bile takip etmek zorunda kalan, en büyük destekçilerim, annem Melek Hatice Hapil, babam Muammer Hapil, ablam Nisanur Şükran, kardeşlerim Rabia Seher ve Mehmet Kağan'a sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Amaç: TNF- α , birçok farklı etki gösteren bir sitokin olup, etkilerinin çoğunu TNFR1 sayesinde sağlamaktadır. TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonu, kaspaz aktivasyonu ve nekroptoz indüksiyonu üzerinde pek çok çalışma yapılmış olduğu halde TNFR1 aracılı ERK, Akt ve Stat3 aktivasyonları henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. TNFR1'in c-Src ve JAK2 gibi tirozin kinazlara bağlandığı bilinmekte fakat tirozin fosforilasyonu hakkında bir veri bulunmamaktadır. Tez çalışmamızda, TNFR1-JAK2 arasındaki ilişkinin TNFR1 tirozin fosforilasyonuna yol açıp açmadığını, eğer TNFR1 tirozin fosforilasyonuna uğruyorsa bunun TNF- α aracılı ERK, Akt, p38, JNK, Stat3 ve CREB aktivasyonlarını nasıl etkilediğini belirlemeyi amaçladık.

Yöntem: TNFR1'in JAK2 ve PKA tarafından fosforile edildiği *in vitro* kinaz reaksiyonu ile gösterildikten sonra, potansiyel JAK2 ve PKA fosforilasyon motifleri site directed mutagenesis ile A ve D aminoasitlerine dönüştürüldü. Bu mutantların ERK, p38, JNK, Akt, Stat3, CREB, IRS-1 aktivasyon fosforilasyonlarına etkileri western blot ile; Grb2, p85, Stat3 bağlanmasına olan etkileri co-immunopresipitasyonla; NF- κ B aktivasyonuna etkileri NF-Luc lusiferaz reporter sistemi ile, apoptotik sürece etkisi kolorimetrik kaspaz aktivasyon ölçümü ile, hücre sağkalımına etkisi MTT ve TNFR1 salınımına etkisi ELISA ile belirlendi.

Bulgular: TNFR1, JAK2 ve PKA tarafından fosforile edilmekte, PKA fosforilasyonu JAK2 aracılı tirozin fosforilasyonunu baskılamaktadır. TNFR1'in Y401'den tirozin fosforilasyonu TNFR1 sinyalizomunda Grb2, p85 ve Stat3 bağlantısını kuvvetlendirmekte; ERK ve Akt aktivasyon fosforilasyonlarını arttırmakta, Stat3'ün ise DNA bağlanmasını kuvvetlendirmektedir. TNFR1'in Y360 noktasından fosforilasyonu, CREB ve Stat3 fosforilasyonunu arttırmakta, Y360A mutanı ise JNK ve p38 aktivasyonuna yol açmaktadır. Y401D mutanı ile transfekte hücrelerde, kaspaz aktivasyonu, NF- κ B indüksiyon kapasitesi ve hücre sağkalımı düşük bulunmuştur. IRS-1 tirozin fosforilasyonu, TNFR1'in tirozin fosforilasyonundan da, PKA tarafından fosforilasyonundan da negatif etkilenmektedir.

Sonuç: TNFR1, PKA ve JAK2 tarafından fosforile edilmekte; PKA fosforilasyonu tirozin fosforilasyonunu baskılayıcı etki göstermektedir. TNFR1 fosforilasyonları, TNF- α aracılı ERK, Akt, Stat3, p38, JNK, CREB aktivasyonları ve IRS-1 tirozin fosforilasyonunu farklı şekillerde düzenlemektedir.

Anahtar Kelimeler: TNF- α , TNFR1, JAK2, PKA

ABSTRACT

Objective: TNF- α , which is a pleiotropic cytokine, exerts most of its effects through its receptor TNFR1. Although there are numerous studies on TNF- α -mediated inductions of NF- κ B pathway, apoptosis and necroptosis; the mechanisms of TNFR1-mediated ERK, Akt and Stat3 activation pathways have not clearly been described yet. TNFR1 is known to interact with tyrosine kinases c-Src and JAK2, however, whether TNFR1 is phosphorylated on tyrosine residues by one of these kinases was not known. In this study, we aimed to reveal whether TNFR1-JAK2 interaction leads to tyrosine phosphorylation of TNFR1, and if so, to elucidate its effect on TNF- α mediated ERK, Akt, p38, JNK, Stat3 and CREB activations.

Method: Following in vitro kinase reactions which revealed phosphorylation of TNFR1 by JAK2 and PKA; corresponding Y and T residues on putative phosphorylation motifs were substituted with phosphorylation-mimicking D and non-phosphorylatable A residues. The influence of these mutations on ERK, p38, JNK, Akt, Stat3, CREB and IRS-1 activation phosphorylations were explored by western blot and the impact on physical interactions between TNFR1 and Grb2, p85 and Stat3 were investigated by co-immunoprecipitation. NF- κ B activation was measured by NF-Luc luciferase reporter system, influence on apoptosis was measured by colorimetric caspase-3 and caspase-8 activation assays, and impact on cell survival and TNFR1 shedding were determined by MTT and ELISA, respectively.

Results: Our results indicate that TNFR1 is phosphorylated by JAK2 and PKA. However, PKA-mediated phosphorylation inhibits JAK2-mediated tyrosine phosphorylation. Y401 phosphorylation of TNFR1 strengthens Grb2, p85, and Stat3 binding; increases both ERK and Akt activation phosphorylations and DNA binding of Stat3. Y360 phosphorylation of TNFR1 increases CREB and Stat3 phosphorylations, while Y360A mutation leads to JNK and p38 activation. In cells transfected with Y401D mutants; caspase activation, NF- κ B induction, and cell survival were found to be diminished. IRS-1 tyrosine phosphorylation was found to be negatively affected by both tyrosine and PKA phosphorylation of TNFR1.

Conclusion: TNFR1 is phosphorylated by both JAK2 and PKA, and PKA phosphorylation attenuates TNFR1 tyrosine phosphorylation. TNFR1 phosphorylations differentially regulate TNF- α mediated ERK, Akt, Stat3, p38, JNK and CREB activations, as well as IRS-1 tyrosine phosphorylation.

Key words: TNF- α , TNFR1, JAK2, PKA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Tumor Nekroz Faktörü (TNF)	2
2.2 TNF- α Reseptörleri	4
2.3 TNFR1, Yapısı ve Sinyal İletimi	5
2.3.1 TNFR1 aracılı Sphingomyelinaz Aktivasyonu	7
2.3.2. TNFR1 aracılı NF- κ B Aktivasyonu	8
2.3.3. TNFR1 aracılı Apoptosis İndüksiyonu	12
2.3.4. TNFR1 aracılı Nekroptosis	15
2.3.5. TNFR1 aracılı MAPK Aktivasyon Yolağı	17
2.3.6. TNFR1 aracılı JAK/STAT Yolağı	20
2.3.7. TNFR1 aracılı PI3K/Akt Yolağı	21
2.3.8. TNFR1 ve Protein Kinaz A	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1 Malzemeler ve Solüsyonlar	23
3.2. Hücre Kültürü	27
3.3. İnsan TNFR1 plazmidinin, tirozin fosforilasyon ve PKA fosforilasyon mutantlarının E. coli DH5 α suşuna transformasyonu	27
3.3.1 Kompetan Hücre Yapımı	27
3.3.2 Kompetan hücelere plazmidlerin transformasyonu	28
3.3.3 Yabancı tip ve mutant TNFR1 ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş bakterilerden gliserol stok oluşturulması	28
3.4. Plazmid İzolasyonu	28
3.5. TNFR1 geninin PCR yöntemi ile çoğaltılması	29
3.5.1. PCR Reaksiyonu, İçeriğı ve Koşulları	29
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	29
3.6.1 %1,5'lik Agaroz Jelin Hazırlanması	29
3.6.2 Agaroz Jelin Yürütülmesi ve Görüntüleme	30
3.7. Sanger Dizileme	30
	iii

3.7.1	PCR pürifikasyonu	30
3.7.2	Sekans Reaksiyonu	30
3.7.3	Sekans Reaksiyonunun Ethanol Presipitasyonu ile Saflaştırılması	31
3.7.4	Sekans Ürünlerinin Cihaza Yüklenmesi	31
3.8.	HEK293T Hücrelerinin CaPO ₄ Presipitasyonu Yöntemi ile Transfeksiyonu	31
3.9.	HEK293T Hücrelerinin TNF- α ile muamelesi	31
3.10.	Western Blot için Hücre Lizatı Hazırlanması	32
3.11.	Stat3 Gel Shift (EMSA) İçin Hücre Lizatı Hazırlanması	32
3.12.	Kaspaz Aktivasyon Deneyi için Hücre Lizatı Hazırlanması	32
3.13.	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Bradford)	33
3.14.	Immunopresipitasyon (IP)	33
3.15.	Western Blot (WB)	34
3.15.1	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için jelin hazırlanması	34
3.15.2	Örneklerin jelde yürütülmesi	34
3.15.3	SDS-PAGE'de Yürütülmüş Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	34
3.15.4	PVDF Membranın İşaretlenmesi	35
3.15.5	Strip Off İşlemi	36
3.16.	<i>In Vitro</i> Kinaz Reaksiyonu	36
3.16.1	JAK2 <i>In Vitro</i> Kinaz Reaksiyonu	36
3.16.2	PKA <i>In Vitro</i> Kinaz Reaksiyonu	36
3.17.	Stat3 Gel Shift (EMSA) Yöntemi	37
3.17.1	%5'lik Akrilamid/Bisakrilamid Jelin Dökülmesi	37
3.17.2	Stat3 Bağlanma Reaksiyonunun Kurulması	37
3.17.3	Jele Yükleme ve Transfer	38
3.17.4	UV cross-link ve işaretleme	38
3.18.	Kaspaz Aktivasyon Deneyleri	39
3.19.	NF- κ B Aktivasyonunun Belirlenmesi	39
3.20.	MTT Canlılık Testi	39
3.21.	TNFR1 ELISA	40
3.22.	Veritabanı Analizi	41
3.23.	Grafikler ve İstatistiksel Analizler	41
4.	BULGULAR	42
4.1	TNFR1 Aminoasit Diziliminin İncelenmesi ile Potansiyel Fosforilasyon Motiflerinin Belirlenmesi	42
4.2	TNFR1'in Tirozin Fosforilasyonuna Uğradığının Gösterilmesi	42
4.3.	TNFR1 Tirozin Fosforilasyonundan Sorumlu Tirozin Kinazın Belirlenmesi	43
4.3.1	TNFR1 ve JAK2 Arasındaki Fiziksel Etkileşimin Gösterilmesi	44
4.3.2	JAK2, TNFR1'i Direkt Olarak Fosforile Etmektedir.	44
4.4.	TNFR1 Tirozin Fosforilasyonu, PKA aktivatörü Forskolin Tarafından Baskılanmaktadır	45

4.5.	TNFR1'in, PKA tarafından Fosforile Edildiğinin Gösterilmesi	46
4.5.1	TNFR1 ve PKA Arasındaki Fiziksel Etkileşimin Gösterilmesi	46
4.5.2	TNFR1, PKA Tarafından Direkt Olarak Fosforile Edilmektedir	47
4.6.	Veritabanı Analizi ile TNFR1 Proteinini Üzerindeki Fosforilasyon Noktalarının Doğrulanması	48
4.7.	TNFR1 Proteinini Üzerindeki Potansiyel Tirozin Fosforilasyon ve PKA Fosforilasyon Noktalarının Aspartik Asit ve Alanin Mutantlarının Elde Edilmesi	49
4.8.	TNFR1 Mutantlarının Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi	53
4.9.	Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının TNFR1 Tirozin Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	54
4.10.	TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı ERK Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	55
4.10.1	TNF- α Aracılı ERK Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi	55
4.10.2	TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının ERK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	56
4.10.3	TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının ERK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	57
4.11.	TNFR1 Mutantlarının TNFR1 ve Grb2 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	58
4.11.1	TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve Grb2 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	59
4.11.2	Muhtemel PKA Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve Grb2 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	60
4.12.	TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı Akt Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	61
4.12.1	TNF- α Aracılı Akt Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi	62
4.12.2	TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının Akt Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	62
4.12.3	TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının Akt Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	63
4.13.	TNFR1 Mutantlarının TNFR1 ve p85 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	65
4.13.1	TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve p85 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	65
4.13.2	Muhtemel PKA Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve p85 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	66
4.14.	TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı p38 Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	67
4.14.1	TNF- α Aracılı p38 Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi	67

4.14.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının p38 Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	68
4.14.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının p38 Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	69
4.15. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı CREB Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	70
4.15.1 TNF- α Aracılı CREB Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi	70
4.15.2 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının CREB Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	70
4.15.3 TNFR1 Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının CREB Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	72
4.16. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı JNK Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	73
4.15.1 TNF- α Aracılı JNK Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi	73
4.16.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının JNK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	73
4.16.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının JNK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	75
4.17. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı Stat3 Y705 Fosforilasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	77
4.17.1 TNF Aracılı Stat3 Y705 Fosforilasyon Kinetiğinin Belirlenmesi	77
4.17.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının Stat3 Y705 Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	77
4.17.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının Stat3 Y705 Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi	78
4.18. TNFR1 Mutantlarının TNFR1-Stat3 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi	79
4.19. TNFR1 Mutantlarının Stat3'ün DNA'ya Bağlanma Kapasitesine Etkilerinin Belirlenmesi	81
4.19.1 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının Stat3'ün DNA'ya Bağlanma Kapasitesine Etkilerinin Belirlenmesi	82
4.19.2 TNFR1'in Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Stat3'ün DNA'ya Bağlanma Kapasitesine Etkilerinin Belirlenmesi	83
4.20. TNFR1 Mutantlarının İnsülin Sinyalleşmesine Etkilerinin Belirlenmesi	84
4.20.1 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının İnsülin Sinyalleşmesine Etkilerinin Belirlenmesi	84
4.20.2 TNFR1 Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının İnsülin Sinyalleşmesine Etkilerinin Belirlenmesi	86
4.21. TNFR1 Mutantlarının TNF Aracılı NF- κ B Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	87
4.22. TNFR1 Mutantlarının Hücre Sağ Kalımına Etkilerinin Belirlenmesi	89

4.23. TNFR1 Mutantlarının Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	91
4.24. TNFR1 Mutantlarının TNFR1 Salınımına (Shedding) Etkilerinin Belirlenmesi	93
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	116
KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	148

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1: TNFR1 aminoasit dizisi üzerindeki potansiyel post-translasyonel modifikasyon noktalarının gösterilmesi.	42
Şekil 4.2: TNFR1 tirozin fosforilasyonunun Western Blot ile gösterilmesi.	43
Şekil 4.3: TNFR1-JAK2 arasındaki fiziksel etkileşim.	44
Şekil 4.4: JAK2 in vitro kinaz reaksiyonu.	45
Şekil 4.5: Forskolin varlığında, TNF- α aracılı TNFR1 tirozin fosforilasyonu engellenmektedir.	46
Şekil 4.6: PKA ve TNFR1 birbirine bağlanmaktadır.	47
Şekil 4.7: TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyonunun in vitro kinaz reaksiyonu ile gösterilmesi.	48
Şekil 4.8: TNFR1 proteini üzerindeki post-translasyonel modifikasyonlar.	49
Şekil 4.9: Mutasyona uğratılmış TNFR1 ekspresyon vektörlerinde Y360, Y401, T411 ve T417 aminoasit kodonlarının Alanin ve Aspartik Asite dönüşümünü gösteren sekans sonuçları.	52
Şekil 4.10: Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra TNFR1 ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.	53
Şekil 4.11: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNFR1 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi.	54
Şekil 4.12: TNF- α aracılı ERK aktivasyon kinetiği (TNF Time Course).	56
Şekil 4.13: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı ERK aktivasyonuna etkisi.	57
Şekil 4.14: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı ERK aktivasyonuna etkisi.	58
Şekil 4.15: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNFR1 ile Grb2 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi.	60
Şekil 4.16: TNFR1 üzerindeki muhtemel PKA fosforilasyon nokta mutantlarının TNFR1-Grb2 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi.	61
Şekil 4.17: TNF aracılı Akt aktivasyon kinetiği (TNF time course).	62
Şekil 4.18: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı Akt aktivasyonuna etkisi	63

Şekil 4.19: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı Akt aktivasyonuna etkisi.	64
Şekil 4.20: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNFR1 ile p85 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi.	65
Şekil 4.21: TNFR1 üzerindeki muhtemel PKA fosforilasyon nokta mutantlarının TNFR1-p85 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi.	66
Şekil 4.22: TNF aracılı p38 aktivasyon kinetiği.	67
Şekil 4.23: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı p38 aktivasyonuna olan etkisi.	68
Şekil 4.24: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı p38 aktivasyonuna etkisi.	69
Şekil 4.25: TNF aracılı CREB aktivasyon kinetiği (TNF time course).	70
Şekil 4.26: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının CREB fosforilasyonuna etkisi.	71
Şekil 4.27: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının CREB fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi.	72
Şekil 4.28: TNF aracılı JNK aktivasyon kinetiği.	73
Şekil 4.29: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna olan etkisi.	74
Şekil 4.30: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna olan etkilerinin bütün fosfo-JNK bantları değerlendirilerek incelenmesi.	75
Şekil 4.31: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna etkisi.	76
Şekil 4.32: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna etkisinin bütün pJNK bantları dikkate alınarak değerlendirilmesi	76
Şekil 4.33: TNF aracılı Stat3 aktivasyon kinetiği (TNF time course).	77
Şekil 4.34: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı Stat3 aktivasyonuna etkisi	78
Şekil 4.35: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı Stat3 aktivasyonuna etkisi.	79
Şekil 4.36: TNFR1 tirozin mutantlarının TNFR1-Stat3 fiziksel etkileşimine etkilerinin belirlenmesi.	80

Şekil 4.37: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon mutasyonlarının TNFR1-Stat3 fiziksel etkileşimine etkilerinin belirlenmesi.	81
Şekil 4.38: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının Stat3 EMSA sonuçları.	82
Şekil 4.39: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının Stat3 EMSA sonuçları.	83
Şekil 4.40: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi.	85
Şekil 4.41: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi.	86
Şekil 4.42: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının NFkB aktivitesine etkisinin belirlenmesi.	87
Şekil 4.43: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının NFkB aktivitesine etkisinin belirlenmesi.	88
Şekil 4.44: Tirozin fosforilasyon mutantlarının hücre sağ kalımına etkilerinin belirlenmesi.	90
Şekil 4.45: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının hücre sağ kalımına etkilerinin belirlenmesi.	91
Şekil 4.46: Tirozin fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 3 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi	92
Şekil 4.47: Tirozin fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 8 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi	92
Şekil 4.48: Muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 3 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi	93
Şekil 4.49: Muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 8 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi	93
Şekil 4.50: Tirozin fosforilasyon mutantlarının TNFR1 salınımına etkilerinin belirlenmesi	94
Şekil 4.51: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNFR1 salınımına etkilerinin belirlenmesi	95
Şekil 5.1: TNFR1 fosforilasyonlarının TNFR1 aracılı ERK aktivasyonuna etkisinin şematik gösterimi.	102

Şekil 5.2: TNFR1 aracılı Akt Aktivasyonunun TNFR1 fosforilasyonları tarafından muhtemel düzenlenme mekanizmasının şematik gösterimi.	104
Şekil 5.3: TNFR1 tirozin fosforilasyonunun engellenmesinin Src bağlanmasına etkisi.	106
Şekil 5.4: TNFR1 tirozin fosforilasyonu, TAK1 aktivasyonunu engelliyor olabilir.	113
Şekil 5.5 : TNFR1 kompleksine Stat3'ün bağlanması, TRADD bağlanmasını engelliyor olabilir.	114

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: SDS-Poliakrilamid Jel Ölçüleri	34
Tablo 4.1: TNFR1 Tirozin mutantlarının NF-kB aktivasyonuna olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri	88
Tablo 4.2: TNFR1 PKA fosforilasyon mutantlarının NF-kB aktivasyonuna olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri	89
Tablo 4.3: TNFR1 Tirozin mutantlarının hücre sağkalımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri	90
Tablo 4.4: TNFR1 PKA fosforilasyon mutantlarının hücre sağkalımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri	91
Tablo 4.5: TNFR1 Tirozin mutantlarının TNFR1 salınımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri	94
Tablo 4.6: TNFR1 PKA fosforilasyon mutantlarının TNFR1 salınımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri	95

SİMGELER ve KISALTMALAR

a-SMase	: Asidik Sphingomyelinaz (Acidic Sphingomyelinase)
A	: Alanin (Ala)
Bcl-2	: B hücre lenfoma-2 (B cell lymphoma-2)
Bcl-XL	: B hücre lenfoma-XL (B cell lymphoma-Extra Large)
Bid	: BH3 interaksiyon bölgesi (BH3 interacting-domain)
C-terminal	: Karboksi uç
cAMP	: siklik adenzin monofosfat
cIAP	: hücresel apoptosis inhibitörü (cellular Inhibitor of Apoptosis)
CRD	: Sisteince zengin bölge (Cysteine Rich Domain)
CREB	: cAMP responsif element bağlanıcı protein (cAMP Response Element Binding protein)
CYLD	: Cyldromatosis geni ürünü protein, K63 deubikütinaz fonksiyonu görür.
D	: Aspartik Asit (Asp)
DD	: Ölüm bölgesi (death domain)
Dk	: dakika
ERK	: Ekstraselüler düzenlenen kinaz (Extracellular Regulated Kinase)
FADD	: FAS-ilişkili ölüm bölge proteini (FAS-Associated Death Domain protein)
FAN	: Nötral sphingomyelinaz aktivasyonu ilişkili faktör (Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation)

Grb2	: Büyüme reseptörü bağı protein (Growth Receptor Bound Protein)
HOIL-1	: Heme-oksidize IRP2 ligaz-1
HOIP	: HOIL-1 ilişkili protein (HOIL-1 interacting protein)
JAK2	: Janus Kinaz 2
JNK	: c-Jun N-terminal Kinaz
K	: Lizin (Lys)
kD	: kilo Dalton
LPS	: Lipopolisakkarid
LUBAC	: Linear ubiquitin chain assembly complex
MADD	: MAPK-aktive edici ölüm bölge protein (MAPK-Activating Death Domain protein)
MAPK	: Mitogen-Aktive Protein Kinaz
n-SMase	: Neutral Sphingomyelinaz
N-terminal	: Amino uç
NEMO	: NF κ B esansiyel modölatör (IKK γ)
NIK	: NF- κ B indükleyici Kinaz
PI	: Fosfotidilinozitol
PI3K	: Fosfotidilinozitol 3 Kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
RIP	: Reseptor-Interacting Serine/Threonine Kinaz-1
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
S	: Serin (Ser)

SAPK	: Stres Aktive Protein Kinaz (JNK)
SH2 bölgesi	: Src Homoloji 2 Bölgesi
SH3 bölgesi	: Src Homoloji 3 Bölgesi
SHARPIN	: SHANK associated RH domain interactor
SODD	: Ölüm Bölge susturucusu (Silencer of Death Domains)
Stat	: Signal transducer and activator of transcription
t-Bid	: Gütük Bid (truncated Bid)
T	: Threonine (Thr)
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
TNFR1	: TNF- α Reseptör 1
TRADD	: TNFR1 ilişkili ölüm bölge proteini (TNFR1-Associated Death Domain protein)
TRAF	: TNF reseptör ilişkili faktör (TNF Receptor Associated Factor)
UTR	: Untranslated Region
XIAP	: X-ilişkili apoptoz inhibitörü (X-linked Inhibitor of Apoptosis)
Y	: Tirozin (Tyr)
α	: alfa
β	: beta
γ	: gamma
δ	: delta
μl	: mikrolitre

1. GİRİŞ

TNF- α , birçok farklı sinyal iletim mekanizmasını uyarabilen bir sitokin olup, etkilerinin çoğunu ölüm bölgesi barındıran reseptörü TNFR1 aracılığıyla gösterir. TNFR1'in ölüm bölgesi, TRADD ve RIP gibi ölüm bölgesi (DD) ya da ölüm efektör bölgesi (DED) barındıran proteinler için bağlanma bölgesi sağlamakta, bu sayede TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonu, apoptosis ve nekroptosis indüksiyonu gerçekleştirebilmektedir. Öte yandan, TNF- α , yine TNFR1 aracılığıyla ERK, Akt, Stat3 ve CREB yollarının da aktivasyonuna yol açmaktadır. TNFR1'in JAK2 ve c-Src tirozin kinazlarla fiziksel etkileşimi gösterilmiş, fakat bu tirozin kinazların TNFR1 üzerinde tirozin fosforilasyonuna yol açıp açmadığı aydınlatılmamıştır. TNFR1'in bu tirozin kinazlar tarafından fosforilasyonu, SH2 bölgesi barındıran Grb2 ve Stat3 gibi proteinler için bağlanma bölgesi oluşturarak Stat3, ERK ve Akt yollarının aktivasyonuna aracılık ediyor olabilir. Nitekim, TNFR1 DD'si üzerinde, YxxV/L motifine uyan iki adet potansiyel JAK2 fosforilasyon motifi bulunmaktadır. Bu nedenle, tez çalışmamızda JAK2 ve TNFR1'in bağlantısını tekrar gösterdikten sonra, JAK2'nin TNFR1'i tirozin fosforile edip etmediğini sorguladık. TNFR1 tirozin fosforilasyonunu gösterdikten sonra, TNFR1 tirozin fosforilasyon motiflerinde yer alan tirozin amino asitlerinin kodonunu hedeflendirilmiş mutasyonla fosforilasyonu taklit edeceğini düşündüğümüz aspartik asit (D) ve fosforilasyonu engelleyeceğini düşündüğümüz alanin(A) aminoasitlerinin kodonuna çevirip, TNFR1 sinyal iletiminin bu modifikasyonlardan nasıl etkilendiğini inceledik.

TNFR1 DD üzerinde tirozin fosforilasyon motiflerini ararken, yine DD üzerinde iki adet potansiyel PKA fosforilasyon motifi (RxxS/T) bulunduğunu tespit ettik. Bu motiflerde yer alan Threonin amino asitinin PKA tarafından fosforile edilmesinin, TNFR1 tirozin fosforilasyonu üzerinde düzenleyici bir rolü olabileceğini öngördük. Bu hipotezimizi test etmek adına, TNFR1 ve PKA arasındaki fiziksel etkileşimi ve TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyona uğratılıp uğratılmadığını inceledik. Bunun ardından, potansiyel PKA fosforilasyon motiflerinin fosforilasyonu taklit edeceğini düşündüğümüz aspartik asit ve fosforilasyonu engelleyeceğini düşündüğümüz alanin aminoasitleri ile değiştirilmesinin TNFR1 sinyal iletimini nasıl etkilediğini inceledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tümör Nekroz Faktörü (TNF)

1868 yılında, P. Bruns'un erisipel bakterisi enfeksiyonu sonucunda insan tümörlerinin gerilemeye (regresyona) uğradığına dair gözlemi, bakteriyel enfeksiyonlar sonucu aktive olan bir serum proteininin anti-tümöral etki gösterebileceğine dair ilk ipucu olarak kabul görmüştür (Bruns, 1868). 1891 yılında, esasen bir cerrah olan Coley, *Streptococcus erysipelas* özütü ile cerrahinin mümkün olmadığı sarkoma hastalarını tedavi etmiş (Coley, 1891), ilerleyen yıllarda ise *Streptococcus erysipelas* ve *Bacillus prodigiosus* özütlerini karıştırarak, "Coley toksini"ni elde etmiştir (Coley, 1910). Bu çalışmalarda, insanların tümör bölgesine bakteriyel özüt enjeksiyonunu takiben hastalarının ateşinin yükseldiği tespit edilmiş ve bu ateş yükselişinin ardından tümörün gerilemeye girdiği belirlenmiştir.

Coley toksininin tümör gerilemesini sağlamasında rol oynayan molekülü belirlemek isteyen Shear ve arkadaşları, fare modelinde yaptıkları çalışmayla, bu molekülün lipopolisakkarid (LPS) olduğunu belirlemişlerdir (Shear ve ark., 1943). Algire ve arkadaşları ise, LPS'in sistemik hipotansiyona yol açarak tümör damarlanmasını bozduğunu ve tümörlerin besinsiz kalarak öldüğünü saptamışlardır (Algire ve ark., 1952). İlk zamanlarda LPS'in bu etkisinin direkt olduğu düşünülmesine rağmen, 1962'de O'Malley ve arkadaşları, bu etkinin LPS tarafından indüklenen bir serum proteini tarafından oluşturulduğunu göstermişler (O'Malley ve ark., 1962) ve 1975 yılında bu protein Carswell tarafından tümör nekroz faktörü (TNF) olarak isimlendirilmiştir (Carswell ve ark., 1975).

1975 yılında isimlendirilmesine rağmen TNF proteinleri TNF- α ve lenfotoksin'in (TNF- β) izolasyonu ve klonlanması 10 yıl sonraya tarihlenir (Aggarwal ve ark., 1985b; Aggarwal ve ark., 1984). Aynı zamanda bu tarih, TNF- α ve kaşektin'in, yani makrofajlardan sentezlenip kanser ilişkili kilo kaybına (kaşeksi) yol açan proteinin aynı molekül olduğunun fark edildiği tarihtir (Beutler ve ark., 1985). Yine 1985 yılında, TNF- α 'nın hücre öldürücü etkisinin, hücre yüzeyindeki bazı reseptörlerce sağlandığı (Baglioni ve ark., 1985; Niitsu ve ark., 1985) ve bu reseptörlerin ekspresyonlarının

interferon- γ tarafından indüklendiği anlaşılmıştır (Aggarwal ve ark., 1985a). 1990 yılında, TNF- α 'nın aslında 55kD ve 75kD büyüklüklerinde iki farklı reseptöre bağlandığı (Brockhaus ve ark., 1990) ve sitotoksik etkinin 55-60 kD'lik reseptör (TNF-R1) ile sağlandığı (Thoma ve ark., 1990) belirlenmiş, ardından bu reseptör klonlanmıştır (Gray ve ark., 1990). Ertesi sene, TNFR1 kodlayan *TNFRSF1A* geninin 12p13'de, TNFR2 kodlayan *TNFRSF1B* geninin ise 1p36'da yerleştiği (Baker ve ark., 1991), TNFR1 sitotoksik sinyaller için esas reseptörken, TNFR2'nin TNF- α aracılı timosit proliferasyonunda ana rolü oynadığı açığa çıkmıştır (Tartaglia ve ark., 1991).

TNF- α geni, 6p21.3 kromozomal bölgesinde yerleşik olup, 4 ekzon ve 3 introndan oluşur (Nedwin ve ark., 1985). Bu genin ekspresyonu, pankreas, iskelet kası, serviks, overler ve serebral korteks dışındaki bütün dokularda aktiftir (Uhlen ve ark., 2015). TNF- α polipeptidi, ilk olarak 233 aminoasit uzunluğunda pro-protein olarak sentezlenir ve ilk 76 aminoasidi sinyal peptididir (Wang ve ark., 1985). Sinyal peptidinin uzaklaştırılmasıyla elde edilen olgun TNF- α , 26kDa büyüklüğünde bir tip 2 transmembran proteinidir (Kriegler ve ark., 1988). Bu protein, transmembran haliyle etki gösterebildiği gibi, bir matrix metalloproteinaz olan TACE (TNF-alpha converting enzyme) tarafından alanin ve valin aminoasitleri arasından kırılıp 17kD'lik çözünebilir formu (sTNF) da oluşabilir (Black ve ark., 1997; Itai ve ark., 2001; Merlos-Suarez ve ark., 1998). TACE kesimi sonucunda hücre içerisinde kalan yaklaşık 10kDa'lık sitozolik TNF- α kısmının ise nükleusa giderek interlökin-1beta (IL-1 β) geninin ekspresyonunda rol oynadığı belirlenmiştir (Domonkos ve ark., 2001). Transmembran TNF (tmTNF), reseptör ile bağlanmasının ardından, hücre içine sinyal gönderebilir (tersinir sinyalleşme/reverse signaling). TNF- α aracılı tersinir sinyalleşmenin ERK/MAPK (Kirchner ve ark., 2004) ve NF- κ B yolaklarının aktivasyonunu sağlayabildiği (Zhang ve ark., 2008); bu durumunsa sempatik akzonların hedef innervasyonunda (Kisiswa ve ark., 2013), monosit ve makrofajların lipopolisakkarid (LPS) dirençliliğinde (Eissner ve ark., 2000; Kirchner ve ark., 2004) ve meme kanseri hücrelerinin büyümesinde (Yu ve ark., 2013) rol oynadığı belirlenmiştir.

sTNF de, tmTNF de trimerizasyonla aktif hale gelir (Otsuka, 1975; Smith and Baglioni, 1987) ve trimerizasyon sonrasında çan şeklinde bir yapı alır (Eck and Sprang, 1989).

Kendilerini eksprese eden hücrelerdeki fonksiyonlarının yanı sıra, TNF formlarının reseptör seçimlerinde de farklılık söz konusudur. sTNF'in temel olarak TNFR1'i, tmTNF'in ise TNFR2'yi tercih ettiği bilinmektedir (Grell ve ark., 1995; Grell ve ark., 1998b).

2.2 TNF- α Reseptörleri

TNF- α 'nın bilinen iki reseptörü TNFR1 (p55) ve TNFR2 (p75) (Hohmann ve ark., 1989), ligand seçim tercihlerinin yanı sıra, eksprese edildikleri hücreler açısından da farklılık gösterirler. TNFR1, hemen hemen tüm hücre tiplerinde sentezlenirken, TNFR2'nin CD4+ ve CD8+ T hücreleri, mikroglionlar, oligodendrositler, timositler, kalp miyositleri ve mezenkimal kök hücrelerle kısıtlı ekspresyon gösterdiği bilinmektedir (Arnett ve ark., 2001; Dopp ve ark., 2002; Grell ve ark., 1998a; Irwin ve ark., 1999; McCoy and Tansey, 2008; Ware ve ark., 1991; Yang ve ark., 2002). Her iki TNF reseptörünün ekspresyonu da, hem TNF'in kendisi, hem de interferonlar tarafından düzenlenmektedir (Pandita ve ark., 1992; Trefzer ve ark., 1993; Winzen ve ark., 1993). Bunun yanı sıra, TNF gibi TNFR1 ve TNFR2 de TACE aracılı kesime uğrayarak çözünür hale gelebilmektedir (Bjornberg ve ark., 1994; Solomon ve ark., 1999).

TNF reseptör süperailisi üyeleri, ekstraselüler bölgelerindeki sisteince-zengin bölge açısından homoloji gösterirler (Smith ve ark., 1994). TNFR1 ve TNFR2 de, ekstraselüler bölgelerinde dörder adet sisteince zengin bölge (CRD) bulundurmaktadır (Chen ve ark., 1995). 40'ar aminoasit uzunluğundaki sisteince zengin bölgeler, 6 sistein tekrarı ve bunlar arasında oluşan 3 disülfid bağı ile karakterizedir (Naismith and Sprang, 1998). TNFR1 ve TNFR2'nin ligand bağlanma bölgelerinin araştırıldığı delesyon çalışmalarında, TNFR1'in ekstraselüler bölgesindeki üçüncü, TNFR2'in ekstraselüler bölgesindeki dördüncü CRD'nin ligand bağlanmasında esas bölgeler olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 1995). Ligand bağlama bölgelerindeki bu farklılık, TNFR1'in sTNF'e, TNFR2'nin ise mTNF'e daha yüksek afinite göstermesinin altında yatan neden olabilir. İlk CRD'nin ise, her iki reseptörde de, pre-ligand bağlanma bölgesi (Pre-ligand assembly domain / PLAD) olarak fonksiyon gösterdiği bilinmektedir (Chan ve ark., 2000).

TNFR1 ve TNFR2 ekstraselüler bölgelerinde yüksek homoloji gösterse de, sitoplazmik bölgelerinde önemli farklılıklar söz konusudur. Sitoplazmik bölgelerinin hayli farklı oluşu, TNFR1 ve TNFR2 arasındaki homolojiyi %28 olarak kısıtlamaktadır (MacEwan, 2002). TNFR1, sitoplazmik bölgesinde nötral sphingomyelinaz (NSMase) aktivasyon bölgesi (Adam ve ark., 1996) ve ölüm bölgesi (death domain /DD) bulundurur (Tartaglia ve ark., 1993a). TNFR2 sitoplazmik bölgesindeyse, DD bulunmaz fakat TRAF bağlanma motifi bulunur (Grech ve ark., 2005). Sitoplazmik bölgelerindeki bu farklılık, TNFR1 ve TNFR2 sinyalleşmesinin birbirinden oldukça farklı olmasına yol açar.

TNFR1, TNF α 'nın etkilerini uyandıran esas reseptör olarak kabul edilirken, TNFR2'nin rolü hakkında zamana bağlı olarak farklı görüşler öne atılmıştır. En başlarda TNFR2'nin kendi kendine başlattığı bir sinyal iletim yolağının olmadığı ve etkisini TNFR1'e TNF- α 'yı iletmek (ligand passing) üzerinden sağladığı iddia edilmiştir (Tartaglia ve ark., 1993b). Ancak, daha sonra, TNFR2 agonistik monoklonal antikoları ile yapılan çalışmalarda, TNFR2'nin de apoptosisi indükleyebildiği ve bunun için de FADD-Kaspaz 8 yolağını kullandığı belirlenmiştir (Depuydt ve ark., 2005; Vandenabeele ve ark., 1995). Bunun yanı sıra, TNFR2, TRAF2 bağlama bölgeleri sayesinde NF- κ B aktivasyonunu sağlayabildiği gibi (Rodriguez ve ark., 2011), NF- κ B aktivasyonunu durdurmak için TRAF2 degradasyonunu sağlaması sayesinde de TNFR1 aracılı apoptosisi kuvvetlendirmektedir (Cabal-Hierro ve ark., 2014; Rodriguez ve ark., 2011).

2.3 TNFR1, Yapısı ve Sinyal İletimi

TNFR1, 12p13'de, 3'UTR bölgesi dahil olmak üzere 10 ekzona yayılmış olan *TNFRSF1A* geni tarafından kodlanmaktadır (Fuchs ve ark., 1992).

TNF- α 'nın reseptörüne bağlanması sonrasında (Aggarwal ve ark., 1986) reseptör-ligand kompleksinin önce hücre içine internalize olduğu, ardından hücreyi "litik" faza soktuğu (Kull, 1988) 1990'lı yıllardan öncesinde de bilinse de; TNFR1 sinyal iletiminin fizyolojik etkileri hakkındaki ilk fikirlerimiz, TNFR1 yoksunu (TNFR1 knock out) fare çalışmalarına dayanır. TNFR1 defektif farelerin, TNF- α 'nın yol açtığı sistemik toksisiteden korunduğu, fakat *Listeria monocytogenes* enfeksiyonuna aşırı duyarlı hale geldiği 1993 yılında gösterilmiştir (Rothe ve ark., 1993). Takip eden yıllarda, TNFR1 yoksunu farelerde lipopolisakkarid (LPS) toksisitesine (Rothe ve ark., 1994) ve LPS-

aracılı deri ülserleşmesine (Amar ve ark., 1995) direnç oluştuğu, normal dalak morfolojisine sahip olmalarına rağmen süregelen IgG sentezinde ve germinal merkez gelişiminde bozulmaların gözlemlendiği (Le Hir ve ark., 1995), nöronal NF-κB sinyalleşmesinin baskılandığı (Yang ve ark., 2002), karaciğer gelişiminde gerilik olduğu (Wallenius ve ark., 2001), karaciğer Kupffer hücrelerinin migrasyonunun ve dimetilnitrozamin indüklü karaciğer fibrozunun azaldığı (Kitamura ve ark., 2002), asetaminofen toksisitesi sonrasında karaciğer rejenerasyonunun arttığı (James ve ark., 2005), amiloid beta plaklarının neden olduğu nöral hücre ölümüne direnç geliştiği (Li ve ark., 2004), *Legionella pneumophila* nedenli mortalitede artış gözlemlendiği (Fujita ve ark., 2008), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-aracılı periodontite duyarlılık oluştuğu (Garlet ve ark., 2007), karajenan indüklü havayolu inflamasyonunun tamamen ortadan kalktığı (Mazzon and Cuzzocrea, 2007; Mazzon ve ark., 2008), trakeal epitelyumdaki kirpiksi hücrelerin hareketinin azaldığı (Weiterer ve ark., 2014) deneysel otoimmün üveorenit'e karşı direnç geliştiği (Raveney ve ark., 2009), kortikal hücrelerin oksijen ve glukoz yoksunluğu nedeniyle nekroza dirençli hale geldiği (Badiola ve ark., 2009), arterioskleroz gelişiminin azaldığı (Xanthoulea ve ark., 2008), makrofajlardaki MAPK aktivasyonunun, NF-κB aktivasyonunun, iNos ve Cox2 ekspresyonunun azaldığı (Crisafulli ve ark., 2009), diyet indüklü obeziteye karşı direnç geliştiği (Romanatto ve ark., 2009), ağrı reseptörlerinde (nosiseptörler) duyarsızlık oluştuğu (Nadeau ve ark., 2011) ve intrakraniyal anevrizma'ya direnç geliştiği (Aoki ve ark., 2014) belirlenmiştir. Bunların yanı sıra, TNFR1 yoksunu erkek hayvanlardaki mezenkimal kök hücrelerin iskemi sonrası myokardiyal rejenerasyon kapasitesinin arttığı, fakat dişi modellerde bu durumun söz konusu olmadığı da rapor edilmiştir (Zeller ve ark., 2009). Dolayısıyla, TNFR1 sinyal iletimi, sadece anti-tümöral özelliğiyle değil, başta mikrobiyal enfeksiyonlara dirençlilik olmak üzere birçok farklı süreç üzerinde etki göstermektedir.

Bugünkü bilgilerimizle TNF-α aracılı TNFR1 aktivasyonunun etkilerini, nötral sphingomyelinaz aktivasyonu, NF-κB aktivasyonu, apoptosis ve nekroptosis indüksiyonu, p38, JNK, Akt, ERK, Stat3 gibi yolların aktivasyonu şeklinde özetleyebiliyoruz.

TNFR1, TNF bağlanması öncesinde, PLAD bölgesi sayesinde trimer yapıda bulunur. Bu esnada, TNFR1 sitoplazmik bölgesine bağlanan Silencer of Death Domain (SODD) proteini, ligand bağlı olmayan TNFR1'e sinyal partnerlerinin bağlanmasını, dolayısıyla hücre içi sinyal iletimini engeller (Jiang ve ark., 1999). TNFR1'de ligand bağlanmasına müteakip oluşan konformasyonel değişiklik, SODD'un ayrılmasını sağlar. Bu sayede, TNFR1, kendi sinyal partnerlerine bağlanabilir. TNF- α uyarımından yaklaşık 10 dakika sonra ise, SODD'un tekrar TNFR1 kompleksine gelerek, TNFR1 sinyal iletimini zayıflattığı gösterilmiştir (Jiang ve ark., 1999). Bu bilgiyi doğrulamak adına, SODD yoksunu modeller oluşturulduğunda, TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunun arttığı, TNF- α aracılı apoptosi indüksiyonunun değişmediği, TNF aracılı JNK aktivasyonunusa azaldığı (Takada ve ark., 2003) belirlenmiştir. Bu çalışmadan iki ay sonra yayınlanan bir çalışmada, SODD defektif farelerde TNF- α aracılı NF- κ B, ERK ya da JNK sinyal iletiminin değişmediği rapor edilmiştir (Endres ve ark., 2003).

2.3.1 TNFR1 aracılı Sphingomyelinaz Aktivasyonu

TNFR1, endozomal-lizozomal asidik sphingomyelinazları (A-SMase) (Schutze ve ark., 1992) ve membran bağlı nötral sphingomyelinazları (N-SMase) (Adam ve ark., 1996) aktive edebilir.

TNFR1 aracılı A-SMase aktivasyonundan, TNFR1'in ölüm bölgesinin sorumlu olduğu, TNFR1 ölüm bölgesine bağlanan TRADD ve FADD aracılığıyla A-SMase aktivasyonunun gerçekleştiği bilinmektedir (Adam-Klages ve ark., 1998). A-SMase aktivasyonu ile seramid oluşumunun, TNFR1 aracılı NF- κ B aktivasyonu üzerinde pozitif bir etkisi olduğu (Schutze ve ark., 1992) gösterilmiş olup, kaspaz inhibitörlerinin varlığında TNFR1'in A-SMase aktivasyonunun engellendiği belirlenmiştir (Adam-Klages ve ark., 1998). Her ne kadar en başlarda A-SMase aktivasyonu ile lizozomal kompartmanlarda oluşan seramid'in, TNFR1 aracılı JNK aktivasyonu için gerekli olduğu iddia edilmişse de (Adam-Klages ve ark., 1998), JNK aktivasyonu için herhangi bir SMase aktivasyonunun gerekli olmadığı sonradan kanıtlanmıştır (Adam ve ark., 1998).

TNFR1 aracılı N-SMase aktivasyonunda ise, ölüm bölgesinin değil, TNFR1 N-terminaline daha yakın bir bölgenin, 309-319. aminoasitler arasının sorumlu olduğu

gösterilmiştir (Adam ve ark., 1996). FAN (Factor Associated with Neutral sphingomyelinase activation), bu bölgeye bağlanarak (Adam-Klages ve ark., 1996) N-SMase aktivasyonunu, dolayısıyla sphingomyelin hidrolizini takiben plazma membranında seramid birikimini sağlar. Plazma membranında biriken seramid, TNFR1 aracılı c-raf-1 aktivasyonunu sağlar (Belka ve ark., 1995) ve kaspaz aktivasyonunu kuvvetlendirir (Segui ve ark., 2001). TNFR1-FAN interaksiyonu, aynı zamanda, plazma membranına RACK1 proteininin çekilmesini de sağlar (Tcherkasowa ve ark., 2002), RACK1 ise, IKK kompleksinin TRAF2'ye bağlanmasını engelleyerek, TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunu baskılar (Yao ve ark., 2014). NF- κ B aktivasyonunun baskılanması, TNFR1/N-SMase yolağının kaspaz aktivasyonunu kuvvetlendirmesinin altında yatan neden olabilir. TNFR1 aracılı c-Raf1 aktivasyonunda primer rol oynadığı için TNFR1/FAN/N-SMase yolağının ERK aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmişse de, FAN knock-out farelerde TNF aracılı ERK aktivasyonunun hala gözlenebilmesi (Luschen ve ark., 2000), TNFR1 aracılı ERK aktivasyonunun alternatif yollar ile de aktive edilebileceğini göstermiştir.

2.3.2. TNFR1 aracılı NF- κ B Aktivasyonu

TNF- α 'nın NF- κ B yolağını aktive ettiği, ilk olarak 1989 yılında gösterilmiştir (Duh ve ark., 1989). TNF- α aracılı gen ekspresyonunun neredeyse tamamı, NF- κ B yolağının indüksiyonuna dayanmaktadır (Viemann ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2003). Bunun yanı sıra, NF- κ B aktivasyonu, TNFR1 aracılı apoptosisin sınırlandırılabilmesini sağlar (Liu ve ark., 1996).

TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunun üzerinde çok fazla çalışma yapılmış olması ve bu yolla ilgili bilgilerin hücre tipine bağlı olarak değişiklik gösterebilmesi; literatürde birbiri ile çelişen çok fazla bilgi birikimine neden olmuştur. Tek hücre analizine dayalı yöntemler kullanılarak yapılan bir çalışmada, TNFR1'in NF- κ B'yi monofazik ve asenkronize salınımlı (osilasyonlu) olmak üzere iki farklı modülle aktive edebildiği gösterilmiştir (Nelson ve ark., 2004). Buna göre, kısa süreli TNF- α muamelesi, monofazik aktivasyon modülünü uyarıp, NF- κ B'nin nükleusa gitmesini, I κ B inhibitör proteinlerin sentezini sağladıktan sonra NF- κ B'nin sitoplazmaya geri dönmesini sağlarken; uzun süreli TNF- α muamelesi ile uzun süreli IKK aktivasyonu ve I κ B

proteolizi, NF- κ B'nin senkronize olmayan bir şekilde nükleus-sitoplazma arasında gidip gelmesine neden olur (Tian ve ark., 2005). Osilasyon sayısı ise, uygulanan TNF- α dozuna göre değişmektedir (Tay ve ark., 2010). NF- κ B aktivasyonu, 10ng/ml TNF- α dozunun uygulanmasından sonra 20. dakikada gözlemlenebilirken, 0,01ng/ml TNF- α dozunun uygulanmasından sonra 50. dakikada gözlemlenebilir hale gelir. Bu durum da, daha yüksek doz TNF- α uygulandığı durumda daha fazla osilasyon gerçekleştiği anlamına gelmektedir (Tay ve ark., 2010).

TNF- α 'nın TNFR1'e bağlanması sonucunda apoptosis indüksiyonunun mu yoksa NF- κ B aktivasyonunun mu uyarılacağına karar veren mekanizma uzun yıllar bir soru işareti olarak kalmış, 2003 yılında ise NF- κ B indüksiyonu ve apoptosis uyarımının sıralı eylemler halinde meydana geldiği belirlenmiştir (Barnhart and Peter, 2003; Micheau and Tschopp, 2003). Bu modele göre, TNF- α 'nın reseptöre bağlanmasının ikinci dakikasından itibaren lipid raflarda (Legler ve ark., 2003) Kompleks 1 oluşur ve NF- κ B aktivasyonu başlar. TNF- α muamelesinin 30. dakikasından itibaren bu kompleksin parçaları TNFR1'den ayrılmaya başlar ve sitoplazmada Kompleks 2'yi oluşturarak apoptosis indüksiyonunu sağlar. Dolayısıyla, hücre, NF- κ B'nin aktive edilemediği durumda apoptosise yönelir.

Trimerize haldeki TNF- α , TNFR1'e bağlandıktan sonra, TRADD (TNFR1-associated death domain protein), C-terminalinde bulunan ölüm bölgesi sayesinde, TNFR1'in ölüm bölgesine bağlanır (Hsu ve ark., 1995). Bir serin/threonin kinaz olan RIP1 (Receptor-interacting serine/threonine protein kinase: RIPK1), kendi başına (Zheng ve ark., 2006) ya da TRADD aracılığıyla (Hsu ve ark., 1996a) TNFR1'e bağlanır. TRADD, N-terminalinde bulunan TRAF bağlama bölgesi sayesinde de TRAF2 (Hsu ve ark., 1996b)'yi de oluşturduğu komplekse getirir. Her ne kadar TNF reseptör ailesinin diğer üyelerinin oluşturduğu NF- κ B aktivasyon kompleksinde TRAF5'in de yer aldığı gösterilmişse de (Aizawa ve ark., 1997; Hsu ve ark., 1997; Ishida ve ark., 1996; Nakano ve ark., 1996), TNFR1 kompleksinde TRAF5 mevcudiyetine dair yeterli veri mevcut değildir. TRADD aracılığıyla TNFR1 kompleksine gelen TRAF2, diğer E3 ubiquitin ligazlar olan cIAP1 ve cIAP2'yi (cellular Inhibitors of Apoptosis) (Mahoney ve ark., 2008; Shu ve ark., 1996) de komplekse getirmenin yanı sıra; Sphingosine kinaz ile

bağlanarak (Xia ve ark., 2002), kendi kofaktörü olan Sphingosine-1-fosfat'ın oluşmasını sağlar (Alvarez ve ark., 2010). TRAF2, cIAP1 ve cIAP2, RIP'i poli-ubikütinasyona uğratır (Mahoney ve ark., 2008; Park ve ark., 2004). Bu ubikütinasyon, RIP1'in TAB1/2/3 adaptör proteinleri sayesinde (Kanayama ve ark., 2004) TAK1'e bağlanabilmesini sağlar (Bertrand ve ark., 2008). Aksi takdirde, de-ubiquitine olan RIP1, TAK1 yerine kaspaz 8'e bağlanır (Bertrand ve ark., 2008).

cIAP1/2, aynı zamanda kendi kendini oto-ubikütinasyonla ubikütinleyerek, LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) için bağlanma bölgesi oluşturur. LUBAC, 600kD büyüklüğünde bir kompleks olup, SHARPIN (SHANK associated RH domain interactor), HOIL-1 (Heme-oxidized IRP2 ligase-1) ve HOIP (HOIL-1 interacting protein) proteinlerinden oluşur (Ikeda ve ark., 2011; Tokunaga and Iwai, 2012). LUBAC'ın TNFR1 kompleksinde oluşturduğu lineer ubikütinasyonlar, NEMO (NFkappaB essential modülör, IKK γ)'nun komplekse kararlı bir şekilde bağlanabilmesini sağlar. Bu bağlantı, ubikütin modifiye edici enzim A20'nin 7. Çinko parmak (ZFN7) bölgesi ile LUBAC'ın oluşturduğu ubikütin zincirlerine bağlanması ile engellenebilir (Tokunaga ve ark., 2012; Verhelst ve ark., 2012). cIAP1/2 ve LUBAC tarafından gerçekleştirilmiş olan ubikütinasyonlar ve TAB1/2/3'ün ubikütin bağlanma özelliği (Kanayama ve ark., 2004) sayesinde, TAK1, oluşmakta olan Kompleks 1'e bağlanır. Aktif TAK/TAB kompleksi, UBAN bölgesi sayesinde lineer ubikütin zincirlerine bağlanma özelliği bulunan NEMO (Ea ve ark., 2006) ile beraber bulunan IKK1 (IKK- α) ve IKK2 (IKK- β)'yi fosforile eder. Bu durum, IKK kompleksinin aktivasyonunu sağlar (Wang ve ark., 2001). Aktive olan IKK kompleksi, I κ B α 'yı 32. ve 36. pozisyonlardaki serin aminoasitlerinden fosforile ederek, K-48 ilişkili ubikütinasyonu ile 26S proteozomlarda parçalanmasına yol açar (Workman and Habelhah, 2013). Bu sayede kanonikal yolla aktive olan NF- κ B (p50/p65 dimeri) serbest kalarak nükleusa gidebilir. Bunun yanı sıra, TAK1-IKK2 yolağı ile aktive olan tümör progresyon lokusu-2 (Tpl2) proteini, p65'i Ser276 noktasından fosforile ederek transaktivasyon kapasitesinde artış sağlar (Das ve ark., 2005).

Öte yandan, bu kompleksin parçaları mevcut olmadığında da, TNF- α , non-kanonikal yolla NF- κ B'yi aktive edebilir. RIP1 knock-out fare embriyonik fibroblastlarında, RIP

yokluğunda TNF- α muamelesinin TRAF2'nin degradasyonuna, NIK (NF κ B-inducing Kinase)'in ise stabilizasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2011). Benzer şekilde, Smac/Diablo mimetikleri ile cIAP1 ve cIAP2'nin degradasyonu da NIK stabilizasyonuna yol açmaktadır (Yang and Du, 2004). Aktif NIK, IKK α 'yı S176'dan (Ling ve ark., 1998), yine TNFR1 aracılığıyla aktive olan Akt ise T23'den fosforile eder (Ozes ve ark., 1999). Bu fosforilasyonlar, IKK α aktivasyonunu sağlar. Aktif IKK α , p100'ü fosforile eder ve fosforilasyona uğrayan p100, proteozomlarda işlenerek p52'yi meydana getirir. RelB/p52 heterodimeri, nükleusa göç edip hedef promotörlere bağlanabilir. Öte yandan, NIK, RIP1'i fosforile edip, apoptotik Kompleks 2'ye katılmasını sağlayabilir (Boutaffala ve ark., 2015).

Bunun yanı sıra, TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonunun, farklı hücrelerde farklı mekanizmalarla gerçekleştiğine dair veriler mevcuttur. Örneğin insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293'te, TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonu için, interleukin-1receptor-associated kinase (IRAK1) enzimatik aktivitesinin (Vig ve ark., 1999), Jurkat T hücre hattında ise Syk kinaz enzimatik aktivitesinin (Takada and Aggarwal, 2004) gerekli olduğu iddia edilmiştir.

NF- κ B'nin kanonikal yolla aktivasyonu hızlı ve kısa süreli bir etki gösterirken, non-kanonikal yolla aktivasyonu ise yavaş fakat uzun süreli etki gösterir (Bonizzi and Karin, 2004). Kanonikal NF- κ B yolağı, I κ B α (Sun ve ark., 1993) ve p100 (Lombardi ve ark., 1995) ekspresyonunu indükleyerek kendi üzerinde bir negatif geri besleme mekanizması oluşturabildiği gibi, cIAP1, cIAP2, TRAF2 ve TRAF3 ekspresyonlarını indüklemek vasıtasıyla (Wang ve ark., 1998) NIK degradasyonuna (Vallabhapurapu ve ark., 2008), yani non-kanonikal yolağın baskılanmasına da yol açabilir. Non-kanonikal yolda ise kendi kendini baskılama yönteminin IKK α aracılı NIK fosforilasyonu ve destabilizasyonu olduğu gösterilmiştir (Razani ve ark., 2010). Kanonikal ve non-kanonikal yolların kendi içerisindeki ve birbirleri üzerindeki bu regülasyon mekanizmaları ve aktivasyon sürelerindeki farklılık, TNF- α aracılı NF- κ B aktivasyonundaki osilasyonu açıklayabilir.

2.3.3. TNFR1 aracılı Apoptosis İndüksiyonu

Apoptosis, bir hücrenin yalancı ayaklarını (psödopod) geri çekip yuvarlanması, hücre hacminin azalması (pyknosis), kromatin kondensasyonu, çekirdeğinin parçalara ayrılması (nüklear fragmentasyon / karyorrhexis) ve plazma membran çıkıntılanması ile karakterize bir hücre ölüm biçimidir. Bütün sürecin ardından ise hücre, *in vivo* ortamda fagositlerce yutulur (Kroemer ve ark., 2009).

TNF- α aracılı apoptosis indüksiyonu, NF- κ B'nin kanonikal ya da non- kanonikal yolakla aktive edilemediği durumlarda gerçekleşir (Van Antwerp ve ark., 1996). Kompleks 1 kurulmadığı ya da ayrıştığı zaman, TNFR1, kompleks-IIa ve kompleks-IIb aracılığıyla apoptosis indüksiyonunu sağlayabilir (Wang ve ark., 2008).

Kompleks-IIa, TNFR1'in 30 dakikadan daha uzun süre TNF- α ile muamele edilmesi ile oluştuğu gösterilmiş olan komplekstir. TNFR1'in TNF- α 'ya bağlanmasına müteakip TNFR1'in sitoplazmik kısmına bağlanmış olan TRADD ve RIP1 (Hsu ve ark., 1996a)), TNF- α muamelesinin ilerleyen dönemlerinde TNFR1'den ayrılıp, ölüm bölgesi interaksyonu sayesinde FADD (Mort-1)'a bağlanır. FADD ise yine ölüm efektör bölgesi interaksyonu sayesinde pro-kaspaz-8'i bağlar (Boldin ve ark., 1996; Hu ve ark., 1997a).

TNFR1 aracılı NF- κ B aktivasyonu kısmında da anlatıldığı gibi, cIAP1 ve cIAP2'nin RIP1'i K377'den K63-poliubikütinasyonuna uğratması, RIP1'in TAB1/2/3 adaptör proteinleri aracılığıyla (Kanayama ve ark., 2004) TAK1'e bağlanabilmesini sağlar (Bertrand ve ark., 2008). cIAP1 ve cIAP2'nin SMAC mimetikleri ya da etoposide gibi ajanlarla ortadan kaldırılması (Feoktistova ve ark., 2011; Tenev ve ark., 2011; Wang ve ark., 2008), TAK1 deplesyonu (Dondelinger ve ark., 2013), CYLD tarafından RIP1'in de-ubikütinasyonu (Wang ve ark., 2008), RIP1'in NIK tarafından fosforilasyonu (Boutaffala ve ark., 2015) ya da K377 noktasının mutasyona uğratılması ile ubikütinasyonunun engellenmesi (Ea ve ark., 2006) gibi durumlar, Kompleks-IIb, ya da diğer adıyla Ripoptozom oluşumunun önünü açar (Feoktistova ve ark., 2011; Tenev ve ark., 2011; Wang ve ark., 2008). TRADD-bağımsız olan (Jin and El-Deiry, 2006) ripoptozom kompleksinde RIP1, RIP3 ile beraber, FADD ve FADD aracılığıyla da pro-kaspaz 8'e bağlanır (Tenev ve ark., 2011).

Trimerize reseptörün oluşturduğu Kompleks-IIa veya Kompleks-IIb (Ripoptozom) sayesinde, birçok pro-kaspaz 8 yakın hale gelmiş olur ve dimerize hale gelen iki pro-kaspaz 8'in birbirini kırması ile aktif Kaspaz 8 oluşumu sağlanır (Muzio ve ark., 1998). Aktive olan Kaspaz 8, pro-kaspaz 3'ü kırarak, aktif Kaspaz-3'e dönüştürür (Beyaert ve ark., 1997; Stennicke ve ark., 1998). Kaspaz-8 aracılığıyla kaspaz-3 aktivasyonu bazı hücrelerde (tip 1 hücreler) apoptosis indüksiyonu (harici/extrinsic apoptosis yolağı) için yeterli iken, çoğu hücre tipinde (tip 2 hücreler) dahili apoptotik yolakların aktivasyonu gerekmektedir.

Dahili apoptosis yolağının aktive edilmesini, Kaspaz-8 tarafından Bcl2 protein ailesi üyesi Bid'in kırılıp tBid (truncated Bid) oluşturulması sağlar (Yin, 2000). tBid, mitokondriye transloke olarak burada Bax ve Bak'ın oligomerizasyonunu ve bu sayede de sitokrom-c (Luo ve ark., 1998; Wei ve ark., 2001) ve Smac/Diablo'nun (Adrain ve ark., 2001) sitoplazmaya salınmasını sağlar. Smac/Diablo, XIAP ve cIAP1/2 gibi apoptosis inhibitörlerini inhibe ederken (Liu ve ark., 2000b; Verhagen ve ark., 2000); Sitoplazmik sitokrom-c, Apaf-1'e bağlanarak ATP bağlama yetisinde 10 kat artış sağlar (Jiang and Wang, 2000). ATP bağlanması sonrasında, Apaf-1/Sitokrom-c kompleksi oligomerize olur ve Kaspaz-9 da bu komplekse bağlanarak, Apoptozom'u oluştururlar (Jiang and Wang, 2000). Apoptozom kompleksi, daha fazla aktif kaspaz 3 oluşturulmasına (Slee ve ark., 1999) izin verirken, aktive olan kaspaz 3, pro-kaspaz 8'i kırarak sinyal amplifikasyonu sağlar (Tang ve ark., 2000; Wieder ve ark., 2001). Bu süreç içerisinde ve devamında, Kaspaz-3, birçok farklı hücresel hedefi kırarak (Slee ve ark., 2001), apoptosise yol açar.

Kaspaz 3'ün hedefleri arasında Bid, XIAP ve RIP-1 de bulunmaktadır (Walsh ve ark., 2008). Dolayısıyla, kaspaz-3, apoptosis inhibitörlerini de inhibe edebilir ve NF-κB yolağının RIP-1 aracılı aktivasyonunu engelleyebilir. Kaspaz 3 gibi, kaspaz 8 de RIP-1'i kırarak kanonikal NF-κB yolağının aktivasyonunu engelleyebileceği gibi (Lin ve ark., 1999), NIK'i kırarak non-kanonikal NF-κB yolağının aktivasyonunu da engelleyebilir (Hu ve ark., 2000). Öte yandan, NIK aracılı RIP fosforilasyonu kanonikal NF-κB aktivasyonunu engelleyip kaspaz-8 aktivasyon yolağını aktive edebildiği için

(Boutaffala ve ark., 2015), kaspaz 8 aracılı NIK kırılması, bir negatif geri besleme mekanizması olarak da kabul edilebilir.

NF- κ B yolağı, apoptosis inhibitörleri c-FLIP (Kreuz ve ark., 2001; Micheau ve ark., 2001), cIAP1/2 (Wang ve ark., 1998) ve Bcl-XL (Chen ve ark., 2000) proteinlerinin ekspresyonunda rol alır. Bcl-XL, tBid'in yol açtığı sitokrom-c ve Smac/Diablo salınımını engelleyerek (Gross ve ark., 1999; Li ve ark., 1998), cIAP1 ve cIAP2 kaspazlara bağlanıp inhibe ederek (Roy ve ark., 1997) ya da kaspazları ubiquitinleyerek proteozomal degradasyonuna yol açmak suretiyle (Huang ve ark., 2000) apoptosisi inhibe edebilirler. c-FLIP ise, kaspaz-8'e yapısal olarak çok benzeyen (Hu ve ark., 1997b; Srinivasula ve ark., 1997), fakat proteolitik aktivitesi olmayan bir proteindir. Ölüm efektör bölge interaksiyonu sayesinde, kompleks 1 ya da kompleks 2 içerisindeki FADD'a bağlanıp pro-kaspaz 8 ile dimerleşerek, kaspaz 8 işlenmesini engelleyebilir (Krueger ve ark., 2001). Öte yandan, c-FLIP/Pro-Kaspaz-8 dimeri, RIP1 ve RIP3 kırılmasında kaspaz 8'den daha etkindir (Feng ve ark., 2007; Rebe ve ark., 2007). Ayrıca, NF- κ B yolağı, IKK α/β tarafından RIP-1'in fosforilasyonuna yol açıp FADD bağlanmasını engelleyerek de apoptosisi ve nekroptosisi baskılayabilir (Dondelinger ve ark., 2015).

TNFR1 aracılı hücre ölümünde, reaktif oksijen türleri (ROS) de rol oynar. TNF- α uyarımı sonrasında mitokondri hasarı ve hücre içi ROS birikimi ilk defa 1992 yılında bildirilmiştir (Schulze-Osthoff ve ark., 1992). TNF- α uyarımı ve sikloheksimid (CHX) muamelesi sonrasında, RIP-1/TRADD/TRAF-2/FADD/Pro-kaspaz8 kompleksinin, bir mitokondriyel protein olan Romo1 (ROS modulator 1)'in karboksi ucuna bağlandığı ve Romo1'in Bcl-XL (B cell lymphoma-extra large) aracılığıyla mitokondriyel membran potansiyelinin azaltılması ve ROS üretiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2010). Bu süreç, kaspaz 8 aktivasyonunda ve geç faz JNK aktivasyonunda da rol oynamaktadır (Kim ve ark., 2010). Romo1 gibi, RIPK3'ün de "TNFR1 aracılı nekroptosis" başlığı altında detaylandırılmış olan yolaklarla ROS üretimini sağlayarak kaspaz 8 aktivasyonuna katkı sağladığı belirlenmiştir (Dondelinger ve ark., 2013).

2.3.4. TNFR1 aracılı Nekroptosis

Nekroz, hücre hacim artışı (onkozis), organellerin şişmesi, plazma membranının yırtılması ve intraselüler içeriğin kaybı ile karakterize hücre ölüm biçimidir (Kroemer ve ark., 2009). Nekroz, mekanik stres nedenli olabileceği gibi, programlı hücre ölümünün bir türü olarak da gerçekleşebilir.

RIP1'in Smac mimetikleri ya da CYLD (K63-spesifik deubikütinaz) aktivasyonu sayesinde de-ubikütine olduğu hücrelerde, pan-kaspaz inhibitörleri kullanılarak kaspaz-8 ve kaspaz-3 aktivasyonu engellendiği zaman, TNF- α muamelesinin hücreleri programlı nekrozla öldürebildiği bilinmektedir (He ve ark., 2009; Moquin ve ark., 2013). Kaspaz-3 ve kaspaz-8 inhibe edildiği zaman nekroptosis oluşmasında, normalde bu kaspazların hedefi olan RIP1 ve RIP3'ün (Lin ve ark., 1999; Walsh ve ark., 2008) kırılmasının engellenmesi rol oynar. Nekroptosis indüksiyonunu takiben, sitoplazmada serbest ve de-ubikütinile haldeki RIP1 ve RIP3, birbirlerine RHIM bölgeleri aracılığıyla bağlanıp, filamentöz yapılar oluştururlar (Li ve ark., 2012). Bu filamentöz yapı, birçok RIP-3'ün birbirine yaklaşmasını, dolayısıyla da RIP-3 homodimerleri oluşmasını sağlar (Wu ve ark., 2014). RIP-1 immünokompleksinde RIP-3'ün nekroptosis indüksiyonunun 4. saatinden itibaren görülmeye başladığı, 8. saatte ise maksimum seviyesine ulaştığı bildirilmiştir (He ve ark., 2009). Nekroptosisin devam edebilmesi için, hem RIP-1 (Holler ve ark., 2000) hem de RIP-3 (He ve ark., 2009) kinaz aktivitesine ihtiyaç vardır. RIP-3, hem RIP-1'i (Cho ve ark., 2009), hem de kendi kendisini fosforile ederken (Wu ve ark., 2014), RIP1 RIP3'ü direkt fosforile edememekte, fakat RIP1 enzimatik aktivitesinin Nekrostatin (Nec-1) ile engellendiği durumda RIP3 fosforilasyonu gerçekleşmemektedir (Cho ve ark., 2009). İlginç bir şekilde, RIP1'in enzimatik aktivitesi susturulduğunda nekroptosis engellenirken, RIP1 siRNA ile RIP1 ekspresyonu susturulduğunda nekroptosis ölüm reseptör uyarımı olmadan dahi meydana gelmektedir (Orozco ve ark., 2014).

RIP3'ün Ser227'den otofosforilasyonu, bir psödokinaz olan MLKL için bağlanma noktası oluşturur (Chen ve ark., 2013; Sun ve ark., 2012). Nekrozomların mitokondri-ilişkili membranlara translokasyonu için gerekli olduğu gösterilmiş olan (Chen ve ark., 2013) bu bağlanmayı takiben, RIP3, MLKL'i Thr357 ve Ser358 noktalarından fosforile

eder (Sun ve ark., 2012). MLKL, bir psödokinaz bölgesi etrafında dört heliks yapısı içermekte; ATP ile bağlanmakta, fakat enzimatik aktivite göstermemektedir (Murphy ve ark., 2013). Hsp90 tarafından stabilize edildiği düşünülen (Zhao ve ark., 2016) RIP3 indüklü fosforilasyonun ardından, MLKL oligomerizasyona izin veren bir konformasyon kazanır ve yine Hsp90 aracılığıyla plazma membranına taşınarak (Jacobsen ve ark., 2016), burada fosfotidilinositollere bağlanarak (Quarato ve ark., 2016) oktamer yapı oluşturur (Huang ve ark., 2016). Plazma membranındaki MLKL oktomeri, TRPM7 kanalı aracılığıyla hücre içerisine kalsiyum (Cai ve ark., 2014) ve sodyum (Chen ve ark., 2014) girişi başlatır.

Nekroptosisin tamamlanabilmesi reaktif oksijen türleri (ROS) birikimine bağlıdır. RIP3, MLKL-aracılı membran permeabilizasyonunu sağlamanın yanı sıra, hücre metabolizmasında da reaktif oksijen türleri (ROS) birikimine yol açacak değişiklikler yapar. Kaspaz inhibisyonu yapılmış hücrelerde, RIP3'ün, glikojen fosforilaz (PYGL), glutamat-amonya ligaz (GLUL) ve glutamat dehidrojenaz 1 (GLUD1) gibi metabolik enzimlerin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009). PYGL aktivasyonu ile hücrelerin depo glikojeni enerji kaynağı olarak kullanabilmesi sağlanırken, GLUL aktivasyonu ile glutamattan glutamin üretilerek, GLUD1 aktivasyonu ileyse, glutamat α -ketogluterata çevrilerek mitokondriye ekstra enerji kaynakları sağlanır. Hücrede çok hızlı bir şekilde gerçekleşmeye başlayan oksidatif fosforilasyon, ROS üretimine neden olur (Schulze-Osthoff ve ark., 1992; Zhang ve ark., 2009). PYGL, GLUL ve GLUD1'in siRNA ile susturulmasının, nekroptosis koşullarında gerçekleşen ROS birikimini azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009), fakat bu yolla nekroptosis sürecinde ROS birikiminin tek yolu değildir. MLKL susturulması ile de ROS üretiminin azaldığının gösterilmiş olması, mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da, MLKL'in de ROS üretiminde rolü olduğunu düşündürmektedir (Zhao ve ark., 2012). Bunların yanı sıra, TNF- α muamelesi sonrasında TRADD ve RIP1, içerisinde Noxo-1 (NADPH oksidase organizier-1) ve Rac-1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)'in de olduğu bir kompleks oluşturur (Kim ve ark., 2007). RIP1 kinaz aktivitesinin önemli olduğu (Kim ve ark., 2007), Riboflavin kinazın da görev aldığı (Yazdanpanah ve ark., 2009) bir süreç sonucu NADPH oksidaz aktive olur ve bu durum, hücrede yüklü miktarda ROS

birikimine yol açar. Bu esnada, artan geç evre JNK aktivasyonu (Schenk and Fulda, 2015) da ROS birikimine katkı sağlar (Ventura ve ark., 2004).

Hücre içi ROS birikimi, mitokondriyal dış membran proteini Bak'ın oksidatif thiol modifikasyonlarına ve aktivasyonuna neden olur (Rohde ve ark., 2016). Aktive olan Bak, mitokondri dış membranında oligomerik porlar oluşturur (Aluvila ve ark., 2014) ve bu durum, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, mitokondriyal solunumun bozulması ile sonuçlanır (Rohde ve ark., 2016). Mitokondriyal membran permeabilizasyonu, hücre içi ROS birikiminin daha da artmasına ve lizozomal membranların da permeabilizasyonuna yol açar (Huai ve ark., 2013). Bütün bu süreçler sonunda, hücre nekroza gider.

2.3.5. TNFR1 aracılı MAPK Aktivasyon Yolağı

Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ailesi, ekstraselüler sinyallerin, hücre sel tepkilere dönüştürülmesinde önemli rol oynarlar. Memelilerde, MAPK ailesi ekstraselüler sinyallerce regüle edilen kinaz (ERK), c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) ya da diğer adıyla stres aktive protein kinaz (SAPK) ve p38'den oluşur (Kim and Choi, 2010). ERK proteinleri ERK1-ERK8 (Bogoyevitch and Court, 2004) şeklinde isimlendirilmiş sekiz; JNK proteinleri JNK1/2/3 (Gupta ve ark., 1996) şeklinde isimlendirilmiş üç; p38 ise α , β , γ ve δ (Cuenda and Rousseau, 2007) olmak üzere dört üyeden ve bunların alternatif kırpılımla oluşturulan izoformlarından oluşur. MAPK ailesine mensup üç üyenin de T loop'unda T-X-Y motifi bulunmakta olup, X, p38 için Glisin, ERK için Glutamik Asit, JNK için ise Prolin'dir. MAPK'ler, hem Threonin, hem de Tirozin aminoasitlerinden fosforile olduklarında tam aktivasyon kazanırlar (Cargnello and Roux, 2011). MAPK'ler, MAPKK, MAPK2K, MKK ya da MEK olarak isimlendirilebilen MAPK kinazlar tarafından, bunlarsa MAP3K, MEKK ya da MKKK olarak isimlendirilebilen MAPKK kinazlar tarafından fosforile edilerek aktive edilirler (Qi and Elion, 2005).

Hücre tipine bağlı değişiklikler gösterebilmekle beraber (McFarlane ve ark., 2001; Pollock ve ark., 2002; Ryden ve ark., 2002), TNFR1, MAPK ailesinin üç üyesini de aktive edebilir. TNFR1 aracılı MAPK aktivasyonunda rol alan yolaklardan biri, Tumor Progresyon Lokusu-2 (Tpl-2) proteini aracılıdır. TNF- α stimülasyonu yapılmamış hücrelerde, Tpl-2, NF- κ B p105 alt ünitesi ve ABIN-2 (A20-binding inhibitor of NF- κ B)

proteini ile kompleks halindedir (Lang ve ark., 2004). TNF- α muamelesi, TAK1'in K158 noktasından K63 poli-ubikütinasyonunu sağlar (Fan ve ark., 2010). TRAF2, TRAF6 ya da TAB1 aracılığıyla gerçekleşebilen bu ubikütinasyon, IKK/NEMO için bağlanma bölgesi oluşturur (Fan ve ark., 2010). TAK1 (MAP3K7) tarafından fosforile edilerek aktive olan IKK2 (Wang ve ark., 2001), hem p105'i fosforile ederek Tpl2'nin serbest kalmasını sağlar (Beinke ve ark., 2004; Pattison ve ark., 2016); hem de Tpl2'yi Ser400 noktasından fosforile eder (Roget ve ark., 2012). TNF- α ile indüklenen hücrelerde RIP1-Tpl2 bağlantısının (Eliopoulos ve ark., 2006) olduğu bildirilmiştir, fakat RIP1 ve Tpl2'yi bulunduran sinyalzomun Tpl2'ye aktivite kazandırmak için mi olduğu, yoksa TNF- α stimülasyonundan sonra hızlı bir şekilde meydana gelen Tpl2 degradasyonundan (Das ve ark., 2005) mı sorumlu olduğu henüz bilinmemektedir. Aktif hale gelen Tpl2, MKK1/2, MKK4 ve MKK3/6'yı fosforile ederek aktive eder (Das ve ark., 2005; Farias and Rousseau, 2015; Pattison ve ark., 2016). MKK1/2, ERK1 ve ERK2'yi, T-E-Y motifinde bulunan T202 ve Y204'ten fosforile ederek aktive ederek (Orton ve ark., 2005); MKK3/6 ise, p38'i T-G-Y motifindeki T180 ve Y182'den fosforile ederek (Remy ve ark., 2010) aktive ederler. MKK4, JNK1/2'yi yine T-P-Y motifinde bulunan Y185'ten (Fleming ve ark., 2000) fosforile ederken, T183 fosforilasyonu için MKK7 aktivasyonu gerekmektedir (Fleming ve ark., 2000). TNF- α , Tpl-2 aracılı yolla olmasa da, MKK7'yi kuvvetli bir şekilde aktive edebilmektedir (Tournier ve ark., 2001).

TAK1-Tpl2 yolağı TNF- α aracılı MAPK aktivasyonunun önemli bir ayağını teşkil etse de; Tpl2-/- hücrelerde TNF- α aracılı ERK ve JNK aktivasyonlarının azalmasına rağmen ortadan kalkmaması, p38 aktivasyonununsa anlamlı bir şekilde etkilenmemesi (Das ve ark., 2005), başka MAPK aktivasyon yollarının da söz konusu olduğunu düşündürmektedir. Nitekim TAK1-/- fare embriyonik fibroblastlarında azalmış olduğu halde hâlâ gözlemlenebilen TNF- α indüklü MAPK aktivasyonunun, karma menşeli kinazlar (mixed lineage kinases) MLK2 (MAP3K10) ve MLK3 (MAP3K11)'ün susturulmasıyla daha da azaltılabildiği belirlenmiştir (Kant ve ark., 2011). TNF- α muamele edilmiş hücrelerde, TRAF-2'nin TRAF bölgesi ile, MLK3 C-terminal bölgesi arasındaki fiziksel etkileşimin, MLK3 aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Sondarva ve ark., 2010). TNF- α aracılı MLK2 ve MLK3 aktivasyonunun bir diğer

Edici Kinaz/MAP3K5) rol almaktadır (Tobiome ve ark., 2001; Tsou ve ark., 2012). ASK1, aktivasyonunun indüklendiği koşullar oluşmadığında, thioredoxin ile kompleks halinde ve inaktif konumdadır (Saitoh ve ark., 1998). Hücre içerisinde, “TNFR1 Aracılı Nekroptosis” kısmında anlatılmış olan yollarla ROS birikimi olduğunda, ASK1 thioredoxin’den ayrılarak (Liu ve ark., 2000a) TRAF2 ve TRAF6 ile kompleks kurar (Noguchi ve ark., 2005) ve bu kompleks, ASK1’in oligomerizasyonunu, fosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlar (Fujino ve ark., 2007; Nishitoh ve ark., 1998). Aktive olan ASK1, MKK3/6 ve MKK4/7’yi aktive ederek sönümlenmiş olan JNK ve p38 aktivasyonlarının tekrar artışına yol açar. ASK1’in Akt tarafından Ser83 noktasından fosforilasyonu (Kim ve ark., 2001) ve A20 aracılığıyla indüklene deubikütinasyon ve proteozomal degradasyonu (Won ve ark., 2010) gibi mekanizmalarla inhibe edilmesi, stres indüklü yolların geç evre aktivasyonunu engeller.

TNF- α uyarımı sonrasında aktive olan ERK’ün fosforilasyon hedeflerinden biri de, TNFR1 sitoplazmik bölgesidir (Cottin ve ark., 1999). ERK tarafından fosforilasyon, TNFR1’in golgi ve plazma membranı yerine endoplazmik retikulum ile ilişkili tübüllerde yerleşimine neden olur (Cottin ve ark., 1999). Burada TNFR1 ve Bcl-2 arasında gerçekleşen etkileşim, apoptosisin baskılanmasına neden olur (Cottin ve ark., 2001).

2.3.6. TNFR1 aracılı JAK/STAT Yolağı

TNF- α ’nın TNFR1 aracılığıyla aktive ettiği yollardan biri de JAK/STAT yolağıdır. 1998 yılında ilk defa TNFR1 ile JAK1 ve JAK2 arasındaki bağlantı gösterilmiş ve TNF- α ’nın Stat1, Stat3 ve Stat5 fosforilasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada, TNF- α muamelesinin, Stat3’ün DNA’ya bağlanmasını sağladığı gösterilmiştir (Guo ve ark., 1998a). Daha sonraki çalışmalarda da, TNFR1’in JAK1 (Miscia ve ark., 2002) ve JAK2 (Minogue ve ark., 2012) ile fiziksel etkileşimi doğrulanmış, Tyk2 ile TNFR1 arasında da fiziksel etkileşim gösterilmiştir (Miscia ve ark., 2002). TNFR1’in JAK proteinlerine bağlanmasında 264-271 aminoasitleri arası bölge rol oynamaktadır (Kimura ve ark., 2004). JAK proteinleri, TNF- α muamelesi olmayan ortamda da TNFR1’e bağlanmakta, TNF- α muamelesi ile bu bağlantı kuvvetlenmekte ve JAK proteinlerinin fosforilasyonuna/aktivasyonuna yol açmaktadır. TNF- α muamelesi

sonucunda JAK aktivasyonu Stat3 ve Stat5b tirozin fosforilasyonuna yol açabilirken (Miscia ve ark., 2002), Stat1 fosforilasyonu bazı yayınlarda gösterilebilmiş (Minogue ve ark., 2012) (Guo ve ark., 1998a; Wang ve ark., 2000), bazılarında ise gösterilememiştir (Miscia ve ark., 2002; Wesemann and Benveniste, 2003). Bütün bu çalışmalar TNF- α uyarımının Stat1'in DNA'ya bağlanmasını sağlayamadığı konusunda hemfikirdir. Öte yandan, Stat1'in TNFR1 ve TRADD ile doğrudan bağlantısı gösterilmiş (Pajak and Orzechowski, 2007; Wang ve ark., 2000; Wesemann and Benveniste, 2003) ve bu bağlantının, TNFR1-TRADD kompleksinin RIP1 ve TRAF2 ile bağlantısını engelleyerek TNFR1 aracılı NF- κ B aktivasyonunun baskılanmasına yol açtığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 2000; Wesemann and Benveniste, 2003). Stat1'in aksine, JAK1, Tyk2 (Kimura ve ark., 2004) ve JAK2 (Pincheira ve ark., 2008) TNFR1 aracılı NF- κ B aktivasyonunu etkilemiyor görünmektedir. TNFR1 sinyal iletimi, JAK/Stat3 yolağının aktivasyonunda rol oynadığı gibi, p38 aktivasyonu aracılığıyla bu yolağı inhibe eden SOCS-3'ün de mRNA stabilizasyonuna (Ehltting ve ark., 2007), dolayısıyla da Stat3 yolağının baskılanmasına (Campbell ve ark., 2001) da yol açabilmektedir.

2.3.7. TNFR1 aracılı PI3K/Akt Yolağı

TNFR1, ERK ve Stat yolaklarının yanı sıra, Akt yolağını da aktive etmektedir. TNF- α aracılı Akt aktivasyon yolağı, NF- κ B yolağının aktivasyonuna (Burow ve ark., 2000; Ozes ve ark., 1999) ve apoptosisin baskılanmasına (Sandra ve ark., 2002; Takahashi ve ark., 2007) neden olduğu gibi, hücreden hücreye farklılık göstermekle beraber epitel-mezenkimal geçiş (EMT)'e (Wang ve ark., 2013) veya hücre adhezyonuna (Bieler ve ark., 2007) yol açabilir. TNFR1 aracılı Akt aktivasyon mekanizması üzerinde, diğer yolaklara göre daha az çalışma vardır. Her ne kadar nötrofillerde gösterilememiş olsa da (Geering ve ark., 2011), HEK293 ve H1299 hücrelerinde, PI3K p85 alt ünitesi TNFR1 sitoplazmik kısmına bağlanmakta ve TNF- α muamelesi bu bağlantıyı kuvvetlendirmektedir (Pincheira ve ark., 2008). Bu bağlantı, TNF- α muamelesi sonrasında PI3K aktivasyonunu sağlamakta (Ozes ve ark., 1999) ve Akt aktivasyonuna yol açmaktadır. PI3K p85 alt ünitesinin TNFR1'e hangi bölgeden bağlandığı ve bu bağlanmanın hangi olaylarca nasıl düzenlendiği ise bilinmemektedir.

2.3.8. TNFR1 ve Protein Kinaz A

TNFR1 eksprese eden hücrelerde TNF- α muamelesi, hücre içi cAMP miktarının artışına, bu sayede de protein kinaz A (PKA) aktivasyonuna yol açmaktadır (El-Ani ve ark., 2014; Sippy ve ark., 1996). TNFR1 aracılı PKA aktivasyonu, TNFR1'in hücre dışına salınımında (Islam ve ark., 2008), hepatositlerin TNF- α aracılı apoptosise dirençli (Bhattacharjee ve ark., 2012), CD4+CD8+ timositlerin ise duyarlı hale gelmesinde (Guevara Patino ve ark., 2000) rol alabilirken, kimi hücrelerde artan (Zhang ve ark., 2013), kimi hücrelerdeyse azalan (Grandjean-Laquerriere ve ark., 2003; Shames ve ark., 2001) TNF- α sentezine yol açabilmektedir. Bunların yanı sıra, TNF- α aracılığıyla aktive olan PKA, Raf-1'i S259 noktasından fosforile ederek Raf-1 inhibisyonuna (von Bulow ve ark., 2007) ve Rel-A'yı S276'dan fosforile ederek NF- κ B aktivasyonunun artışına (Jamaluddin ve ark., 2007) neden olabilir. TNFR1 aracılı PKA aktivasyonunun neden farklı hücrelerde birbirine zıt etkiler uyandırdığı, TNFR1'in kendisinin bir PKA hedefi olup olmadığı ise bilinmemektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Malzemeler ve Solüsyonlar

- 1) **Antikorlar ve inhibitörler:** pAkt (5106S, 4051S, 9271S), Akt (9272S), p-p38 (9211L), p38 (9212S), pCREB (9198S), CREB (9197S), p85 (13666S), p-Stat3 (9138S), Stat3 (9132), TRADD (3684S), FADD (2732S) antikorları Cell Signaling Technology (CST)'den; pERK (sc-7383), ERK (sc-94), JAK2 (sc-294), RIP (sc-7881), Grb2 (sc-255), PKA (sc-903), GAPDH (sc-47724), His-Probe (sc-803), TNFR1 (ekstraselüler bölgeye spesifik monoklonal: sc-8436, ekstraselüler bölgeye spesifik poliklonal: sc-31349) antikorları, JAK2 inhibitörü (sc364735), PKA inhibitörü (sc-201160), ProteinA/G konjuge boncuklar (sc2003) ve EMSA spesifik Stat3 antikor (sc-482) Santa Cruz Biotechnologies'den; Protein Belirteci (161-0374) ve ProteinA-HRP (170-6522) BioRad'dan; Anti-Mouse-HRP (474-1806) ve Anti-Rabbit-HRP (474-1506) KPL'den; Lipofektamin-2000 (52887) ise Invitrogen'den satın alınmıştır.
- 2) **10X TBE (Tris-Borate-EDTA) Elektroforez Tamponu:** 108gr Tris Base (Fisher, BP152-1), 55gr Borik Asit (Merck) ve 40ml 500mM EDTA (pH8.0) karıştırılıp, bidistile su ile 1 litreye tamamlandı.
- 3) **1X TBE Elektroforez Tamponu:** 100ml 10X TBE, 900 ml bidistile su ile 1litreye tamamlandı.
- 4) **Luria Bertoni (LB) Sıvı Besiyeri:** %2'lik olacak şekilde 20gr LB (Merck), 200ml distile su içerisinde çözüldü. Kullanılacak miktarlara göre bölünüp, 121⁰C, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlandı.
- 5) **LB-Agar Katı Besiyeri:** 100ml LB sıvı besiyeri içerisine 1gr Bakteriyolojik Agar (Oxoid L11) eklenerek, otoklavlandı. Agar soğutulup, donmadan, 40-45⁰C sıcaklığa geldiğinde, 100mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde Amphicillin eklendi ve bakteriyolojik petri kaplarına dağıtıldı, donmasına izin verildi.
- 6) **1M Tris-HCl:** 121,1g Tris Base tartılıp, 800ml bidistile su ile çözdürüldü. HCl ile pH istenen değere ayarlanıp, bidistile su ile hacim 1litreye tamamlandı.

- 7) **3M Sodyum Asetat (NaAc):** 16,32 gr NaAc tartılıp, 20ml suda çözdürüldü. pH, glasiyel asetik asit (Merck) ile 5,2'ye ayarlanıp, hacim 40ml'ye tamamlandı. 1,5ml'lik eppendorflar içerisine 1000µl şeklinde alikotlanıp, -20⁰C'de saklandı.
- 8) **50 mM CaCl₂ (Sigma C1016) /10 mM Tris (pH:7.4):** 5,55gr CaCl₂ tartılıp, 900ml steril bidistile suda çözüldü. 10ml 1M Tris-HCl (pH7.4) eklenip, hacim steril bidistile su ile 1000ml'ye tamamlandı.
- 9) **2X HBS (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂HPO₄, 12mM D-glukoz, 50mM HEPES):** 8gr NaCl (Merck, 1.06404.1000), 0,37gr KCl (Sigma H3375), 0,3gr Na₂HPO₄.2H₂O (Merck 1.06345.1000), 1gr D-Glukoz (Sigma 16301) ve 5gr Hepes (Sigma H3375), 400ml steril bidistile suda çözdürüldü. pH 7.05'e ayarlandıktan sonra, hacim 500ml'ye tamamlandı. 0,2µm porlu vakum filtrelerden geçirilerek sterilize edildi.
- 10) **0,25M CaCl₂:** 2,78gr CaCl₂ (Sigma C1016), 100ml deiyonize su içerisinde çözüldü. 0,2µm porlu vakum filtrelerden geçirilerek sterilize edildi.
- 11) **5X PBS:** 40gr NaCl, 1gr KCl, 7,2gr Na₂HPO₄, 1,2gr KH₂PO₄ tartılıp, 800ml bidistile su içerisinde çözüldü. NaOH ve HCl ile pH 7.4'e ayarlandı. Hacim 1L'ye tamamlandı ve otoklavlandı.
- 12) **1X PBS:** 200ml 5X PBS, 800ml bidistile su ile 1litreye tamamlandı.
- 13) **1X PBS-T:** 1 litre 1X PBS içerisine 1ml Tween-20 (Merck 8.22184.1000) eklenip karıştırıldı.
- 14) **%1 BSA (Bloklaama Solüsyonu):** 1gr BSA, 100ml PBS-T içerisinde çözdürülüp, 2 kat kağıt filtreden geçirilerek süzüldü.
- 15) **%5 süt tozu (Bloklaama solüsyonu):** 5gr yağsız süt tozu, 100ml PBS-T içerisinde çözdürülüp, 2 kat kağıt filtreden geçirilerek süzüldü.
- 16) **Resolving Buffer (1,5M Tris Base, pH8.8):** 90,82gr Tris Base 400ml bidistile suda çözüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlanır. Hacim 500ml'ye tamamlanıp, 0,2µm porlu vakum filtreden geçirildi. +4⁰C'de saklandı.
- 17) **Stacking Buffer (0,5M Tris Base, pH6.8):** 30,25gr Tris Base 400ml bidistile suda çözdürüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlandı. Hacim 500ml'ye tamamlanıp, 0,2µm porlu vakum filtreden geçirildi. +4⁰C'de saklandı.

- 18) %10 SDS:** 50gr Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) tartılıp 300ml bidistile suda çözdürüldü. Hacim bidistile su ile 500ml'ye tamamlanıp, 0,2µm porlu vakum filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında saklandı.
- 19) Western Running Buffer (10X):** 15gr Tris Base, 94gr Glycine tartıldı. 900ml bidistile suda çözüldü. 50ml %10 SDS eklendi. Hacim 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
- 20) 1X Western Running Buffer:** Her yürütmeden önce, yürütülecek Western tankı başına 150ml 10X running buffer, 1350ml bidistile su ile karıştırıldı.
- 21) Akrilamid/Bisakrilamid (29/0,8):** 145gr Akrilamid (Merck 8,00830.1000) ve 4 gr Bisakrilamid (Merck, 2610) 400ml bidistile suda çözdürüldü. Hacim 500ml'ye tamamlanıp, 0,2µm porlu vakum filtreden geçirildi. Kahverengi şişelere koyulup, +4⁰C'de saklandı.
- 22) Akrilamid/Bisakrilamid (29/1):** 29 gr Akrilamid ve 1 gr Bisakrilamid, 80ml bidistile su içerisinde çözdürüldü. Hacim bidistile su ile 100ml'ye tamamlandıktan sonra, 0,2µm porlu vakum filtreden geçirildi. Kahverengi şişelere koyulup, +4⁰C'de saklandı.
- 23) Strip Off Solüsyonu:** 12,5ml Stacking Buffer, 20ml %10 SDS, 67,5ml bidistile su karıştırılıp mikrodalga fırında 30sn kadar (55⁰C'ye gelene kadar) ısıtıldı. İçerisine, 704µl beta-merkaptioethanol eklendi ve 55⁰C'ye ayarlanmış inkübatörde bekletildi.
- 24) SDS Yükleme Tamponu (2X Laemmlı Buffer) :** 1ml gliserol, 3ml %10 SDS (Merck 8.22050.1000), 1,25 ml (1M) Tris-HCl pH:6,7, 1-2 µg bromofenol mavisi eklendi. 0,45µm porlu filtreden geçirilip eppendorflara alikotlandı ve -20⁰C'de saklandı. Kullanmadan önce 1ml'ye 50 µl β-merkaptioetanol (Sigma M3148) ilave edildi.
- 25) EMSA Yükleme Tamponu:** 15mg Bromofenol Mavisi tartılıp, 15ml %50 gliserol içerisinde çözdürüldü. 0.2µm porlu filtrelerden geçirilip alikotlanarak -20⁰C'de saklandı.
- 26) %10 Amonyum Persülfat (APS):** 0,1gr APS (Sigma A3678), 1ml distile suda çözüldü. Taze hazırlanıp, maksimum 6 gün +4⁰C'de saklandı.

- 27) Western Transfer Tamponu:** 14,5gr Tris Base ve 7,5gr Glycine (Vivantis PR0608) tartılıp, 2 litre bidistile suda çözdürüldü. Kullanılmadan önce 500ml Ethanol eklenip karıştırıldı.
- 28) Triton-X Lizis Tamponu:** 100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl₂-Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadate (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche-cat. no: 11 836 145 001). Solusyon pH: 7,4 (pH metre: Hanna Instruments pH 211)'e ayarlandı.
- 29) 1,2M HEPES:** 2.86gr HEPES, 8ml bidistile suda çözdürüldü, pH'ı 7.5'e ayarlanıp hacmi 10ml'ye tamamlandı.
- 30) 0,6M MnCl₂:** 0.97 gr MnCl₂.H₂O, 10ml bidistile suda çözdürüldü.
- 31) 0,6M MgCl₂:** 1.2 gr MgCl₂.6H₂O 10ml bidistile suda çözdürüldü.
- 32) JAK2 *In vitro* Kinaz Tamponu:** 60mM HEPES (pH7,5), 3mM MgCl₂, 3mM MnCl₂, 3µM Sodium Orthovanadate (Na₃VO₄), 1.2mM DTT, 2,5µg/50µl PEG-20000 olacak şekilde hazırlandı. Bunun için, 18.5mg DTT üzerine 500µl 0,6M MnCl₂, 500µl MgCl₂, 5ml HEPES, 3.3µl Na₃VO₄, 5mg PEG20000 eklenip, hacim 50ml'ye tamamlandı.
- 33) PKA *In vitro* Kinaz Tamponu:** 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, %0.01 Brij35 şeklinde hazırlanıp, pH7.5 olacak şekilde ayarlandı.
- 34) Whole Cell Extraction (WCE) Tamponu (pH7.0):** 20mM HEPES, 400mM KCl, 0.5mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, %20 Gliserol, %1 NP40 şeklinde hazırlanıp, pH7'ye ayarlandı. 50ml içerisinde 1 tablet proteaz inhibitör tableti (Roche, 11 836 145 001) çözdürülerek kullanıldı.
- 35) 4X Stat3 Gel Shift Lizis Tamponu:** 40mM HEPES (pH7.9), 400mM NaCl, 0,4mM EDTA, %20 Gliserol, %0.04 NP-40, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄ şeklinde hazırlandı.
- 36) Bradford için Stok BSA (10mg/ml):** 100mg BSA tartılıp, 10ml steril distile su içerisinde çözdürüldü. 0,2µm porlu filtrelerden geçirilip, -20 °C'de saklandı.

37) %50 Gliserol: 50ml %100 gliserol, 50ml bidistile su ile karıştırıldı.

38) MTT (5 mg/ml): 50mg (Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, AppliChem, A2231), 10ml steril 1X PBS içerisinde çözdürüldü ve steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek karanlıkta muhafaza edildi. Kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

39) 0.16M Sülfürik Asit (ELISA Stop Solüsyonu): 148ml bidistile suya, 2ml 12M Sülfürik asit eklenerek hazırlandı.

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmamız SV-40 virüsünün büyük T antijeni ile transforme insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293T kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler, L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Dana Serum (FBS-Biochrom cat. No:S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfotersin B (BI-03 033 113) ve gentamisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modifeid Eagle Medium – Biochrom FG0415) içinde monolayer kültürler halinde; %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik ortamda çoğaltıldı. Deneyin gerçekleştirildiği hücrelerin 12-30 pasaj sayısı arasında olmasına dikkat edildi.

3.3. İnsan TNFR1 plazmidinin, tirozin fosforilasyon ve PKA fosforilasyon mutantlarının E. coli DH5α suşuna transformasyonu

3.3.1 Kompetan Hücre Yapımı

Daha önceden dondurulmuş ve 600nm dalga boyundaki optik dansitesi 0,2-0,3 olan DH5α *E.coli* bakterilerinden 20µl alınıp, 10ml Luria Broth (LB) sıvı besiyerine koyuldu ve 37°C çalkalamalı inkübatörde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda çoğalan bakterilerden 1ml alınıp, 200ml LB besiyerine koyuldu ve 4 saat 37°C inkübatörde çoğaltıldı. Bakterilerin 600nm dalga boyundaki optik dansitesi 0,2-0,5 arasına ulaştıktan sonra, buz üzerine alınıp 10 dakika soğuması için bekletildi. 50ml'lik falkon tüplere bölünüp, +4°C ve 2000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, her bir tüpe 25ml 50mM CaCl₂/10mM Tris (pH:7,4) ilave edildi ve 15 dakika buzda bekletildi. Ardından, yine +4°C ve 2000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, çökelti üzerine 9ml 50mM CaCl₂/10mM Tris (pH:7,4) ve 1ml %100 gliserol eklenip homojenize edildi. 100ul'lik alikotlara ayrılıp -80°C'ye kaldırıldı.

3.3.2 Kompetan hücelere plazmidlerin transformasyonu

Kompetan hüceler, -80°C 'den buz üzerine çıkartıldı ve buz üzerinde çözülmesine izin verildi. Steril bir eppendorfa, kompetan hücreden $50\mu\text{l}$ ve $50\text{-}100\text{ng}$ DNA koyuldu. Buz üzerinde yarım saat bekletildikten sonra, 42°C 'de 1 dakika ısı şoku uygulandı ve tekrar buza alındı. Üzerine, $950\mu\text{l}$ antibiyotiksiz LB eklenip 37°C çalkalamalı inkübatörde 1 saat çoğalmasına izin verildi. Bunun ardından, $100\mu\text{g/ml}$ Amphotericin eklenmiş (antibiyotikli) olan LB-Agar plakalara yayma gerçekleştirildi. Gece boyu inkübasyonun ardından, tek koloni seçimi gerçekleştirildi.

3.3.3 Yabancıl tip ve mutant TNFR1 ekspresyon vektörleri ile transforme edilmiş bakterilerden gliserol stok oluşturulması

Tek koloni seçimi gerçekleştirilmiş bakteriler, LB sıvı besiyerinde çoğaltılıp, 2'şer tüp stoklandı. Bunun için, her bir tüpe $500\mu\text{l}$ bakteri kültürü, $500\mu\text{l}$ ise %20 gliserol içeren antibiyotikli LB besiyeri eklendi ve -80°C 'ye kaldırıldı.

3.4. Plazmid İzolasyonu

Gliserol stok olarak saklanmış olan bakteriden, $50\mu\text{l}$ alınıp, 100ml $100\mu\text{g/ml}$ Amphotericin eklenmiş (antibiyotikli) LB besiyerine ekildi ve gece boyu çoğalmasına izin verildi. Ertesi gün, kültürler 50ml 'lik falkonlara alınıp, 4500rpm 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atılıp, elde edilen çökeltiden Invitrogen Purelink HiPure Midiprep kiti (K2100-14) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Kısaca tarif etmek gerekirse, çökelti RNAz eklenmiş Resüspansiyon Tamponu (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, $100\mu\text{g/mL}$ RNase A)'da çözündürüldükten sonra, eşit hacimde Lizis Tamponu (200mM NaOH, 1% SDS) eklendi ve 5-6 defa alt üst edildi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra yine aynı hacimde soğutulmuş Çökeltme Tamponu (3.0M potasyum asetat, pH 5.5. pH ayarı glacial asetik asit ile yapılır) eklenerek alt üst edildi. 10000rpm , oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilirken, anyon değişim kolonlarına 10ml Dengeleme Tamponu (0.1 M Sodyum asetat, pH 5.0, 0.6 M NaCl, 0.15% (v/v) Triton® X-100) eklendi. Dengelenmiş kolonlara santrifüjde elde edilen süpernatant pipetle alınarak eklendi ve akmasına izin verildi. Ardından, kolon 2 kere (eğer presipitat çoksa 3 kere) 10ml Yıkama Tamponu (0.1 M Sodyum asetat, pH 5.0; 825 mM NaCl) ile yıkandı. Ardından, kolonda kalan DNA, 5ml Elüsyon Tamponu (100

mM Tris-HCl, pH 8.5 1.25 M NaCl) ile temiz 15'lik falkona alındı ve üzerine 3,5ml izopropanol (Sigma) eklendi. Alt üst edilip iyice karışması sağlandıktan sonra, 1 dakika oda sıcaklığında bekletilip, hemen ardından 10000rpm'de +4⁰C'de 45 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılıp çökelti üzerine 5ml soğuk %70'lik alkol eklendi ve 10000rpm'de +4⁰C'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, çökelti kurumaya bırakıldı. Alkol içeriği uçtuktan sonra, çöken DNA, pellet kütlesine göre 200-300ul TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) içerisinde çözdürüldü. DNA konsantrasyonu, µDrop Plate'e 2µl yüklenerek MultiSkan (Thermo) spektrofotometrede ölçüldü. Ayrıca, plazmidlerin yapısal olarak sağlam olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

3.5. TNFR1 geninin PCR yöntemi ile çoğaltılması

PCR reaksiyonu, CG Palm Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.1. PCR Reaksiyonu, İçeriği ve Koşulları

Dizileme yöntemiyle plazmidlerin kontrol edilebilmesi için, pcDNA3.1A vektör iskeletini tanıyan primerler kullanıldı. Kullanılan ileri primer dizisi 5' – GCGTTTAAACGGGCCCTCTAGACTC-3', geri primer dizisi ise 5'-GTCGACGGCGCTATTCAGATCCTC-3' idi. PCR reaksiyon karışımı, 5µl Q solüsyonu (Qiagen), 2,5µl 10X tampon (Qiagen), 1pmol dNTP, 1pmol ileri primer, 1pmol geri primer, 3 ünite Taq Polimeraz, 100ng plazmid DNA'sından oluşmaktaydı. PCR koşulları, 95⁰C'de 5' ilk denatürasyonun ardından, 95⁰C'de 45'', 61⁰C'de 30'', 72⁰C'de 2'25''den oluşan 35 döngü, son olarak 72⁰C'de 15' final uzama evrelerinden oluşmaktaydı.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

3.6.1 %1,5'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

1,5 gram toz agaroz (Sigma Cat. A5093) tartılarak 100 ml 1X TBE'de (Tris-Sigma / Borat- Merck 1.00165.1000 / EDTA – Sigma E5134) çözüldü. 50⁰C'ye gelene kadar soğutuldu. 0,5 µg/ml etidyum bromür (Sigma E87519) ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıcak agaroz jel elektroforez küvetine döküldü. Oda

sıcaklığında 15-20 dk polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden çıkarıldı ve agaroz jel elektroforez tankına (BIORAD) yerleştirildi.

3.6.2 Agaroz Jelin Yürütülmesi ve Görüntüleme

%1,5'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 100 bç'lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 40 dk yürütüldü. Süre sonundan örnekler UV ışık veren transilluminatör yardımıyla incelendi.

3.7. Sanger Dizileme

PCR ile çoğaltılıp, agaroz jel elektroforezi ile doğrulanan TNFR1 kodlama bölgesi, PCR pürifikasyonu'nun ardından tekrar jelde kontrol edildi. Saflaştırılan PCR ürünleri, sekans reaksiyonuna tabi tutulup, elde edilen ürünler etanol presipitasyonu yöntemiyle saflaştırıldı. Ardından, ABI MicroAmp Fast 96 kuyucuklu optik plakalara örnekler yüklenip 3130XL cihazında yürütülüp analiz edildi.

3.7.1 PCR pürifikasyonu

Agaroz jelde kontrol edilen PCR ürünleri, PureLink Quick PCR Purification Kit (Invitrogen) kullanılarak saflaştırıldı. Bunun için, 21µl PCR ürünü üzerine 84µl Buffer B2 koyulup karıştırıldı ve saflaştırma kolonlarına yüklendi. 10000g (12500rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. İnen solüsyon atılıp, kolona 650µl Wash Buffer eklendi. 12500rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. İnen solüsyon atıldı ve kolon tekrar, maksimum hızda (13400rpm) 2 dakika santrifüj edildi. Kolonun altı peçeteyle kurulandıktan sonra steril ependorfa alındı ve 50µl su yüklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 13400rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon atılıp, tüpe inen DNA agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

3.7.2 Sekans Reaksiyonu

Sekans reaksiyonu, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ile kuruldu. 2µl su, 3.2pmol geri primer, 2µl 5X tampon, 1µl BigDye, 2µl saflaştırılmış PCR ürünü (toplam hacim 10µl) karıştırılıp, 96⁰C'de 1 dakika ön denatürasyonun ardından, 96⁰C'de 10'', 50⁰C'de 5'' ve 60⁰C'de 4 dakika aşamalarından oluşan döngülerde 25 döngü boyunca tutuldu.

3.7.3 Sekans Reaksiyonunun Ethanol Presipitasyonu ile Saflaştırılması

Sekans reaksiyon ürünleri, 2µl 3M NaAc (pH5.2) ile karıştırılıp steril eppendorflara alındı. PCR tüpleri, 30µl soğuk %100 ethanolle yıkayıp, karışım eppendorflara eklendi. Eppendorflar, en az 30 dakika boyunca -20⁰C'de tutuldu. Bunun ardından, maksimum hızda +4⁰C'de 20 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant, dibe değmeden pipetle alınıp atıldı. 500µl soğuk %70 ethanol eklenip, maksimum hızda +4⁰C'de 7 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant yine dibe değmeden atılıp, tüpler SpeedVac vakum konsantratör cihazında orta (medium) hızda kurutuldu.

3.7.4 Sekans Ürünlerinin Cihaza Yüklenmesi

Kurutulan sekans reaksiyon ürünleri, 15µl enjeksiyonluk su ile çözülüp MicroAmp Fast 96 kuyucuklu optik plakalara transfer edildi. ABI 3130 Genetic Analyzer cihazında, Sequencing Analysis programında yürütüldü. Sequencing Analysis yazılımı kullanılarak, sekans analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, FourPeaks for MacOS yazılımı kullanılarak değerlendirildi ve resimlendirildi.

3.8. HEK293T Hücrelerinin CaPO₄ Presipitasyonu Yöntemi ile Transfeksiyonu

293T hücreleri, transfeksiyondan bir gün önce, 100mm'lik hücre kültür kaplarına, ertesi gün %60-70 yaygınlıkta olacak şekilde pasajlandı. Hücre kültür kabı başına 8µg düşecek şekilde, her seferinde ikişer tekrarlı transfeksiyon gerçekleştirildi. Bunun için, 16µg plazmid DNA'sı steril 15ml'lik tüp içerisine alındı. Hacmi 1ml'ye tamamlayacak miktarda, oda sıcaklığına getirilmiş 2X HBS eklendi. Gerekli havalandırma sağlanarak, 1ml 0,25M CaCl₂ damla damla eklendi ve presipitat oluşana kadar oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Presipitatlar tüp kenarlarında gözlemlenince, tüpler vortekslenildi ve pipetaj yapılarak transfeksiyon karışımı 950µl/plate dağıtıldı. Gece boyu inkübe edildikten sonra, ertesi gün besiyeri uzaklaştırıldı ve %10 oranında gliserol ya da DMSO içeren besiyeri koyulup 1 dakika bekletildi. Ardından bu besiyeri de alınıp, yerine %10 serumlu tam kültür besiyeri koyuldu.

3.9. HEK293T Hücrelerinin TNF-α ile muamelesi

Transfekte edilip şoklanmış ve taze besiyeri eklenmiş olan hücrelerden, transfeksiyonun 48.saatinde besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 5ml serumsuz besiyeri koyuldu. Hücre kültür inkübatöründe 16 saat serumsuz besiyerinde inkübe edilen (serum starvation)

hücrelere, 5µl Sodyum Orthovanadate (Na_3VO_4) eklenip 1 saat inkübe edildi. Ardından, 10ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde TNF eklenip istenen süre boyunca inkübe edildi.

PKA aktivasyonunun sağlanacağı durumda, Hücrelere Na_3VO_4 muamelesinin ardından 10µl Forskolin eklenip 30 dakika inkübasyonu sağlandı. Bu sürenin sonunda TNF muamelesi gerçekleştirildi.

İstenen ajanlarla muamele edilen hücrelerden, hücre lizatı toplandı.

3.10. Western Blot için Hücre Lizatı Hazırlanması

Hücrelerden besiyeri uzaklaştırılıp, hücreler PBS ile yıkandı. Ardından, petrilere uygulanacak işleme göre 500µl-1ml arası TritonX lizis tamponu eklendi ve petrilere buz üzerine alındı. Cell scraper ile hücreler kazınarak, 1.5ml'lik eppendorf tüplerine alındı. -80°C'de saklandı. Kullanılmadan önce, en az 1 dakika vorteksenerek çözdürüldü ve 10000rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süpernatant, steril tüpe alınıp 80°C'de saklandı. Deney günü, protein konsantrasyonu belirlendi.

3.11. Stat3 Gel Shift (EMSA) için Hücre Lizatı Hazırlanması

Transfeksiyon sonrası 48.saatte, hücrelerden besiyeri uzaklaştırılıp, serum starvation yapıldı. 16 saat serumsuz ortamda kültüre edilen hücrelerden, hiçbir muamele yapılmaksızın ya da 30 dakika 10ng/ml TNF ile muamele edilerek lizat toplandı. Bunun için, hücreler 1X PBS ile 1 kere yıkandıktan sonra, petrilere, içerisine proteaz inhibitör kokteyli eklenmiş olan (1tablet/50ml) soğuk PBS koyuldu ve hücreler kazınarak 1.5ml'lik eppendorf tüplere alındı. 13400rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı. Pellet, 300µl Stat3 Gel Shift lizis tamponu ile vorteksenerek çözüldü. Alikotlanarak 80°C'de saklandı. Deney günü, protein konsantrasyonu belirlendi.

3.12. Kaspaz Aktivasyon Deneyi için Hücre Lizatı Hazırlanması

Transfeksiyon sonrası 48. saatte, serum starvation yapılmaksızın, hücrelere 10ng/ml konsantrasyonda TNF muamelesi yapıldı ya da kontrol olarak bırakıldı. 24 saat sonra, hücre besiyerleri alındı, lizatlar 500µl soğuk PBS ile kazınarak toplandı ve 1.5ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. 13400rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından, süpernatantlar atıldı ve pellet 50µl Cell lysis buffer (Biovision K106-200; Biovision K113-200)

içerisinde çözdürüldü. Buz üzerinde 10 dakika bekletildi ve 13400rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Süpernatant temiz tüpe alınıp -80°C'de saklandı. Deney günü, protein konsantrasyonu belirlendi.

3.13. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (Bradford)

Toplanan hücre lizatlarının protein miktarı Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi kullanılarak BSA standartına karşı gerçekleştirildi. Kısaca tarif etmek gerekirse, stok BSA (10mg/mL) solüsyonundan 1µg/µl olacak şekilde BSA solüsyonu hazırlandı. Standart eğrinin çizilmesi için bu solüsyondan üçlü tekrarlar olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara 1, 3, 5, 7 ve 9µg olacak şekilde ayrı ayrı konuldu. Yine -80°C'deki hücre lizatları buzda eritilerek aynı 96 kuyucuklu kaba üçer tekrar olacak şekilde 1'er µl ilave edildi. BSA standardı ile örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Üçlü tekrarların ortalama verisi alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.14. Immunopresipitasyon (IP)

Western blot için toplandığı şekilde toplanan hücre lizatlarının protein konsantrasyonu belirlendikten sonra, istenen protein miktarını (protein miktarı deneye göre değişkenlik gösterebilmekteydi) içeren hücre lizatı, steril ependorfa alındı. Hacim, içerisinde proteaz inhibitörü bulunan TritonX lizis tamponu ile 950µl'ye tamamlandı. Üzerine, 50µl Agaroz-ProteinG/A boncuklar (Santa Cruz, sc-2003) eklendi ve +4 °C'deki nutatörde 1 saat çalkalamalı olarak inkübe edildi. 1 saat sonunda, örnekler 10000rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve süpernatant temiz tüpe alındı (Pre-clearing aşaması). 1mg protein lizatına 2µg antikor olacak şekilde indirilmek istenen proteini tanıyan antikor eklendi ve +4 °C'deki nutatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonra, tüplere 100µl Agaroz-ProteinA/G eklendi ve yine +4 °C'deki nutatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, örnekler 10000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. 1000µl tritonX lizis tamponu eklenip tekrar santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Bu yıkama aşaması, en az 2 defa tekrarlandı. En son yıkamadan sonra, çökelti hiç süpernatant kalmayacak şekilde temizlendi ve içerisine β-merkaptioethanol eklenmiş olan SDS yükleme tamponu eklendi. Kaynar suda, her 1.5 dakikada bir vortekslenmek suretiyle 5 dakika kaynatıldı. 10000rpm'de 1 dakika santrifüj gerçekleştirildi ve örnekler SDS jele dibe değmeden

alınarak yüklendi. Sonrasında western blot ile analiz gerçekleştirildi. Her bir IP'nin incelenmesi için, presipitasyon yapılan antikor hangi organizmadansa (fare ya da tavşan) o organizmanın IgG'si ile de bir tüpte IP yapılarak, IgG kontrol örneği sağlandı.

3.15. Western Blot (WB)

3.15.1 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için jelin hazırlanması

Resolving (ayrıştırıcı) jel, istenen konsantrasyona, yani incelenecek protein büyüklüğüne göre, aşağıdaki tablo'dan yola çıkarak hazırlandı. APS ve TEMED eklenir eklenmez, ayarlanmış camların arasından döküldü. Üzeri, %1 SDS ile kaplanarak polimerizasyon esnasında dalgalanması engellendi.

Resolving Jel	7%	10%	12%	15%
ddH ₂ O	15ml	11,55ml	10,5	7,05
Resolving Buffer	7,5ml	7.5ml	7,5	7,5
Acr:BisAcr (29:08)	7,05ml	10.5ml	12	15
10% SDS	300ul	300ul	300ul	300ul
10% APS	300ul	300ul	300ul	300ul
TEMED	30ul	30ul	30ul	30ul

Tablo 3.1: SDS-Poliakrilamid Jel Hazırlama Ölçüsü

Alt jel donduktan sonra, stacking (hizalayıcı) jelin hazırlanmasına geçildi. Bir jel için 3ml su, 1.25ml stacking buffer, 625µl Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8), 50µl %10 SDS, 50µl APS ve 5µl TEMED koyularak hazırlanan karışım, jelin üzerine SDS atılıp suyla yıkandıktan sonra döküldü. Taraklar takılıp donması için 1 saat beklendi.

3.15.2 Örneklerin jelde yürütülmesi

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 100 µg alınarak üzerine yarı hacminde β-merkaptotanol içeren SDS yükleme tamponu konuldu ve 95°C'de 5 dk bekletildi. Uygun pipet uçlarıyla, hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 120 voltta, resolving jelde ise 150 voltta yürütüldü (Cihaz: Amersham 80-6171-96). Yürüme sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.15.3 SDS-PAGE'de Yürütülmüş Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Örnekler yürütüldükten sonra transfer için kullanılacak süngerler transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer aparatının siyah veya negatif yüklü olacak kısmına süngerlerden biri

yerleştirildi. Üzerine transfer tamponunda ıslatılmış whatman kağıdı yerleştirildi. Bunun üzerine örneklerin yürütüldüğü jel cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak kondu. Jel üzerine saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Biorad Cat. No: 1620177) hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı (Sigma Z691011) ve diğer sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Bekletmeden transfer tamponuyla doldurulan ve buz içerisine konulmuş transfer cihazına yerleştirildi. Plate elektrodlu transfer tankı için 40V, tel elektrodlu transfer tankı içinse 73V elektrik akımı ayarlanıp, örnekler gece boyu transfer edildi.

3.15.4 PVDF Membranın İşaretlenmesi

Transferin ardından, membranlar metanolde 1 dakika fikse edildikten sonra, işaretleme kabına alınıp 2 saat uygun bloklama solüsyonu ile bloklandı. Antikorum karakterine göre bloklama solüsyonuna karar verildi. Örneğin, arka plan işaretleme (non-spesifik bantlar) veren antikolar kullanılacağında %5 süt tozu, özellikle fosfo-tirozin işaretleme gibi işaretlemelerdeyse %1 BSA tercih edildi. Bunun ardından, %1 BSA içerisinde hazırlanmış antikor dilüsyonları ile 1 saat oda sıcaklığında, ya da gece boyu +4 °C'de primer antikor ile muamele edildi. Primer antikolar alındıktan sonra, blotlar 1X PBS-T ile 30'ar dakikadan 2 defa yıkandı. Ardından %1 BSA içerisinde 1/5000 ya da 1/2500 dilüsyonda hazırlanmış sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında işaretlendi. Sekonder antikorum uzaklaştırılmasının ardından blot 2x30' 1X PBS-T ile yıkandı. . ECL reaktifi (Biorad Clarity ECL Cat.1705061) ilave edildi ve 1 dk beklendikten sonra bu da uzaklaştırıldı ve kemilüminasana duyarlı film karanlık odada blot'ın üzerine konarak 1 dakika bekletildi. Görüntüleme için film, film banyo cihazında (Kodak 8116428) banyo edildi.

Görüntülenerek fosforilasyon seviyesi belirlenen proteinlerin, bazal seviyelerinin belirlenmesi amacıyla işaretleme yapılacak spesifik antikor uygulamasından önce fosforile formun belirlendiği membrana "strip off" işlemi uygulandı. Strip off ile antikor işaretlemesinden kurtulan membranlar, bu defa da total proteini tanıyan antikolarla yine anlatılan şekilde işaretlendi.

3.15.5 Strip Off İşlemi

Çalkalamalı inkübatör ve strip off solüsyonu 55°C'ye getirildi. Ağız kapalı plastik kaba konan membranın üzerine ısıtılmış strip off solüsyonu koyuldu. Membran çalkalamalı inkübatörde 30 dk çalkalandı. Bunun ardından solüsyon uzaklaştırıldı ve blot PBS-T (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Bu aşamadan sonra membran tekrar daha önce bahsedilen koşullarda işaretlendi.

3.16. *In Vitro* Kinaz Reaksiyonu

In vitro kinaz reaksiyonu, aşağıda anlatılan şekliyle kurulup inkübasyon süreleri sona erdiğinde, içerisinde β -merkптоethanol olan SDS yükleme tamponunda çözülüp SDS-PAGE'de yürütüldü ve Western Blot ile analiz edildi.

3.16.1 JAK2 *In Vitro* Kinaz Reaksiyonu

TNFR1'in JAK2 tarafından fosforilasyonunun gösterilmesi için, yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilmiş hücreler, Na_3VO_4 muamelesinin ardından, a) muamele yapılmadan, b) 30 dakika TNF ile muamele edildikten sonra TNFR1 ve JAK2 immünopresipitasyonu gerçekleştirildi. IP sonrası elde edilen çökeltiler (antikor-protein kompleksleri) SDS yükleme tamponunda değil, 1ml reaksiyon tamponunda (her bir reaksiyonda kullanılan tampon solüsyonlar kısmında yazılıdır) çözdürüldü. Santrifüj yapıp süpernatantlar atıldıktan sonra, tekrar 50 μ l 1X kinaz tamponunda çözüldü ve bunlar bir tüpte birleştirildi. Karışımın üzerine 1 ml kinaz tamponu eklenip, 10000rpm'de 1 dakika santrifüjlenip süpernatant atıldı. Bu yıkama aşaması, 2 kere tekrarlandı. Pelletin üzerine, 50 μ l JAK2 kinaz tamponu eklenip çözdürüldü. ATP, JAK2 kinaz tamponunda 1/10 oranında seyreltildikten sonra, tüpe 1 μ l ATP dilüsyonu (10 μ M) eklendi. 30°C'de 30 dakika inkübe edildi.

3.16.2 PKA *In Vitro* Kinaz Reaksiyonu

TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyonunun gösterilmesi için, yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilmiş hücreler, Na_3VO_4 muamelesinin ardından, a) muamele yapılmadan, b) 30 dakika TNF-a ile muamele edildikten sonra, c) 1 saat Forskolin muamelesinden sonra, d) 1 saat Forskolin ve ardından 30 dakika TNF-a muamelesinden sonra toplanarak, TNFR1 immünopresipitasyonu gerçekleştirildi. PKA'nın katalitik alt ünitesi hazır olarak satın alındı (NEB P6000S).

TNFR1 immünopresipitasyon ürünü, PKA kinaz tamponunda 2 defa yıkayıp 50µl PKA kinaz tamponunda çözdürüldü. Başka bir tüpte, 1µl PKA (2.5×10^6 U/ml), 9 µl su ile seyreltildi. Seyreltilmiş PKA'dan 1µl alınarak, TNFR1 tüpüne eklendi. ATP, PKA kinaz tamponunda 1/10 oranında seyreltikten sonra, tüpe 1µl ATP dilüsyonu (10µM) eklendi. 30°C'de 30 dakika inkübe edildi.

3.17. Stat3 Gel Shift (EMSA) Yöntemi

Stat3 DNA bağlanma etkinliğinin gösterilebilmesi için, Thermo'nun kemilüminesan EMSA kitinden (Thermo, 20148) faydalanıldı. Önce küçük (mini) jel aparatına, %6'lık akrilamid-bisakrilamid jel döküldü. Bu jelden APS'in temizlenmesi için , jel 120V'da yarım saat pre-run'a tabi tutulurken, yabancı tip ve mutant TNFR1 ile transfekte edilmiş hücrelerden 3.12'de anlatıldığı şekilde bağlanma reaksiyonları kuruldu. Pre-run bittikten sonra, reaksiyon ürünleri jel'e yüklendi ve yükleme tamponu jelin ¾'ünü yürütüğünde durduruldu. Ardından, jeldeki ürünler pozitif yüklü naylon membrana transfer edildi. Transferden sonra UV altında cross-link işlemi gerçekleştirilip, membran streptavidin-HRP ile işaretlendi. ECL muamelesinin ardından, radyolojik görüntüleme ile bantlar belirlendi.

3.17.1 %5'lik Akrilamid/Bisakrilamid Jelin Dökülmesi

Mini jel camları hazırlandıktan sonra, 3.925ml su, 500µl 5X TBE, 1.1ml Akrilamid/Bisakrilamid (29/1), 250µl %50 gliserol, 75µl APS ve 5µl TEMED karıştırılarak jel hazırlandı. Jel, camların arasından dökülüp tarak takıldı ve donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra, soğuk 0.5X TBE yürütme tamponu içerisinde, yarım saat 120V'da yürütüldü (pre-run).

3.17.2 Stat3 Bağlanma Reaksiyonunun Kurulması

Stat3 bağlanma reaksiyonunda, Free Probe ve Supershift deney tüpleri de hazırlandı. Free probe, lizat koyulmayan örnekti. Yani bu tüpe, 16.5µl su, 2µl Binding Buffer (kit içeriği), 1µl poli-d-IC (pdIC) koyuldu. 10 dakika sonra, 0.5µl Biotin işaretli Stat3 probu (Viagene, SIDET003b) eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Reaksiyon tüplerine, 2µl Binding Buffer, 1µl pdIC(400 ng/ml), 10µg protein miktarını verecek kadar hücre lizatu, hacmi 19.5µl'ye tamamlayacak kadar su koyuldu. 10 dakika beklendikten sonra 0.5µl Stat3 probu eklendi. 20 dakika reaksiyona izin verildi.

Supershift tüpüne, 2µl Binding Buffer, 1µl pdIC, 10µg protein miktarını verecek kadar hücre lizatu, hacmi 18.5µl'ye tamamlayacak kadar su koyuldu. 10 dakika beklendikten sonra 0.5µl Stat3 probu eklendi. 15 dakika sonra, 1µl Stat3 antikoru (Santa Cruz,) eklendi. 15 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi.

Reaksiyon sürelerinin sonunda, tüplere 5µl EMSA yükleme tamponu eklenerek reaksiyonlar durduruldu ve jele yükleme aşamasına geçildi.

3.17.3 Jele Yükleme ve Transfer

Örnekler EMSA yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi. 0.5X TBE'de, 135V'da, yükleme tamponu jelin $\frac{3}{4}$ 'ünü geçene kadar yürütüldü. Bu esnada, pozitif yüklü naylon membran (Thermo, 77016), 0.5X TBE'ye dengelenmesi için bırakıldı. Transfer aşamasında, bir kat sünger, 2 kat whatman kağıdı 0.5X TBE'de ıslatılarak kasede koyuldu. Sonra jel, ardından dengelenmiş naylon membran, onların üzerine de yine 0.5X TBE'de ıslatılmış 2 kat whatman kağıdı ve sünger koyuldu. Kaset kapatılıp transfer tankına yerleştirildi. Transfer, 0.5X TBE içerisinde, +4 °C'de 400mA'de 45 dakika boyunca gerçekleştirildi.

3.17.4 UV cross-link ve işaretleme

Transfer süresi tamamlandıktan sonra kaset açıldı ve membran 254nm dalga boyu UV ışığı veren transillüminatöre yerleştirildi. Membran kıvrılana kadar bekletildi. Ardından, kit içeriğindeki bloklama solüsyonu ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama süresi sonunda, 1/300 dilüsyonu verecek kadar Streptavidin-HRP antikoru eklenip, Streptavidin'in probdaki Biotin'e bağlanmasına izin verildi. Streptavidin-HRP ile 15 dakika işaretlemenin ardından, yıkama solüsyonu ile 3 defa 5'er dakika yıkama gerçekleştirildi. Sonrasında, 5 dakika equilibration buffer'da çalkalama yapıldı ve bunun ardından equilibration buffer boşaltılıp membran ECL ile 5 dakika muamele edildi. Western blot işaretlemesinde olduğu gibi, radyolojik görüntü alındı.

3.18. Kaspaz Aktivasyon Deneyleri

Kaspaz aktivasyon deneyleri, kolorimetrik kaspaz aktivasyon kitleri (Biovision K106-200 ve K113-200) kullanılarak gerçekleştirildi. Öncelikle, bölüm 3.13’de anlatıldığı gibi toplanan lizatların, protein konsantrasyonu 3.14’de anlatılan şekilde belirlendi. Her bir lizatın 150µg protein miktarını verecek kadarı 96 kuyucuklu plate’in kuyucuklarına alınıp, hacim kitin lizis tamponu ile 50µl’ye tamamlandı. Bir tüpe, 1ml 2X reaksiyon tamponu alınıp, bu tüpe 10µl DTT eklendi. Bundan, örneklerin koyulduğu kuyucuklara 50µl eklendi. Üzerine kaspaz 3 aktivasyon deneyi için 5µl DEVD-pNA, kaspaz 8 aktivasyon deneyi içinse 5µl IETD-pNA eklendi. Plate’ler, alüminyum folyo ile kaplanıp 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda spektrofotometre (Multiskan Spectrum) ile 400nm dalga boyunda ölçüm alındı.

3.19. NF-κB Aktivasyonunun Belirlenmesi

Yabancı tip ve mutant TNFR1 plazmidlerin konsantrasyonları ölçüldü. 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 150ng NF-luc ve 150ng yabancı tip ya da mutant TNFR1 plazmidini 25µl serumsuz besiyeri içerisinde verildi. Kuyucuk başına 25µl serumsuz besiyeri içerisinde 0.4µl Lipofektamin-2000 (Thermo-Fisher Cat. 18324012) olacak şekilde lipofektamin karışımı hazırlanıp kuyucuklara dağıtıldı. 20 dakika kompleks oluşumunun ardından, 100µl serumlu besiyeri içerisinde 25.000 293T hücresi her bir kuyucuğa dağıtıldı. Transfeksiyon sonrası 24. saatte her örnek için 5’er kuyucuğa serumlu besiyeri, 5’er kuyucuğa ise serumlu besiyeri içerisinde final konsantrasyon 10ng/ml olacak şekilde TNF eklendi. 6 saat sonra ise, OneGlo lusiferaz assay (Promega) kullanılarak Fluoroskan Ascent Luminometre ile 20milisaniye ölçüm alındı.

Lüsiferaz aktivite sonuçlarının, hücre sayısı nedenli farklılıklardan etkilenmemesini sağlamak adına, eşzamanlı MTT gerçekleştirilip, lusifer sinyalleri hücre sağkalım oranlarına göre normalize edilerek değerlendirildi.

3.20. MTT Canlılık Testi

NF-κB aktivasyonunun normalizasyonu için, 6 saat inkübasyon süresi sonrasında, kuyucuklara 20µl MTT ajanı eklendi. 37°C sıcaklık ve %5 CO2’li kültür ortamında 4 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda, besiyeri-MTT karışımı uzaklaştırılıp, 100µl

DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma) eklenip iyice karıştırılarak boyanın çözünmesi sağlandı. Spektrofotometre ile 540nm ve 690nm dalga boylarında ölçüm alındı.

TNFR1 mutantlarının hücre proliferasyonuna etkilerinin belirlenmesi için, boş, yabancı tip ya da mutant TNFR1 vektörleri, 25µl serumsuz, antibiyotiksiz besiyerinin içerisinde 300ng olacak şekilde, 10'ar tekrar halinde kuyucuklara dağıtıldı. Üzerlerine, 25µl serumsuz ve antibiyotiksiz besiyeri içerisinde 0.4µl Lipofektamin-2000 olacak şekilde 25µl lipofektamin-besiyeri karışımı eklendi. 20 dakika kompleks oluşumuna izin verildikten sonra her bir kuyucuğa serumlu besiyeri içerisinde 25.000 293T hücresi eklendi. 24 saat inkübasyonun ardından, 6'şar kuyucuğa final konsantrasyonu 10ng/ml olacak şekilde TNF- α , 6'şar kuyucuğa ise taze besiyeri eklendi. 24 saat ek inkübasyon süresini takiben, yukarıda anlatıldığı şekilde MTT ajanı eklenip MTT analizi gerçekleştirildi.

3.21. TNFR1 ELISA

Yabancı tip ve mutant TNFR1 plazmidlerin konsantrasyonları ölçüldü. Final konsantrasyonu 8 ng/µl olacak şekilde serumsuz besiyeri içerisinde çözüldü. Negatif kontrol olarak salmon sperm kullanıldı. 96 kuyucuklu plâtelere her bir plazmid için, 12'şer kuyu olacak şekilde 20'şer kuyuya, ilgili plazmidi içeren serumsuz besiyerinden 25 µl eklendi.

Lipofektamin ® Transfeksiyon Solüsyonu (Thermo-Fisher Cat. 18324012) serumsuz besiyerinde final konsantrasyonu 1,2 µl/ 100 µl olacak şekilde sulandırıldı. Plazmidlerin koyulmuş olduğu kuyucuklara, bu solüsyondan 25 µl/kuyucuk şeklinde dağıtıldı. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Bu esnada, 293T hücreleri tripsinize edilip sayıldı. Sayım sonucuna göre, 250000hücre/ml olacak şekilde seyreltilip, inkübasyon süresinin sonunda kuyucuklara 100µl/kuyucuk dağıtıldı. Hücreler, 48 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO₂' li kültür ortamına inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda, her bir plazmidle transfekte edilmiş 6'şar kuyuya 10ng/ml konsantrasyonu sağlayacak şekilde TNF- α içeren besiyeri, diğer kuyucuklara ise TNF- α içermeyen besiyeri eklendi. 1 saat 37°C sıcaklık ve %5 CO₂' li kültür ortamında inkübe edildi. 1 saat sonunda, besiyerlerinden 100µl alınıp ELISA plate'lerine (Corning, 3590) aktarıldı. Parafilmle

üzeri örtülüp, alüminyum folyo ile sarılan ELISA plate'leri +4 °C'de 48 saat coating için bekletildi.

Kaplama (coating) süresinin sonunda, besiyerleri dökülüp silkelenerek uzaklaştırıldı ve 100µl %1 BSA eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bloklamadan sonra kuyucuklar 2 defa 200µl 1XPBS-T ile yıkandı. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara 1/1000 dilüsyonda hazırlanmış, TNFR1 ekstraselüler bölgesini tanıyan goat-anti TNFR1 antikor (Santa Cruz, sc-31349) eklenip bu da 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Antikor bekleme süresinin sonunda tekrar 2 defa 200µl PBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından, BSA içerisinde 1/750 dilüsyonda hazırlanmış ProteinA-HRP (BioRad, 170-6522) eklenip oda sıcaklığında, karanlık ortamda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklar tekrar 2 defa PBS-T ile yıkandı ve TMB (Thermo, 34021) eklenerek karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erip mavi renk oluşunca, kuyucuklara ELISA stop solüsyonu (0.16M Sülfürik Asit) eklendi ve spektrofotometrede 450nm dalga boyunda ölçüm alındı.

3.22. Veritabanı Analizi

TNFR1 aminoasit dizilimine baktığımızda, death domain üzerinde 2 adet potansiyel tirozin fosforilasyon motifi, 2 adet de potansiyel PKA fosforilasyon motifi saptamıştık. Bunların mass spektrofotometri analizi ile daha önce saptanıp saptanmadığını belirlemek için, phosphositePlus (Cell Signaling) veritabanından (Hornbeck ve ark., 2015) faydalandık.

3.23. Grafikler ve İstatistiksel Analizler

Western Blot ve EMSA sonuçları, Image J yazılımı ile, sekans sonuçları FourPeaks for MacOS yazılımı ile analiz edildi. Grafikler, GraphPad Prism yazılımı ile oluşturulup, istatistiksel analizlerde yine aynı yazılımdan faydalanıldı.

4. BULGULAR

4.1 TNFR1 Aminoasit Diziliminin İncelenmesi ile Potansiyel Fosforilasyon Motiflerinin Belirlenmesi

TNFR1 proteininin JAK2 tarafından tirozin fosforilasyonuna, PKA tarafından serin/threonine fosforilasyonuna uğratıldığının gösterilmesinin ardından, TNFR1 üzerindeki potansiyel fosforilasyon motiflerini taradık. Öncelikle, TNFR1 proteininin sitoplazmik bölgesinde konsensus PKA fosforilasyon motifini (RxxS/T; x: herhangi bir aminoasit) ve bilinen tirozin fosforilasyon motiflerini (YxxM, YxxL, YxxV, YxxI) taradık. TNFR1 ölüm bölgesi (DD) üzerinde, 2 adet potansiyel tirozin fosforilasyon motifi, 2 adet potansiyel PKA fosforilasyon motifi olduğunu saptadık. Bunun yanı sıra, DD'in ardından, proteinin C-terminal bölgesine çok yakın bir SH3 bağlanma motifi (PxxP) bulunduğunu belirledik (Şekil 4.1).

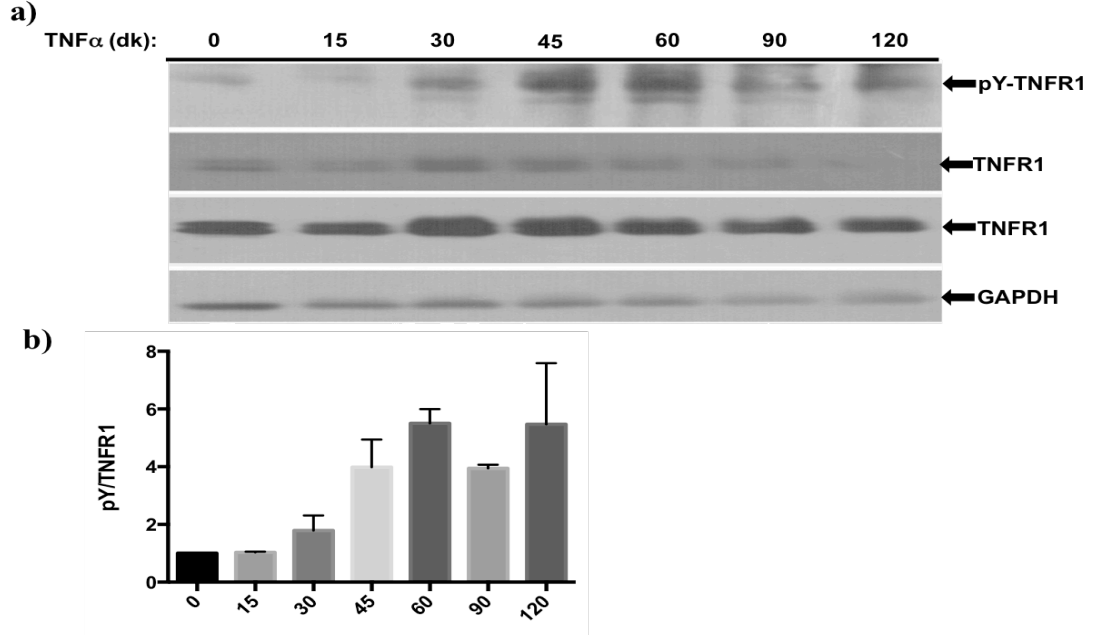
```
MGLSVPDLLLPLVLELLLVGIYPSGVIGLVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQ
NNSICCTKCHKGTLYNDCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCS
KCRKEMGQVEISSCTVDRDTVCGCRKNQYRHYWSENLFQCFNCSLCLN
GTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTKLCLPQIEN
VKGTEDSGTTVLLPLVIFFGLCLLSLLFIGLMYRYQRWKSPLYIVCGKST
PEKEGELEGGTTKPLAPNPSESPPTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCP
NFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDPIPNPLOKWEDSAHKPOS�DIDD
PATLY360AVVENVPPLRWKEFVRRRLGLSDHEIDRLELONGRCLREAQ
Y401SMLATWRRRT411PRREAT417LELLGRVLRDMDLLGCLEDIEEALC
GPAALPPAPSLLR-454
```

Şekil 4.1: TNFR1 aminoasit dizisi üzerindeki potansiyel post-translasyonel modifikasyon noktalarının gösterilmesi. İtalik gösterilen bölge TNFR1 sinyal peptidini (1-21 aa arası), altı çizili bölge sitoplazmik bölgeyi (235-455 aa arası), koyu yazılı bölge DD bölgesini (356-441 aa arası) göstermektedir. YAAV ve YSML (kırmızı) tirozin fosforilasyon motiflerine, RRRT ve REAT (mor) PKA fosforilasyon motiflerine uyum göstermektedir. PPAP (yeşil) bölgesi ise, SH3 bağlanma bölgesi motifi ile uyumludur.

4.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyonuna Uğradığının Gösterilmesi

TNFR1'in Akt, ERK, Stat3 gibi yolakları aktive edebildiğinin bilinmesi, bu reseptörün tirozin fosforilasyonuna uğruyor olabileceğini düşünmemize neden oldu. TNFR1'in tirozin fosforilasyonuna uğrayıp uğramadığını anlamak için, yabancı tip TNFR1 vektörü ile transfekte edilmiş 293T hücrelerine, farklı süreler boyunca TNF- α muamelesi yaptık. Transfeksiyon sonrası 48.saatten itibaren 16 saat serumsuz besiyerinde kültüre edilmiş hücrelere, 1 saat Na₃VO₄ muamelesi yapılarak hücre içi fosfatazların inhibe edilmesinin

ardından 15 dakika, 30 dakika, 45 dakika, 60 dakika, 90 dakika ve 120 dakika TNF- α muamelesi gerçekleştirildi ve hücre lizati alındı. Örnekler SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra western blot ile önce fosfo-tirozin, ardından TNFR1 ve GAPDH işaretlendi. **Şekil 4.2**’de görüldüğü üzere, TNFR1, TNF- α muamelesinin 30. Dakikasından itibaren tirozin fosforilasyonuna uğramakta ve bu fosforilasyon 2 saat boyunca sürmektedir.



Şekil 4.2: TNFR1 tirozin fosforilasyonunun Western Blot ile gösterilmesi. TNFR1 yabancıl tip vektörü ile transfekte edilmiş hücreler 16 saat serum starvation’ın ardından 1 saat fosfataz inhibitörü Na₃VO₄ ile, bunun ardından da belirtilen sürelerde de TNF- α ile muamele edilmiştir. a) Western blot ile, önce fosfo-tirozin (pY20) işaretlemesi yapılmış, aynı membran strip off ile antikorlardan arındırılarak TNFR1 ve GAPDH işaretlemesi yapılmıştır. b) Bağımsız deneylerin sonuçları, ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş, pY/TNFR1 bant intensiteleri TNF’siz örneklerde 1 kabul edilerek normalize edilmiştir. Grafik çiziminde, GraphPad prism yazılımından faydalanılmıştır.

Fosfo-tirozin western blot sonuçları, TNF- α muamelesinin 30.dakikasından itibaren TNFR1 tirozin fosforilasyonunun 2 kat arttığını, 60. Dakikada ise başlangıçtaki 6 katına çıktığını göstermekteydi (**Şekil 4.2b**).

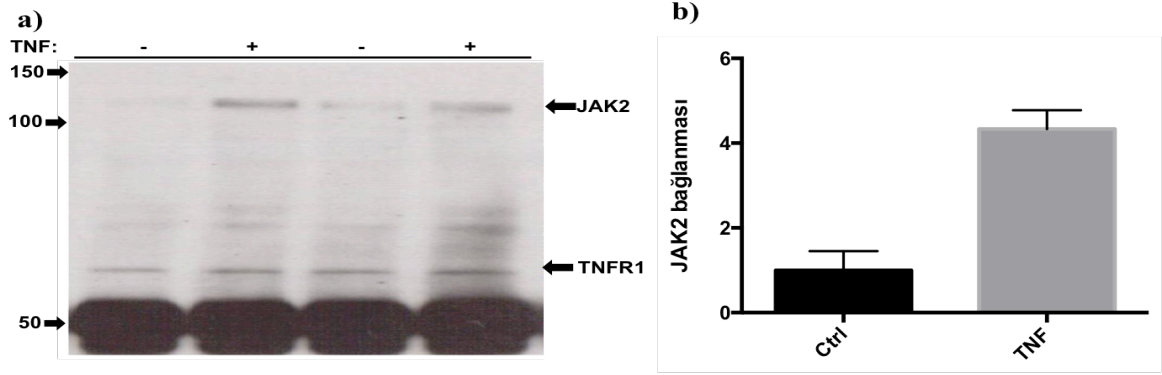
4.3. TNFR1 Tirozin Fosforilasyonundan Sorumlu Tirozin Kinazın Belirlenmesi

Bir tirozin kinaz olan JAK2’nin TNF- α muamelesi sonrasında fosforile olduğu ve TNFR1 ile etkileşime girdiği bilindiği için (Minogue ve ark., 2012; Pincheira ve ark., 2008),TNFR1 tirozin fosforilasyonunu gerçekleştiren kinazın JAK2 olabileceğini düşündük. Bu nedenle önce JAK2-TNFR1 arasındaki etkileşimi doğrulamak için

immunopresipitasyon, sonrasında JAK2'nin TNFR1'i direk fosforile edip etmediğini belirlemek için JAK2 *in vitro* kinaz reaksiyonu gerçekleştirdik.

4.3.1 TNFR1 ve JAK2 Arasındaki Fiziksel Etkileşimin Gösterilmesi

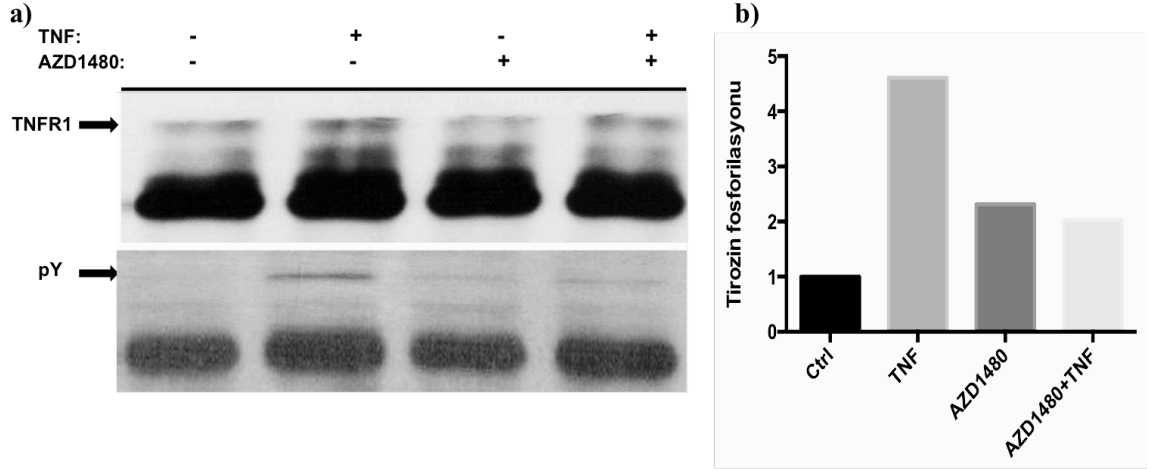
Yabancı tip TNFR1 plazmidi ile transfekte edilmiş 293T hücrelerinden, yarım saat TNF- α muamelesi yapılmış ve yapılmamış hücrelerden hücre lizatları toplandı. TNFR1 monoklonal antikoru ile immunopresipitasyon gerçekleştirilip JAK2 işaretlemesi yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, JAK2, TNF- α yokluğunda TNFR1'e zayıf bir şekilde bağlanırken, TNF- α muamelesi ile JAK2-TNFR1 etkileşimi kuvvetlenmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: TNFR1-JAK2 arasındaki fiziksel etkileşim. a) TNF muamelesi olmaksızın ve 30 dakika TNF muamelesi yapılmış lizatlardan TNFR1 immunopresipitasyonu yapıp, iki tekrar halinde yüklenmiş ve bunlarda JAK2 işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) TNF muamelesi ile JAK2-TNFR1 etkileşimi yaklaşık 5 kat kuvvetlenmektedir. Bant intensiteleri ImageJ yazılımı ile analiz edilip GraphPad Prism yazılımı ile grafiklendirilmiştir.

4.3.2 JAK2, TNFR1'i Direkt Olarak Fosforile Etmektedir.

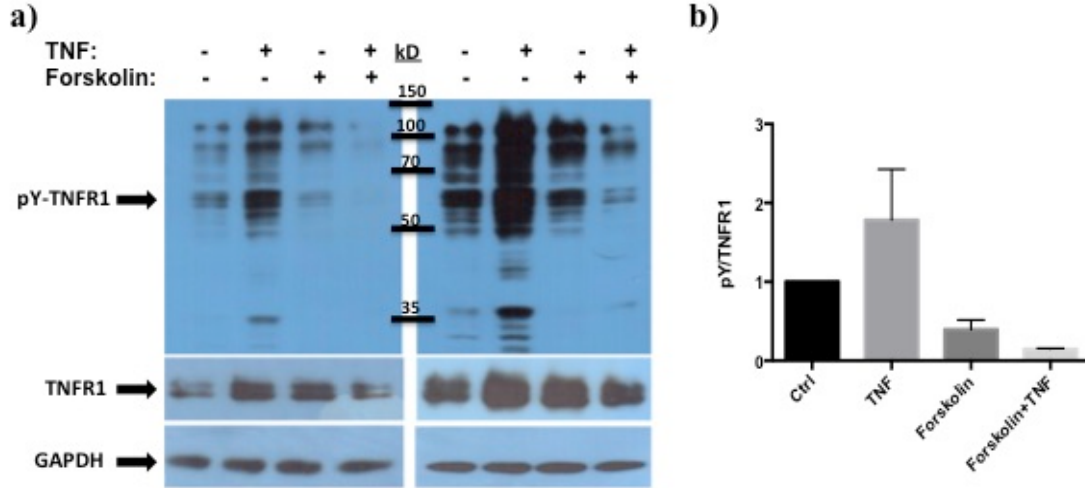
JAK2'nin TNFR1'i fosforile edip edemediğini göstermek için, TNFR1 aşırı ekspresyonu sonrasında TNF- α muamelesi yapılmamış örneklerden TNFR1 immunopresipitasyonu, eşzamanlı olarak da 30 dakika 10ng/ml TNF- α muamelesi yapılmış lizatlardan JAK2 immunopresipitasyonu gerçekleştirildi. JAK2 ve TNFR1 immunopresipitasyon ürünleri bir tüpte birleştirilerek, yöntemler kısmında anlatıldığı gibi *in vitro* kinaz reaksiyonu kuruldu. Eş zamanlı olarak, aynı şekilde hazırlanmış olan *in vitro* kinaz reaksiyon tüplerine JAK2 inhibitörü AZD1480 de eklendi. Şekil 4.4'de de gösterildiği gibi, JAK2, TNF- α bağlı TNFR1'i tirozin fosforilasyonuna uğratmakta, bu tirozin fosforilasyonu ise AZD1480 varlığında baskılanmaktadır.



Şekil 4.4: JAK2 in vitro kinaz reaksiyonu. a) TNF- α muamelesi yapılmaksızın ve 30 dakika 10ng/ml TNF ile muamele edilmiş lizatlardan çöktürülen JAK2 proteini ile TNF- α muamelesi yapılmamış lizatlardan çöktürülen TNFR1 arasında, JAK2 inhibitörü AZD1480 varlığında ve yokluğunda in vitro kinaz reaksiyonu gerçekleştirildi. Üst figür TNFR1 işaretlemesini, alt figürse fosfo-tirozin işaretlemesini göstermektedir. TNFR1 bantları 4 örnekte de benzer intensitedeyken, belirgin tirozin fosforilasyonunun sadece TNF- α varlığında ve AZD1480 yokluğunda gözlemlendiği görülmektedir. b) Bant intensiteleri ImageJ yazılımı ile analiz edilmiş, fosfo-tirozin bant intensiteleri TNFR1 bant intensitelerine oranlanarak GraphPad yazılımı ile grafikleştirilmiştir.

4.4. TNFR1 Tirozin Fosforilasyonu, PKA aktivatörü Forskolin Tarafından Baskılanmaktadır

TNFR1 aracılı TNF- α sinyalleşmesi, PKA aktivasyonuna yol açmaktadır (Sippy ve ark., 1996). PKA sinyal yolağınnsa; TNFR1 ekzozomal salınımına yol açtığı (Islam ve ark., 2008), TNFR1'in proliferatif yolaklarını baskılayıp, apoptotik yolaklarını aktive ettiği bilinmektedir (Guevara Patino ve ark., 2000; Liu ve ark., 2004). TNFR1 ve PKA arasındaki bu etki, bize, TNFR1 sinyal yolağının PKA tarafından bir negatif geribesleme mekanizması ile düzenlendiğini düşündürdü. PKA aktivasyonunu sağlamak için, Hint Kolyoz bitkisi diterpenoidi olan ve hücre içi cAMP miktarını artırarak PKA aktivasyonu sağlayan Forskolin (Alasbahi and Melzig, 2012) kullanıldı. **Şekil 4.5'**de de gösterildiği gibi, Forskolin TNF- α aracılı TNFR1 tirozin fosforilasyonunu tamamen baskıladı.



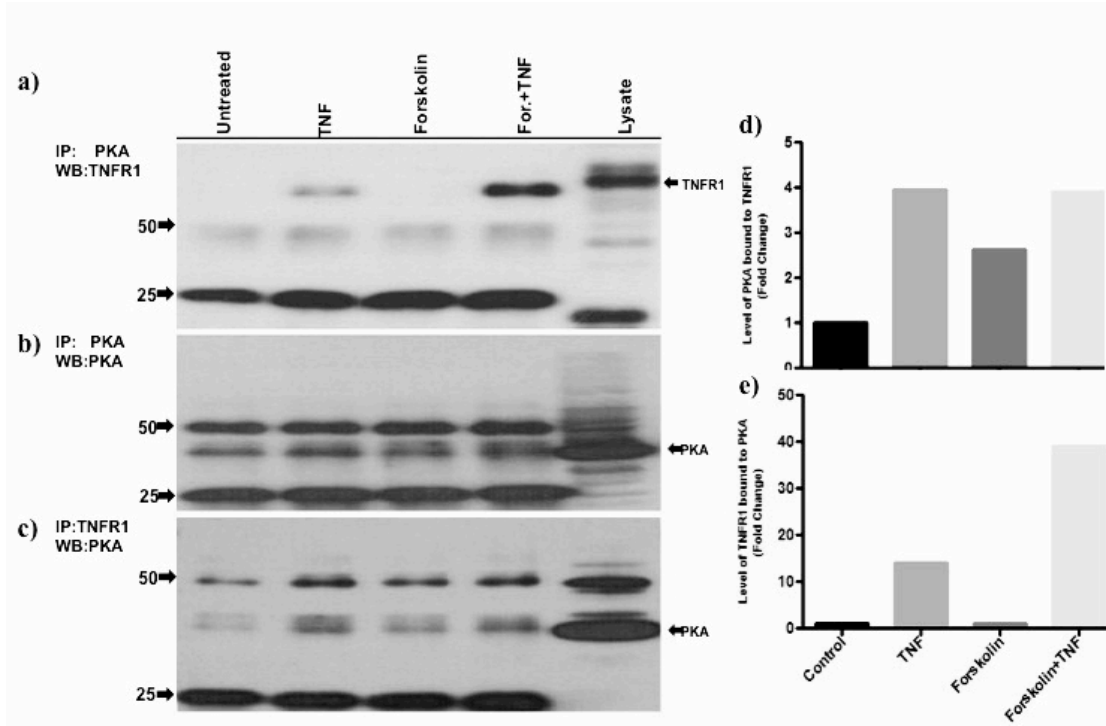
Şekil 4.5: Forskolin varlığında, TNF- α aracılı TNFR1 tirozin fosforilasyonu engellenmektedir. TNF ve Forskolin ile muamele edilmiş ya da edilmemiş lizatlar, SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra, önce fosfotirozin antikoruyla, sonrasında ise blotlar strip off yapıp TNFR1 ve GAPDH antikorlarıyla işaretleme gerçekleştirilmiştir. TNFR1'in TNF'li ortamda tirozin fosforilasyonuna uğradığı, Forskolin'in ise TNF aracılı tirozin fosforilasyonunu engellediği görülmektedir.

4.5. TNFR1'in, PKA tarafından Fosforile Edildiğinin Gösterilmesi

PKA aktivatörü Forskolin'in TNFR1 tirozin fosforilasyonu üzerindeki fosforilasyonu engelleyici etkisi, bize TNFR1'in PKA tarafından fosforile ediliyor olabileceğini ve bu fosforilasyonların yük itimi nedeniyle tirozin fosforilasyonunu engelleyici rol oynayabileceğini düşündürdü. Bu düşüncemizi test etmek amacıyla, öncelikle TNFR1-PKA etkileşimini immunopresipitasyon ile, sonra ise PKA'nın TNFR1'i direkt olarak fosforile edip etmediğini ise *in vitro* kinaz reaksiyonu ile sorguladık.

4.5.1 TNFR1 ve PKA Arasındaki Fiziksel Etkileşimin Gösterilmesi

TNFR1 ve PKA arasındaki etkileşimi sorgulamak için, TNFR1 aşırı ekspresyonu sağlanmış hücrelerden Na₃VO₄ dışında herhangi bir müdahale yapılmaksızın, TNF- α muamelesi sonrası, Forskolin muamelesi sonrası ve Forskolin+TNF muamelesi sonrası lizat topladık. Bu lizatlardan TNFR1 ve PKA immunopresipitasyonu yapıp, TNFR1 immunopresipitasyon örneklerinde PKA, PKA immünopresipitasyon örneklerinde ise PKA ve TNFR1 işaretlemesi gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PKA, ligandına bağlanan TNFR1'e bağlanmakta ve Forskolin-aracılı PKA aktivasyonu, bu bağlantıyı daha da kuvvetlendirmektedir (Şekil 4.6).

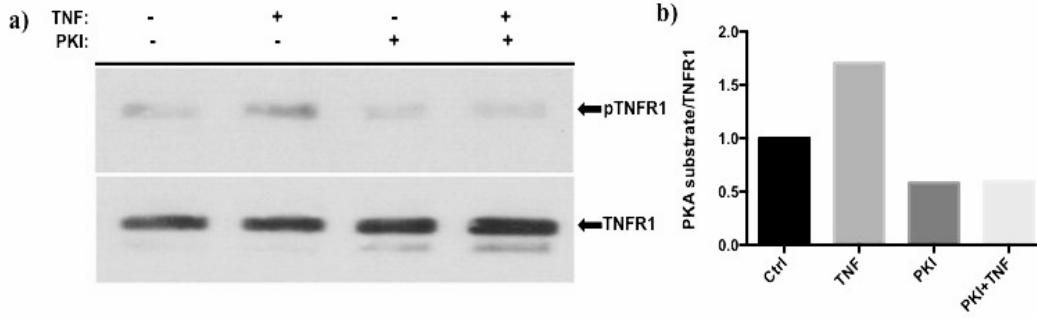


Şekil 4.6: PKA ve TNFR1 birbirine bağlanmaktadır. a) PKA immunopresipitasyonunda TNFR1 işaretlemesi, b) PKA immunopresipitasyonunda PKA işaretlemesi, c) TNFR1 immunopresipitasyonunda PKA işaretlemesi, d) TNFR1'e bağlanan PKA miktarı (a panelindeki bantlar ImageJ ile analiz edilip GraphPad Prism ile grafiklendirilmiştir), e) PKA'ya bağlanan TNFR1 miktarı (c panelindeki bantlar ImageJ ile analiz edilip GraphPad Prism yazılımıyla grafiklendirilmiştir).

4.5.2 TNFR1, PKA Tarafından Direkt Olarak Fosforile Edilmektedir

TNFR1 ve PKA arasındaki fiziksel etkileşimi gösterdikten sonra, TNFR1'in PKA tarafından fosforile edilip edilmediğini *in vitro* kinaz reaksiyonu kurarak sorgulamak istedik. TNFR1 transfeksiyonu sonrasında 48. Saatte serumsuz ortama alınmış, sonrasında Na_3VO_4 ile muamele edilmiş hücrelerden, TNF- α muamelesi yapılmaksızın ya da 30 dakika 10ng/ml TNF- α muamelesi sonrasında hücresel lizat toplandı. Bu lizatlardan, TNFR1 monoklonal antikoruna ile TNFR1 çöktürüldü. Yöntemler kısmında anlatılan şekilde, saflaştırılmış şekilde satın alınan PKA katalitik alt ünitesi ile *in vitro* kinaz reaksiyonu kuruldu. Kinaz reaksiyonu, dört tüp şeklinde tasarlandı: 1) TNF muamelesi yapılmamış lizattan çöktürülen TNFR1 proteini + PKA katalitik alt ünitesi, 2) TNF- α muamelesi yapılmış lizattan çöktürülen TNFR1 + PKA katalitik alt ünitesi, 3) TNF muamelesi yapılmamış lizattan çöktürülen TNFR1 proteini + PKA katalitik alt ünitesi + PKA inhibitörü (PKI), 4) TNF- α muamelesi yapılmış lizattan çöktürülen TNFR1 + PKA katalitik alt ünitesi + PKI. Reaksiyon ürünleri, SDS-PAGE'de yürütülüp

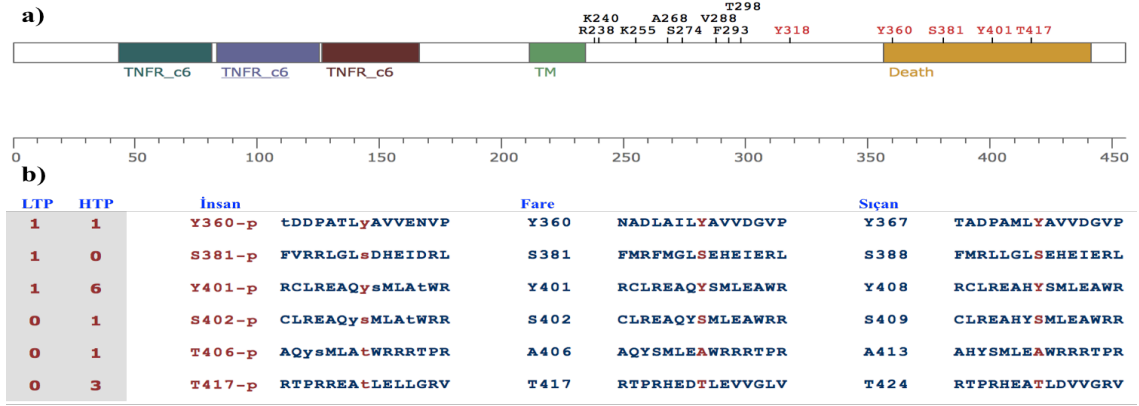
PKA sübstrat antikoru ile western blot işaretlemesi gerçekleştirildi. Aynı blot, strip off yapıp TNFR1 antikoru ile işaretlendi. **Şekil 4.7**'de gösterildiği üzere, TNF- α bağlı TNFR1, PKA tarafından fosforile edilmekte ve PKI, bu fosforilasyonu engellemektedir.



Şekil 4.7: TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyonunun in vitro kinaz reaksiyonu ile gösterilmesi. a) In vitro kinaz reaksiyon fosfo-PKA sübstrat işaretlemesi. Üst blot PKA sübstrat işaretlemesini, alt blot TNFR1 işaretlemesi. b) a panelindeki bantlar ImageJ ile analiz edilip GraphPad Prism ile grafiklendirilmiştir.

4.6. Veritabanı Analizi ile TNFR1 Proteini Üzerindeki Fosforilasyon Noktalarının Doğrulanması

Aminoasit dizilimine bakarak belirlediğimiz Y360, Y401, T411 ve T417 dizilerinin fosforile olup olmadığını öğrenmek için, örneklerimizi hizmet alımı yoluyla Mass Spektrometri analizi yapılmak üzere Purdue Üniversitesi'ne gönderdik. Anlaşma sağlamış olduğumuz grubun cihaz arızası nedeniyle sonuç elde edememesinden dolayı, TNFR1 proteini için Mass Spektrometri veritabanı Phosphosite.org'da tarama yaptık. Bulduğumuz dört motiften üçünün (Y360, Y401, T417) modifikasyonunun Mass Spektrometri ile daha önce gösterildiğini belirledik. Fakat bu modifikasyonların hangi enzimlerce yapıldığı ve TNFR1 sinyal iletimi üzerinde nasıl bir etkisi olduğu bilinmemektedir (**Şekil 4.8**).

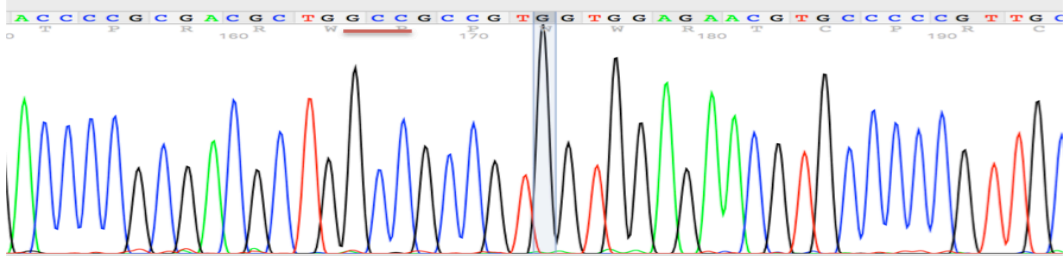


Şekil 4.8: TNFR1 proteini üzerindeki post-translasyonel modifikasyonlar. a) TNFR1 aminoasit dizilimi üzerinde 1'den fazla defa gösterilmiş post-translasyonel modifikasyonlar. Sarı bölge, ölüm bölgesi (DD)'ni göstermektedir. b) LTP: Site-spesifik yöntemlerle gösterilme sayısı, HTP: proteomik keşif modlu Mass Spektrometri ile gösterim sayısı. Şekil, <http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=4952&showAllSites=true> web sayfasından alıntılanmıştır.

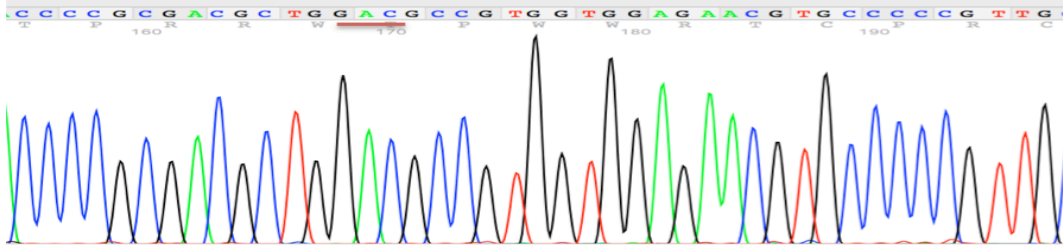
4.7. TNFR1 Proteini Üzerindeki Potansiyel Tirozin Fosforilasyon ve PKA Fosforilasyon Noktalarının Aspartik Asit ve Alanin Mutantlarının Elde Edilmesi

TNFR1'in potansiyel fosforilasyon noktalarının motif tabanlı tespitinin ardından, fosforilasyonların fonksiyonel etkilerini tespit edebilmek için hedeflendirilmiş mutasyonla TNFR1 mutantlarını temin ettik. Daha önceden pcDNA3.1a plazmid iskeletine klonlanmış ve bu aşamaya kadarki deneylerde TNFR1 aşırı ekspresyonu sağlamak için kullanılmış yabanıl tip TNFR1 vektörü üzerinde, fosforilasyona uğrama ihtimali olan Y360, Y401, T411 ve T417 aminoasitlerini, fosforile edilemez alanin (A) ve fosforilasyonu taklit edebileceğini düşündüğümüz aspartik asit (D) aminoasitlerine hizmet satın alımı yoluyla dönüştürdük. Temin ettiğimiz mutant plazmidlerin dizilerini, sekans analizi ile doğruladık (Şekil 4.9).

Y360A (TAC>GCC)

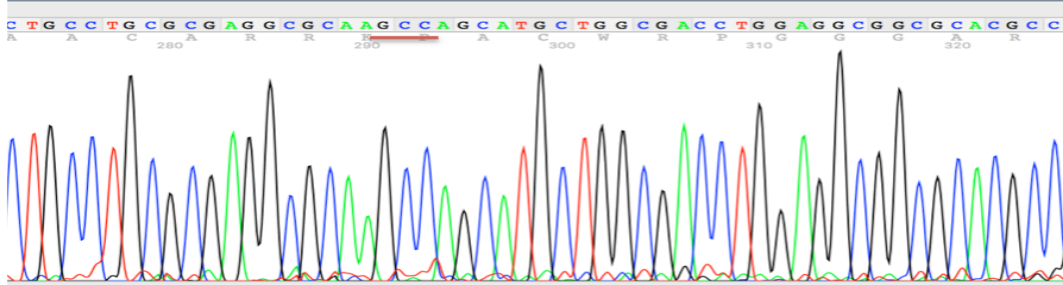


Y360D (TAC>GAC)

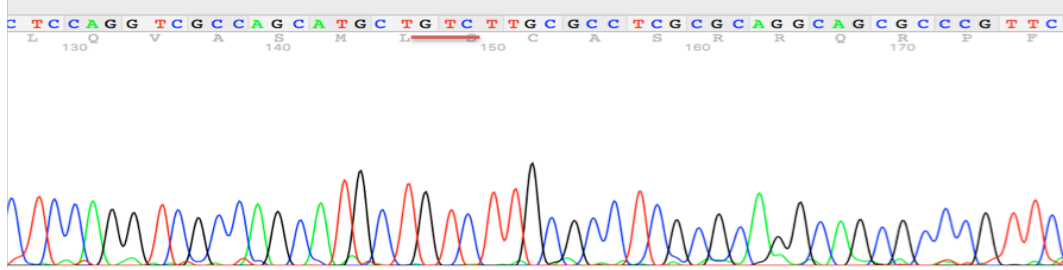


Yabanıl tip dizi: CCCGCGACGCTGT**TAC**₃₆₀GCCGTGGTGGAGAA

Y401A (TAC>GCC)

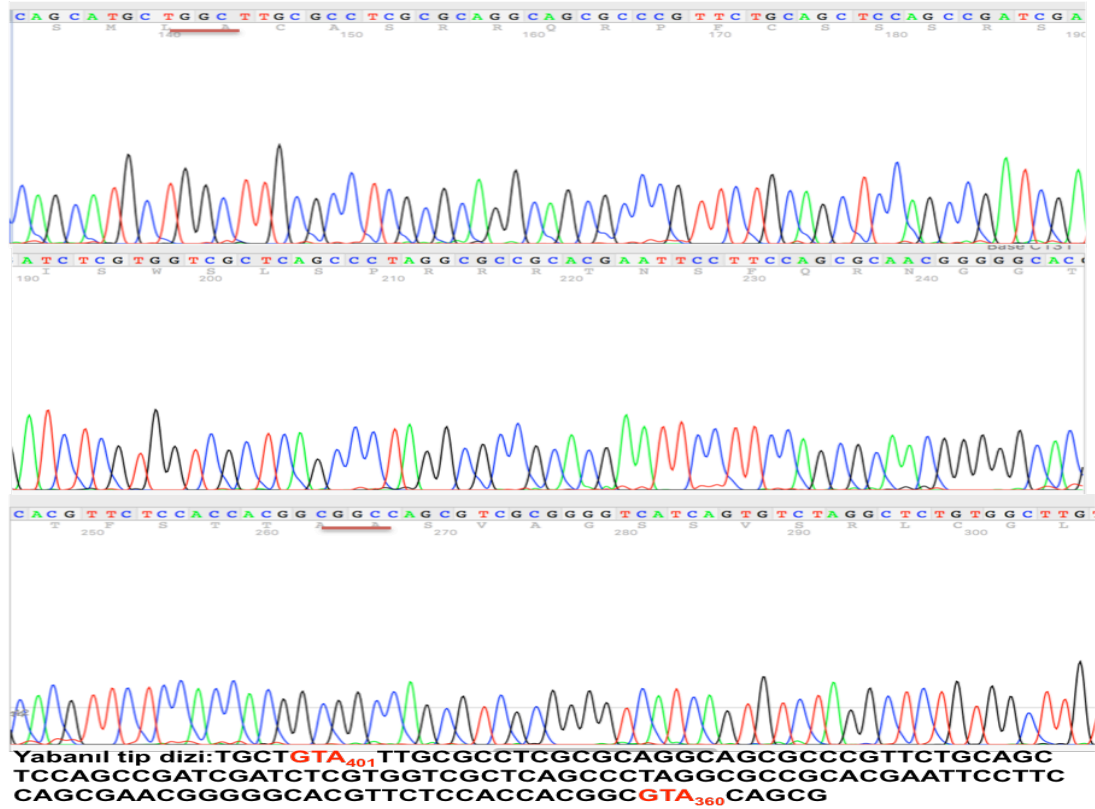


Y401D (reverse dizi) (GTA>GTC)

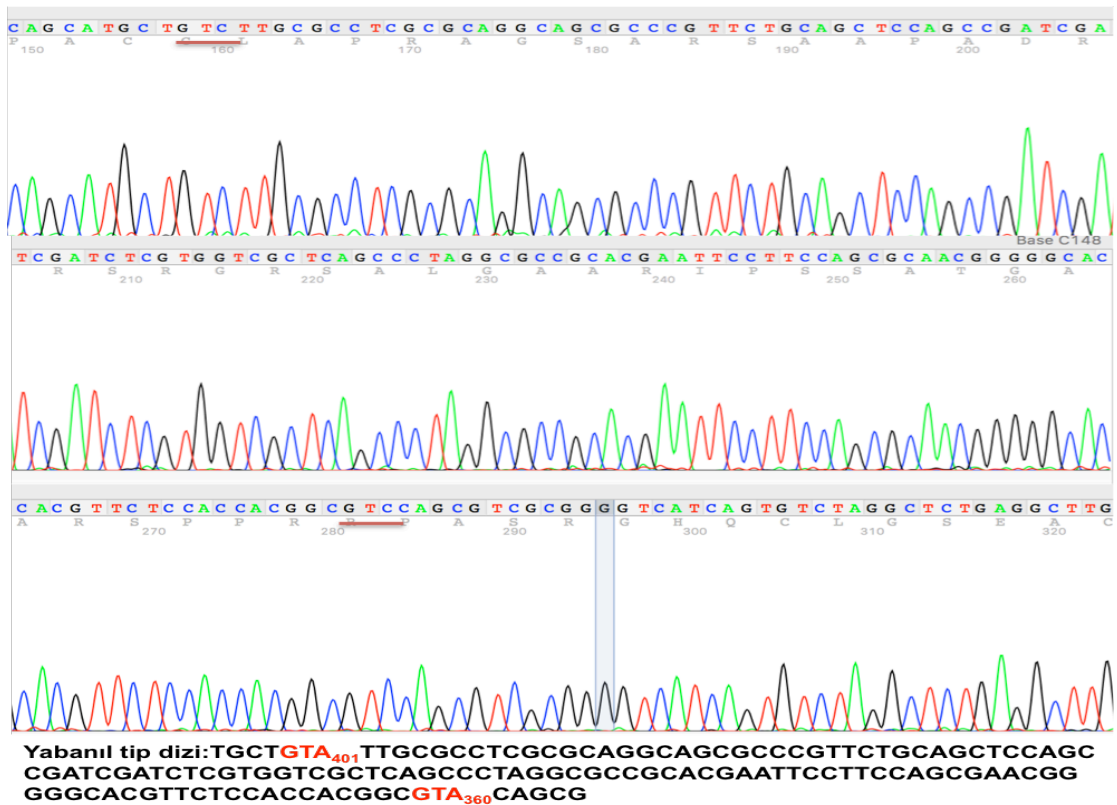


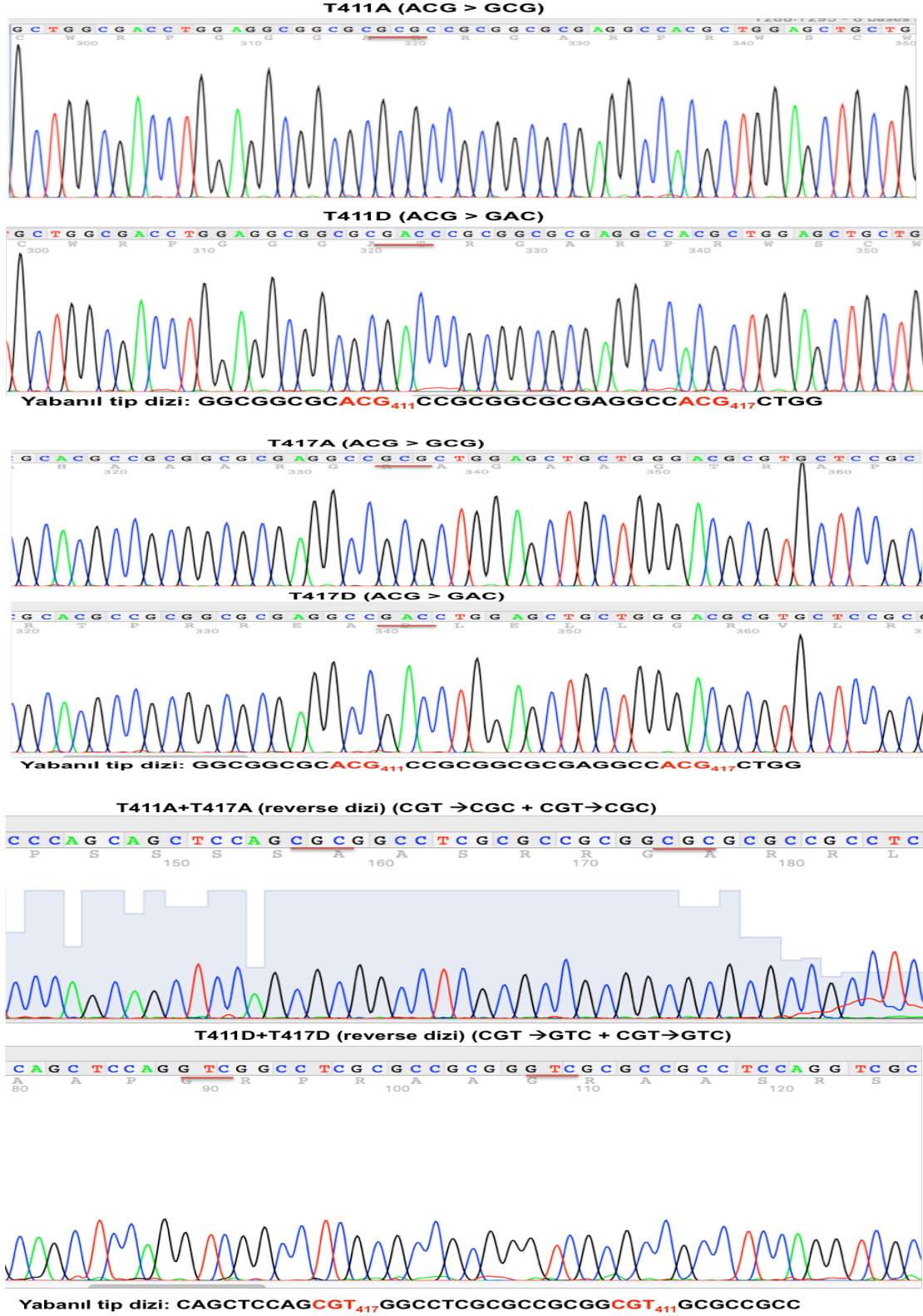
Yabanıl tip dizi: GCGCGAGGCGCA**AATAC**₄₀₁AGCATGCTGGCGACC

Y360A+Y401A (reverse dizi) (GTA →GGC + GTA→GGC)



Y360D+Y401D (reverse dizi) (GTA →GTC + GTA→GTC)

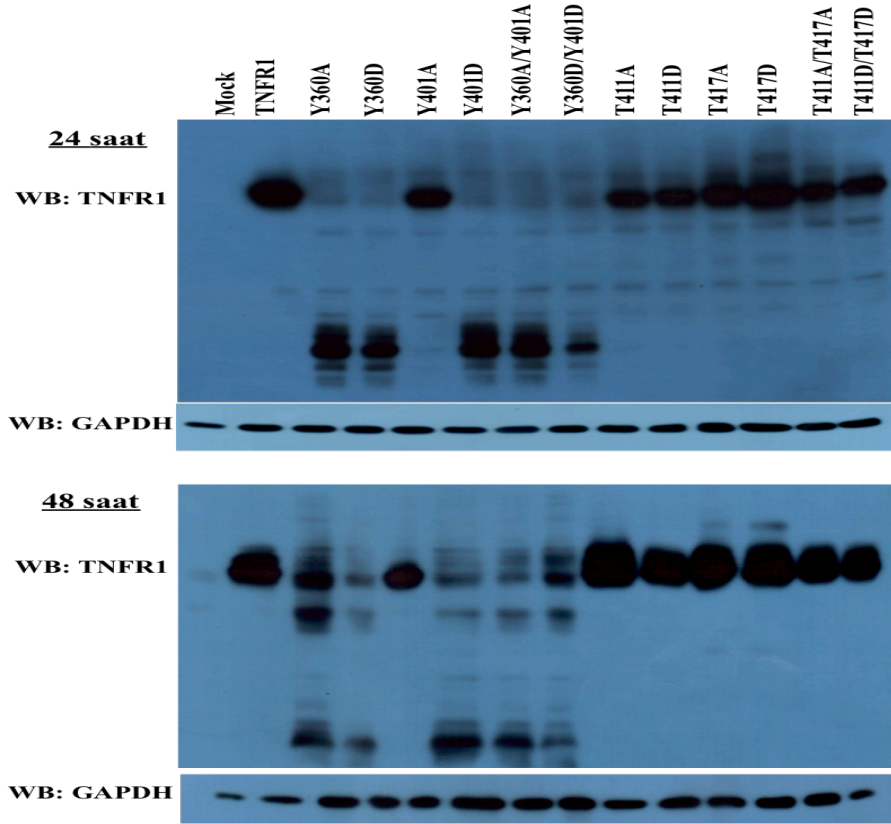




Şekil 4.9: Mutasyona uğratılmış TNFR1 ekspresyon vektörlerinde Y360, Y401, T411 ve T417 aminoasit kodonlarının Alanin ve Aspartik Asite dönüşümünü gösteren sekans sonuçları. Sekans görüntülerinin resimlerinin üzerinde, hangi mutanta ait oldukları yazılmıştır.

4.8. TNFR1 Mutantlarının Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

Hedeflendirilmiş mutasyonla elde edilmiş TNFR1 mutantlarının ve yabancı tip TNFR1'in transfeksiyonu sonucunda elde edilen TNFR1 ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için, boş pcDNA3.1a vektörü ve bu plazmidlerin transfekte edildiği hücrelerden transfeksiyon sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde hücre lizatlarını toplayıp western blot ile TNFR1 işaretlemesi gerçekleştirdik.

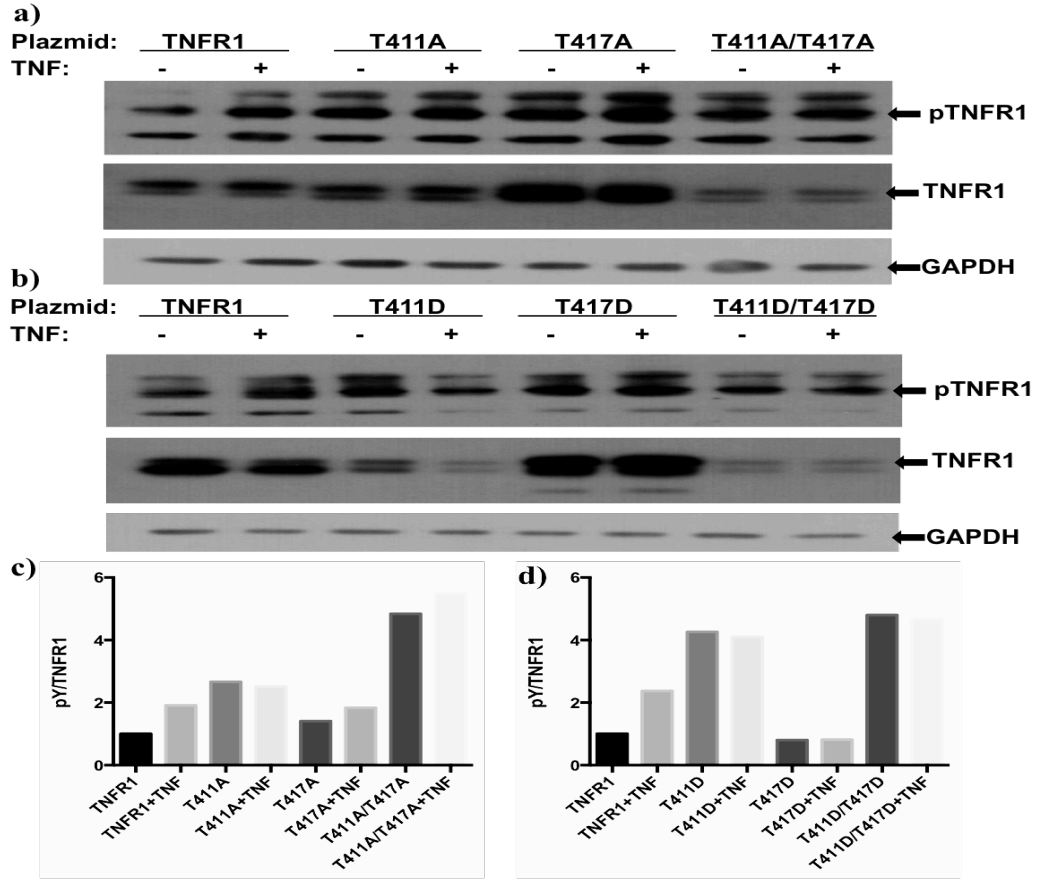


Şekil 4.10: Transfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra TNFR1 ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi. **Sol**

TNFR1 işaretleme sonucunda, yabancı tip TNFR1 vektörünün, 293T hücrelerinin 25 katı kadar TNFR1 ekspresyonu sağladığını belirledik. Y401A haricindeki tirozin mutantları, TNFR1 p55-60 ekspresyonunu yabancı tipe göre düşük göstermekte, yine de mock'a göre daha yüksek ekspresyon gözlenmekteydi. Ayrıca, bu mutantlarda 40-42kD, 32kD, 25kD ve 23kD boyutunda kırpılım bantları oluşmaktaydı.

4.9. Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının TNFR1 Tirozin Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1 aminoasit dizilimine bakarak PKA fosforilasyon motifine uyduğunu belirlediğimiz T411 ve T417 noktalarının fosforile edilemez A ve fosforilasyonu taklit edeceğini düşündüğümüz D mutantlarını 293T hücrelerine lipofektamin-2000 aracılığıyla transfekte edip, transfeksiyon sonrası 48. Saatten itibaren 16 saat serumsuz ortamda tuttuk. Sonrasında, hücreleri 1 saat Na₃VO₄ ile muamele edip, TNF- α muamelesi olmaksızın ya da 45 dakika TNF- α muamelesi yaparak hücresel lizatları topladık. Protein konsantrasyonunu belirledikten sonra, bu örneklerden 100 μ g protein olacak şekilde SDS-PAGE’de yürüttük ve PVDF membrana transfer ettik. Fosfo-tirozin antikorunu ile işaretleme yaptıktan sonra, strip off yapıp aynı membranlarda TNFR1 ve GAPDH işaretledik.



Şekil 4.11: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNFR1 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi. TNFR1 PKA bölge mutantlarının a)A ve b)D mutantları ile transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen lizatlar SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra pY20 antikorunu ile western blot yapıp, blotların

strip-off'undan sonra TNFR1 ve GAPDH antikorları ile işaretlendi. a'daki (c) ve b'deki (d) blotlar üstüste çakıştırılarak TNFR1'e tekabül eden pY20 bantlarının dansitometrik değerleri, TNFR1 bantlarının dansitometrik değerlerine oranlandı. Bazal koşullardaki TNFR1 örneklerindeki pY/TNFR1 oranı 1 kabul edilerek normalizasyon gerçekleştirildi. Değerler, GraphPad prism ile grafiklendirildi.

TNFR1 işaretlemesi ile fosfo-tirozin işaretlemesini üst-üste çakıştırdığımızda, okla gösterilen fosfo-tirozin bandının TNFR1 işaretlemesindeki üst banda tekabül ettiğini belirledik (**Şekil 4.10**). Hücreler eşit miktarda transfekte edildiği ve örnekler GAPDH bantlarından da anlaşıldığı gibi eşit hücrel protein konsantrasyonunda yüklendiği halde, TNFR1 protein ekspresyon seviyeleri örnekler arasında farklılık göstermekteydi. Tirozin fosforilasyon oranlarına baktığımızdaysa, 45 dakika TNF- α muamelesinin yabancı tip TNFR1 vektöründe kontrolün yaklaşık 2 katı kadar bir tirozin fosforilasyonuna yol açtığını, T417A mutantının tirozin fosforilasyon oranı kontrole benzer seyrederken T417D mutantında tirozin fosforilasyonunun hem bazal durumda azaldığını, hem de TNF- α muamelesi ile yükselmediğini belirledik. T411A, T411D, T411A/T417A ve T411D/T417D mutantlarında ise tirozin fosforilasyonunun hem bazal durumda hem de TNF- α muamelesi sonrasında yüksek seyrettiğini belirledik (**Şekil 4.10**).

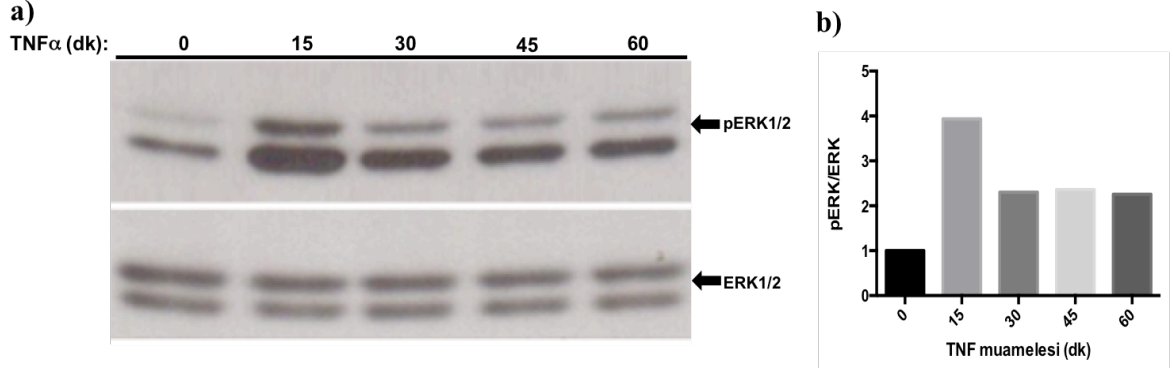
4.10. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı ERK Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

TNFR1'in fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı ERK sinyal iletimine etkisini belirleyebilmek için, önce TNF- α aracılı ERK aktivasyon kinetiğini belirlememiz gerektiğini düşündük. Bunun için, farklı süreler boyunca TNF- α ile muamele edilmiş hücrelerde ERK aktivasyon seviyesini inceledik. Ardından, mutant ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş hücrelerde ERK fosforilasyon seviyesinin yabancı tip TNFR1 vektörü ile transfekte edilmiş hücrelere nazaran nasıl değiştiğini inceledik.

4.10.1 TNF- α Aracılı ERK Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi

TNF- α aracılı ERK aktivasyon kinetiğini belirlemek için, 16 saat boyunca serum starve edilmiş 293T hücrelerine, 1 saat Na₃VO₄ muamelesinin ardından; 0, 15, 30, 45 ve 60 dakika TNF- α muamelesi yaptık. Bu hücrelerden lizat alıp, SDS-PAGE'de yürüttük ve PVDF membrana transfer sonrasında blotlarda önce fosfo-ERK (pERK), sonra da strip off yapıp ERK işaretlemesi gerçekleştirdik. pERK/ERK oranının hesaplanmasıyla, ERK

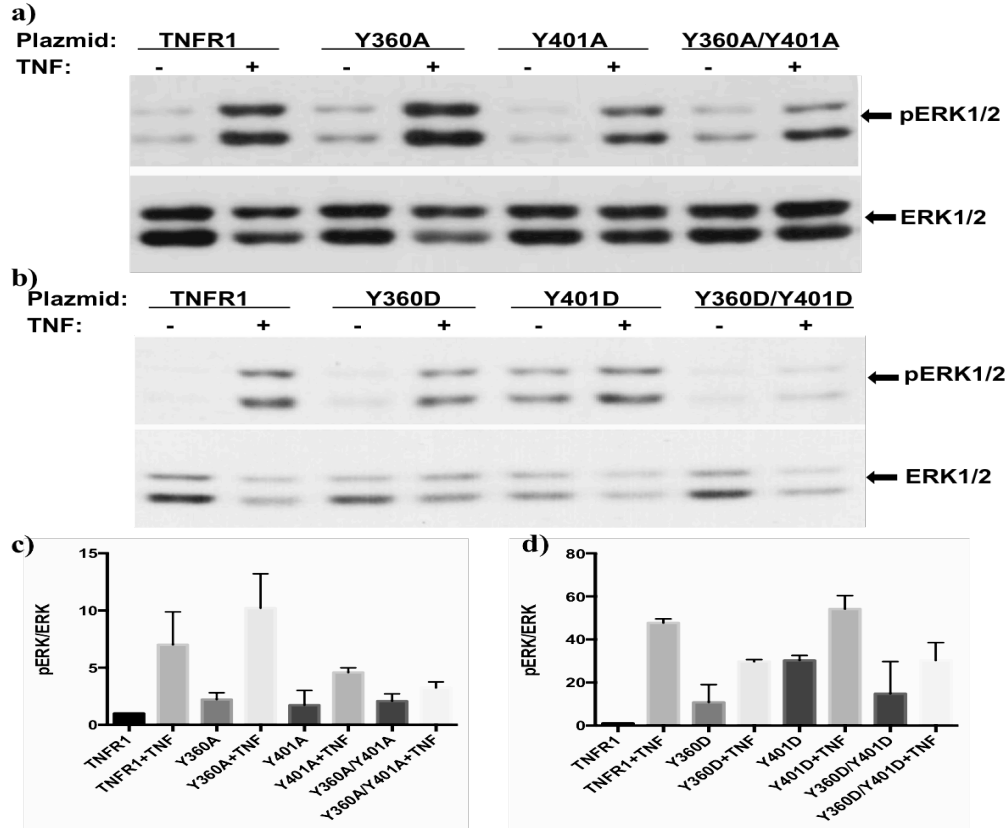
aktivasyon seviyesini belirledik. Elde ettiğimiz sonuca göre, 15 dakika TNF- α muamelesi ile ERK aktivasyonu kontrolün 4 katına çıkarken, 30 dakikadan itibaren kontrolün 2 katına düşmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.12: TNF- α aracılı ERK aktivasyon kinetiği (TNF Time Course). a) 100 μ g hücre lizatı ile yapılan western blot'da, önce pERK işaretlemesi, sonrasında aynı blot üzerinde strip off'u takip eden ERK işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) Blot'da elde edilen bantların dansitometrik analizi ImageJ ile yapıp, TNF'siz ortamdaki pERK/ERK oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir. Grafik, GraphPad Prism yazılımıyla çizilmiştir.

4.10.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının ERK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

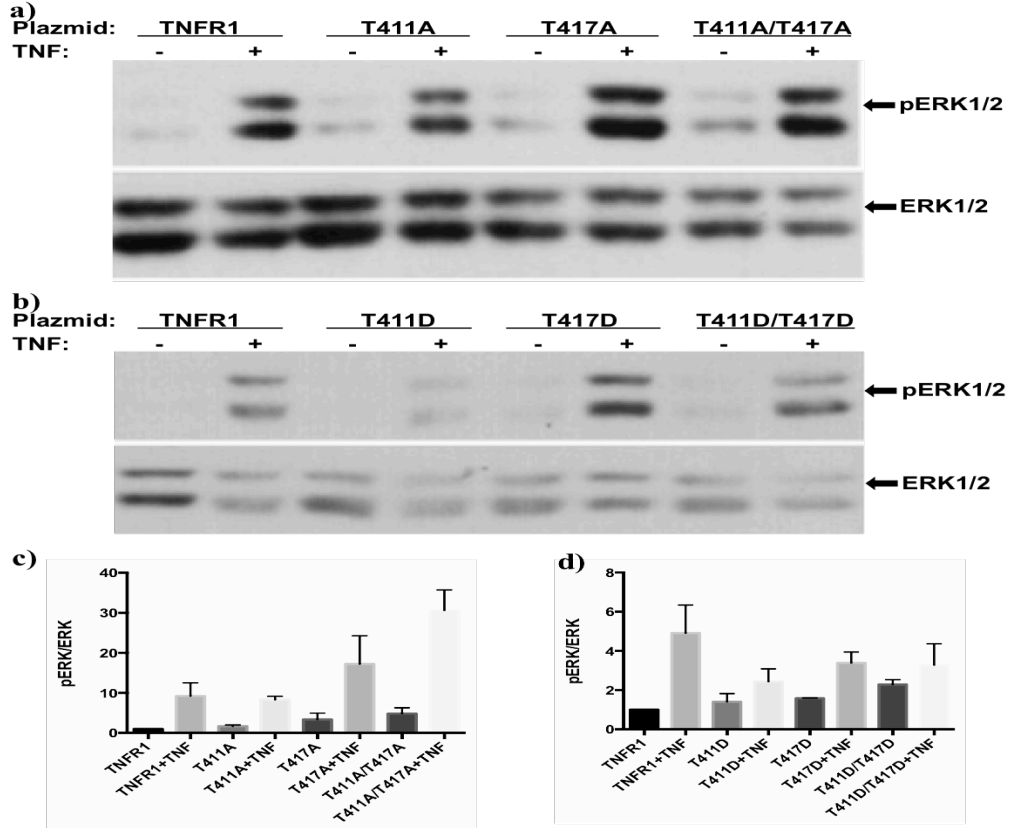
TNF- α aracılı ERK aktivasyonunun 15 dakika TNF- α muamelesi ile maksimum seviyesine ulaştığını belirlediğimiz için, mutant vektörlerle yaptığımız deneylerde 15 dakika 10ng/ml TNF- α muamelesi yapılmıştır. Yabancıl tip ve mutant TNFR1 vektörleri ile transfekte edilmiş hücreler, 16 saat serumsuz bekletmenin ardından 1 saat Na₃VO₄ ile muamele edilmiş, ardından TNF- α muamelesi yapılmaksızın ya da 15 dakika TNF- α muamelesi yapılarak hücrel lizatlar toplanmıştır. Lizatların protein konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, 100 μ g lizat SDS-PAGE'de yürütülerek pERK ve ERK işaretlemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Y360A mutantında ERK aktivasyonu artmışken, Y401A mutantında ERK aktivasyonu azalmıştır. Benzer şekilde, Y360D mutanti ile transfekte hücrelerde ERK aktivasyon seviyesinde bir düşüş gözlenmekte, Y401D mutanti ile transfekte hücrelerde ise TNF olmaksızın dahi ERK aktivasyonu görülmektedir. Dolayısıyla, Y360 noktasının fosforilasyonu ERK aktivasyonu üzerinde negatif, Y401 noktasının fosforilasyonu ise ERK aktivasyonu üzerinde pozitif etkiye sahiptir (Şekil 4.12).



Şekil 4.13: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı ERK aktivasyonuna etkisi. a) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ERK aktivasyonuna etkisi. b) Tirozin fosforilasyon noktalarının D mutantlarının ERK aktivasyonuna etkisi. a ve b’de, üst resim pERK1/2, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total ERK1/2 işaretlemesini göstermektedir. c) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış ERK işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği d) Tirozin fosforilasyon noktalarının D mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış ERK işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği c ve d’de, TNF muamelesi yapılmamış yabanıl tip TNFR1 transfekte örnekteki pERK/ERK oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir.

4.10.3 TNFR1’in PKA Bölge Mutantlarının ERK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

PKA bölge mutantları ile transfekte edilmiş hücrelerde, 4.7.2’de anlatıldığı şekilde hücresel lizatlar toplanıp, pERK ve ERK işaretlemeleri gerçekleştirildi.



Şekil 4.14: Muhtemel PKA fosforilasyon bölgelerinin TNF aracılı ERK aktivasyonuna etkisi. a) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ERK aktivasyonuna etkisi. b) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının D mutantlarının ERK aktivasyonuna etkisi. a ve b’de, üst resim pERK1/2, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total ERK1/2 işaretlemesini göstermektedir. c) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış ERK işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği d) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının D mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış ERK işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği. c ve d’de, TNF muamelesi yapılmamış yabancıl tip TNFR1 transfekte örnekteki pERK/ERK oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre (Şekil 4.13), muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantları ERK aktivasyonunu pozitif, D mutantları ise negatif yönde etkilemektedir. Dolayısıyla, TNFR1’in PKA tarafından fosforilasyonu, tirozin fosforilasyonunun aksine, TNF- α aracılı ERK aktivasyonu için baskılayıcı bir etkiye sahip gibi görünmektedir.

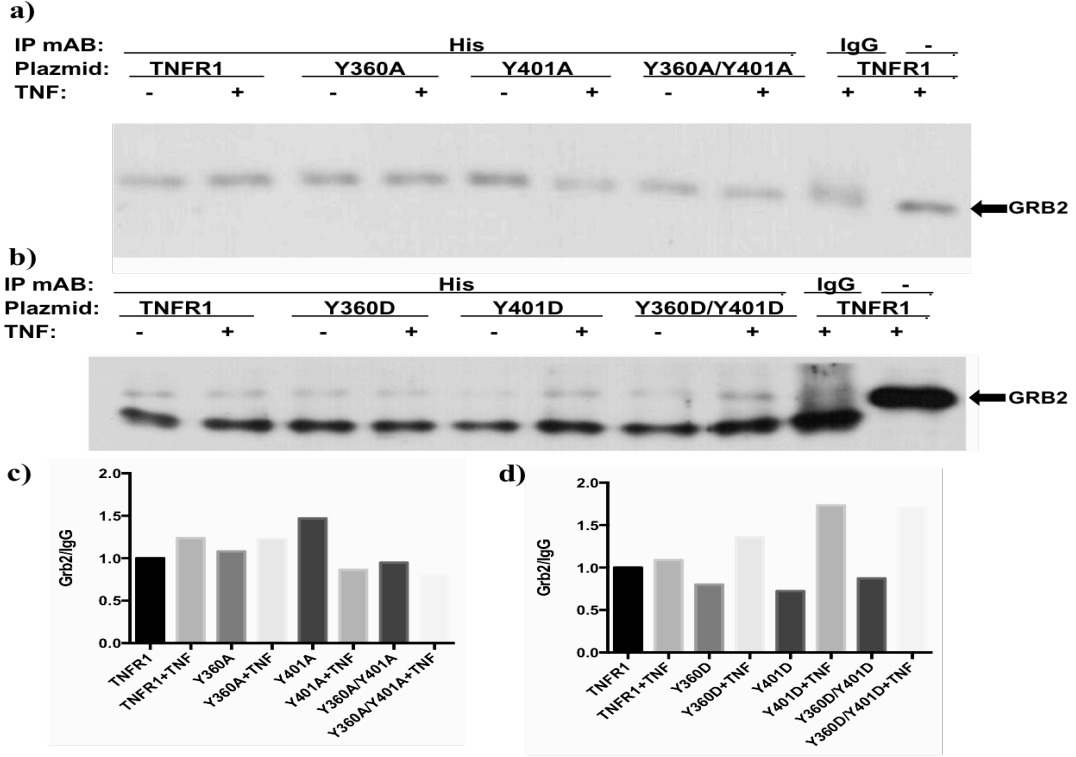
4.11. TNFR1 Mutantlarının TNFR1 ve Grb2 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1 ve adaptör protein Grb2 arasında fiziksel interaksiyon daha önce gösterilmiş olup, TNFR1 üzerindeki SH3 bağlanma bölgesi aracılığıyla olduğu belirlenmişti (Hildt and Oess, 1999). TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarında farklı seviyelerde ERK

aktivasyonu gördüğümüz için, bu mutantların Grb2 interaksyonunun farklı afinitelerde olabileceğini düşündük. Bu yüzden, yabancı tip ve mutant TNFR1 vektörleriyle transfekte ettiğimiz hücrelerden aldığımız lizatlarda, His-probe antikorunu kullanarak, ektopik eksprese ettiğimiz TNFR1 reseptörlerini çöktürdük. Grb2 antikorunu ile işaretleme yaptıktan sonra, gördüğümüz Grb2 bantlarını IgG bantlarına oranlayarak rölatif Grb2 bağlanma etkinliğini hesapladık.

4.11.1 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve Grb2 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

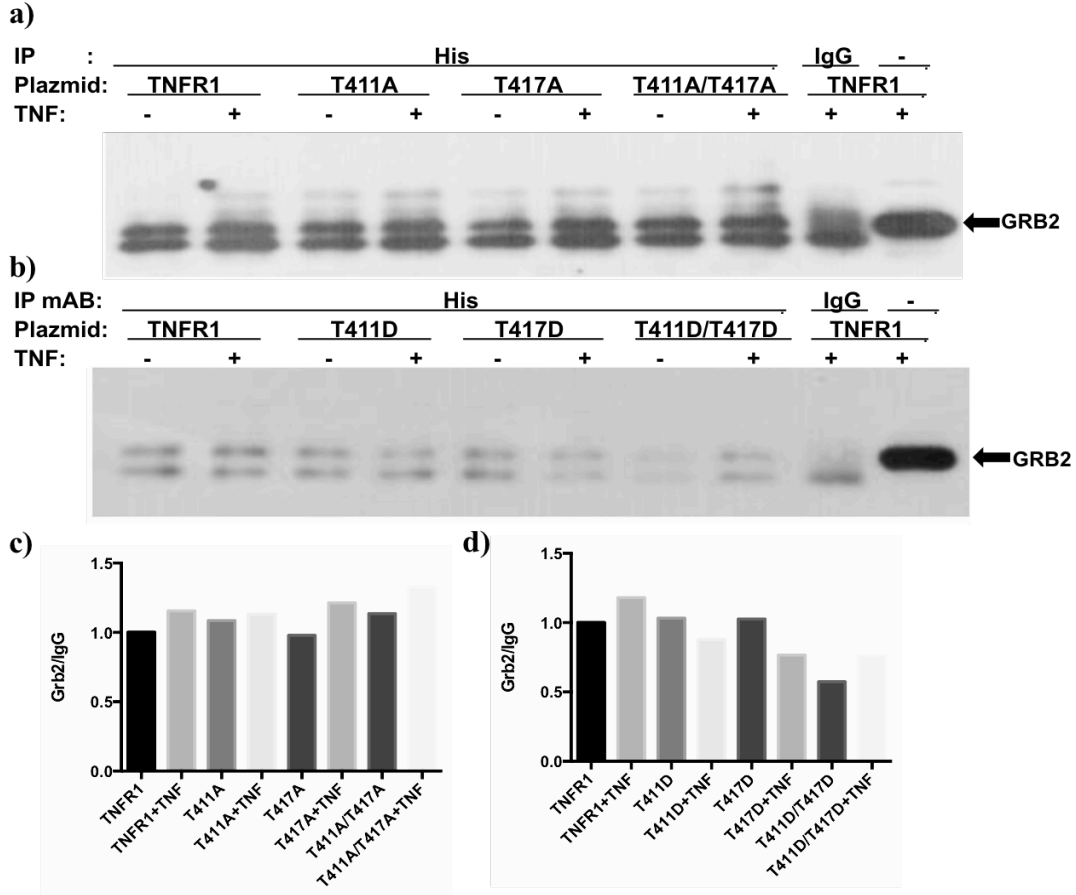
TNFR1-Grb2 arasındaki fiziksel interaksyonun, TNF- α muamelesi olmadığı durumda da söz konusu olduğunu, TNF- α muamelesi ile ise bir nebze kuvvetlendiğini belirledik. En kuvvetli TNFR1-Grb2 bağlantısını, TNF- α varlığında, Y401D mutanı ile gözlemledik. ERK aktivasyon profillerine baktığımızda, bu durum, beklendiği bir sonuçtu. Tirozin fosforilasyon noktalarının alanin mutantlarına baktığımızdaysa, Y401A'da yabancı tip vektörle transfekte edildikten sonra TNF- α ile muamele edilmiş örneklerde gördüğümüze benzer Grb2 bağlantısı gözlemledik. Öte yandan, hem Y360, hem de Y401 noktaları alanin ile modifiye edildiğindeyse, Grb2 bağlantısı azalmış, fakat tamamen yok olmamıştı. TNF- α muamelesi ise, bu mutantlarda Grb2 bağlantısını kuvvetlendirmek yönünde bir etki göstermedi (**Şekil 4.14**)



Şekil 4.15: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNFR1 ile Grb2 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi. TNFR1 tirozin fosforilasyon noktalarının a)A ile ve b) D ile değiştirilmesinin Grb2 bağlantısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. c) a'ya, d) b'ye ait grafik. IP: Immunopresipitasyonun gerçekleştirildiği antikor. Immunopresipitasyon, sadece transfekte edilen reseptörün indirilebilmesi için His-probe antikorunu ile, IgG örneğinde ise standart tavşan IgG'si ile yapılmıştır. Western blot, Grb2 monoklonal antikorunu ile gerçekleştirilmiş olup, en sağ kuyucuklar, 50µg hücresel lizati göstermektedir.

4.11.2 Muhtemel PKA Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve Grb2 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1 üzerindeki potansiyel PKA fosforilasyon noktalarının alanin ve aspartik asit mutantlarına baktığımızda, A mutantlarında, özellikle de hem T411'in hem de T417'nin A'ya dönüştürüldüğü mutantta nispi artmış bir Grb2 bağlantısı, D mutantlarında ise, özellikle TNF- α varlığında azalmış Grb2 bağlantısı gözlemledik. Hem T411, hem de T417'nin D'ye dönüştürüldüğü mutantta, TNF- α varlığında ve yokluğunda Grb2 bağlantısı yarı yarıya düşmüştü (Şekil 4.15).



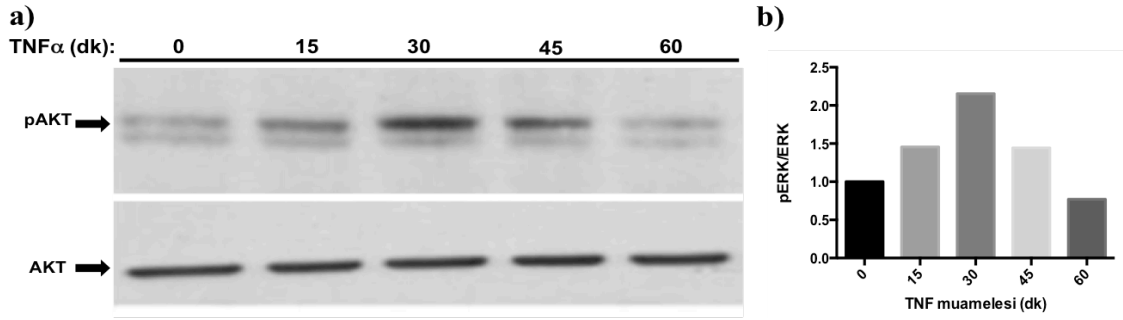
Şekil 4.16: TNFR1 üzerindeki muhtemel PKA fosforilasyon nokta mutantlarının TNFR1-Grb2 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi. Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının a)A ile ve b) D ile değiştirilmesinin Grb2 bağlantısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. c)a'ya, d)b'ye ait grafik. IP: Immunopresipitasyonun gerçekleştirildiği antikor. Immunopresipitasyon, sadece transfecte edilen reseptörün indirilebilmesi için His-probe antikorunu ile, IgG örneğinde ise standart tavşan IgG'si ile yapılmıştır. Western blot, Grb2 monoklonal antikorunu ile gerçekleştirilmiş olup, en sağ kuyucuklar, 50µg hücresel lizatı göstermektedir.

4.12. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı Akt Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

TNF- α aracılı ERK aktivasyonu için yaptığımız gibi, TNF- α aracılı Akt aktivasyonuna TNFR1 fosforilasyon mutantlarının etkisini belirlemek için de önce maksimum Akt aktivasyonuna yol açan TNF- α muamele süresini belirledik; ardından TNFR1 mutant vektörleri ile transfecte ettiğimiz hücrelerde bu belirlenen süre boyunca TNF- α muamelesi gerçekleştirip lizat topladık.

4.12.1 TNF- α Aracılı Akt Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi

TNF- α aracılı Akt aktivasyon kinetiğini belirlemek için, 16 saat boyunca serum starve edilmiş 293T hücrelerine, 1 saat Na₃VO₄ muamelesinin ardından; 0, 15, 30, 45 ve 60 dakika TNF- α muamelesi yaptık. Bu hücrelerden alınan lizatlardan 100 μ g'ı ile western blot yaptık. Blotlarda önce Thr308 ve Ser473 fosfo-Akt (pAkt) antikor karışımı ile, sonra da strip off yapıp total Akt antikorunu ile işaretleme gerçekleştirdik. pAkt/Akt oranının hesaplanmasıyla, Akt aktivasyon seviyesini belirledik. Elde ettiğimiz sonuca göre, 30 dakika TNF- α muamelesi ile Akt aktivasyonu kontrolün 2 katından daha yüksek bir değere çıkmakta, 60 dakikada ise Akt aktivasyonu kontrol seviyesine düşmektedir (Şekil 4.16). Bu nedenle, TNFR1 mutantları ile yaptığımız çalışmalarda, 30 dakika TNF- α muamelesi sonrasında Akt aktivasyonunun nasıl etkilendiğini araştırdık.

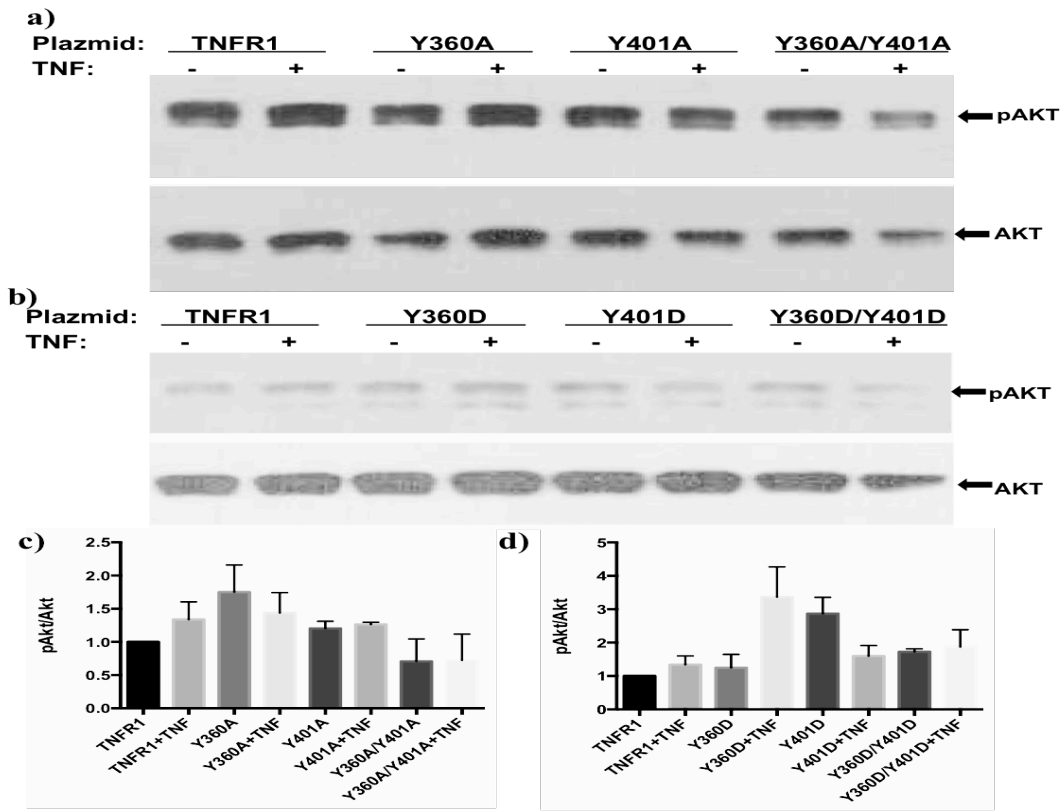


Şekil 4.17: TNF aracılı Akt aktivasyon kinetiği (TNF time course). a) 100 μ g hücre lizati ile yapılan western blot'da, önce pAkt işaretlemesi, sonrasında aynı blot üzerinde strip off'u takip eden Akt işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) Blot'da elde edilen bantların dansitometrik analizi ImageJ ile yapıp, TNF'siz ortamdaki pAkt/Akt oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir. Grafik, GraphPad Prism yazılımıyla çizilmiştir.

4.12.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının Akt Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Yabanıl tip ve tirozin fosforilasyon noktalarının alanin ya da aspartik asite dönüştürülmüş olduğu mutant TNFR1 vektörleri ile transfekte hücreler, 16 saat serumsuz bekletmenin ardından 1 saat Na₃VO₄ ile muamele edilmiş, ardından TNF muamelesi yapılmaksızın ya da 30 dakika TNF- α muamelesi yapılarak hücrel lizatlar toplanmıştır. Lizatların protein konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, 100 μ g lizat SDS-PAGE'de yürütülerek pAkt ve Akt işaretlemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, TNFR1 Y360A mutanti, TNF- α muamelesi olmaksızın TNF- α muamele edilmiş hücre seviyesinde Akt aktivasyonuna sebep olmuştur. Öte yandan,

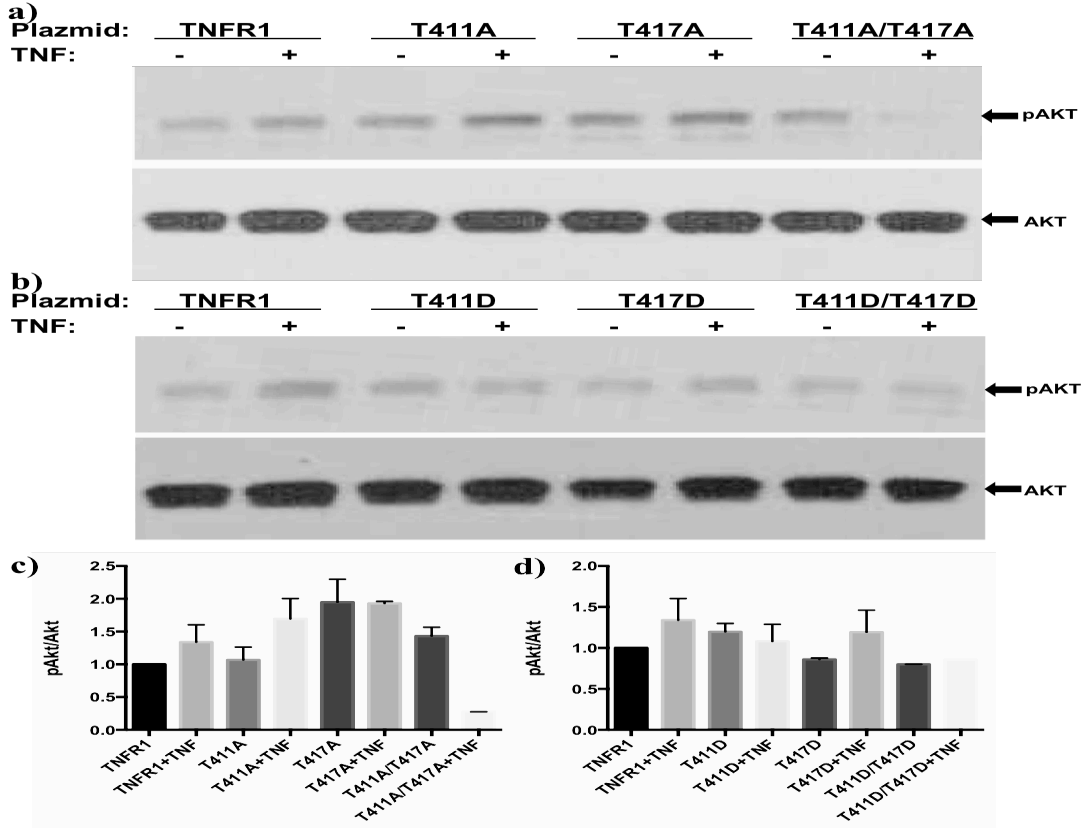
Y360D mutanı ise TNF- α muamelesi yapılmadığında yine yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerin TNF- α muamelesi ile edindiği kadar bir Akt aktivasyonu göstermiş, TNF- α muamelesi ise kontrolün 3.5 katı bir Akt aktivasyonuna yol açmıştır. Y401A mutantında TNF- α muamelesi Akt aktivasyonuna yol açmazken, Y401D mutantında TNF- α verilmeden kontrolün 3 katından daha yüksek Akt aktivasyonu gözlenmiştir. TNF- α muamelesi ise, Y401D ile transfekte hücrelerde Akt aktivasyonunda ekstra bir artışa yol açmamıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.18: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı Akt aktivasyonuna etkisi a) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantlarının Akt aktivasyonuna etkisi. b) Tirozin fosforilasyon noktalarının D mutantlarının Akt aktivasyonuna etkisi. a ve b'de, üst resim pAkt (T308, S473), alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total Akt işaretlemesini göstermektedir. c) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantları ve d) D mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış pAkt/Akt işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği. c ve d'de, yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pAkt/Akt oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.12.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının Akt Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

PKA bölge mutantları ile transfekte edilmiş hücrelerde, 4.8.2 kısmındaki şekilde lizatlar toplanıp, pAkt ve Akt işaretlemeleri gerçekleştirildi.



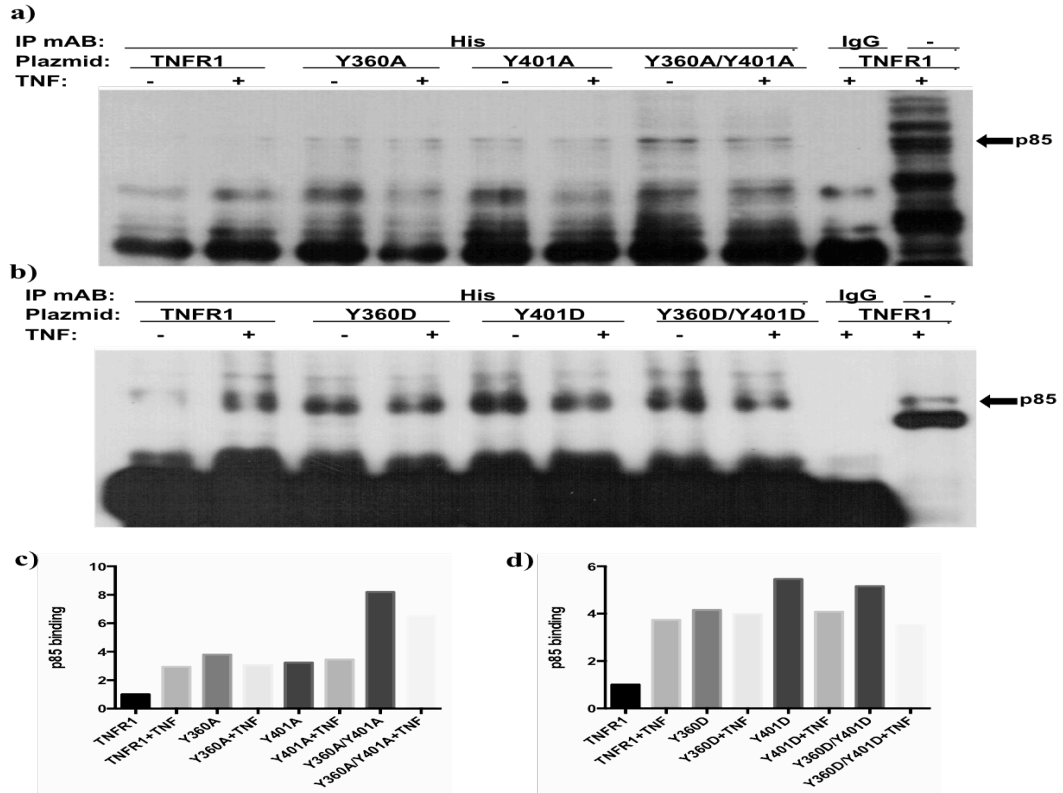
Şekil 4.19: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı Akt aktivasyonuna etkisi. a) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantlarının Akt aktivasyonuna etkisi. b) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının D mutantlarının Akt aktivasyonuna etkisi. a ve b panellerinde, üst resim pAkt, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total Akt işaretlemesini göstermektedir. c) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantları ve d) D mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış pAkt/Akt işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği. c ve d'de, yabancı tip TNFR1 ile transfecte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pAkt/Akt oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının alanin ile değiştirilmesi, yani PKA fosforilasyonunun engellenmesi, TNF- α aracılı Akt aktivasyonunda artışa yol açmaktadır. Özellikle T417A mutantında, TNF- α muamelesi olmaksızın dahi yabancı tip reseptörün TNF- α ile muamelesi sonucunda elde edilen Akt aktivasyonundan daha yüksek seviyede Akt aktivasyonu gözlenmektedir. Bu mutant ile transfecte hücrelerde, TNF- α muamelesi Akt aktivasyonunda ek bir artışa yol açmamıştır. T417D mutantlarında ise, TNF varlığında da, TNF- α yokluğunda da, yabancı tip reseptörle benzer seviyede Akt aktivasyonu gözlemlenmiştir. TNF- α muamelesi olmadığı durumda, T411A mutanti yabancı tip TNFR1 ile benzer miktarda Akt fosforilasyonuna yol açsa da, T411D mutantında artmış Akt fosforilasyonu söz konusudur (Şekil 4.18).

4.13. TNFR1 Mutantlarının TNFR1 ve p85 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

4.13.1 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve p85 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

Yabanıl tip ve mutant TNFR1 reseptörleri ile p85 arasındaki fiziksel etkileşime baktığımızda, özellikle Y401D mutantında TNF- α muamelesi yapılmayan koşullarda artmış bağlanma kapasitesi gördük. TNF- α muamelesi ile p85 bağlanma kapasitesi yabanıl tip reseptörün TNF- α varlığında p85'e bağlanma kapasitesi seviyesine inmekteydi. En kuvvetli p85 bağlantısını ise, hem Y360'ın, hem de Y401'in alanine çevrildiği ikili A mutantında gözlemledik. TNF- α muamelesi ile bu reseptörün de p85 bağlama etkinliği düşmekte, fakat hala yabanıl tip reseptörün TNF- α muamelesi ile edindiği p85 bağlanma kapasitesinin iki katından daha yüksek bir affinite ile p85'e bağlanmaktadır (Şekil 4.19).

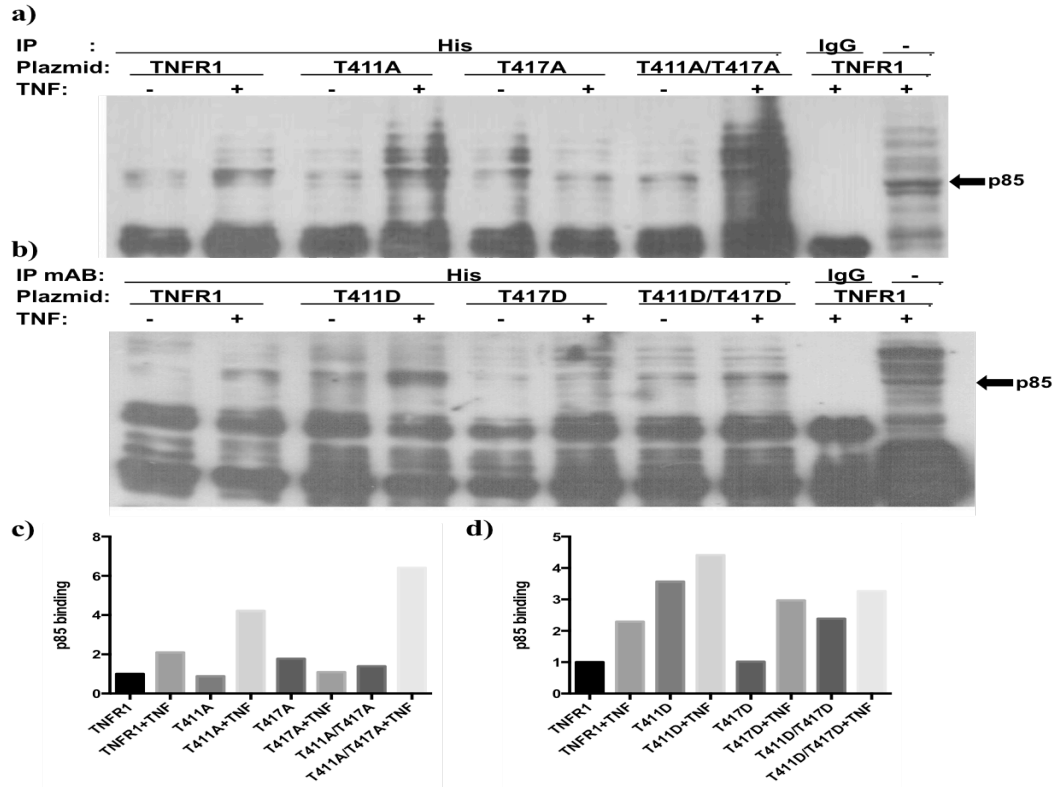


Şekil 4.20: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNFR1 ile p85 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi. TNFR1 tirozin fosforilasyon noktalarının a)A ile ve b) D ile değiştirilmesinin p85 bağlantısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. c)a'ya, d)b'ye ait grafik. Grafikler, p85 bant intensitesinin IgG

bant intensitesine bölünmesi ile elde edilmiştir. IP: Immunopresipitasyonun gerçekleştirildiği antikor. Immunopresipitasyon, sadece transfecte edilen reseptörün indirilebilmesi için His-probe antikorunu ile, IgG örneğinde ise standart tavşan IgG'si ile yapılmıştır. Western blot, p85 monoklonal antikorunu ile gerçekleştirilmiş olup, en sağ kuyucuklar, 50µg hücresel lizatu göstermektedir.

4.13.2 Muhtemel PKA Fosforilasyon Mutantlarının TNFR1 ve p85 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1 üzerindeki muhtemel PKA fosforilasyon motiflerinin alanin ve aspartik asit mutantlarına baktığımızda, özellikle T411D mutantında, TNF muamelesi ile daha da yükselen artmış p85 bağlanma kapasitesi gözlemledik. T417D ve T417A mutantlarında, yabancı tip reseptöre benzer bir p85 bağlanma profili gözlemledik. İkili mutantlarda ise, T411A/T417A TNF- α 'sız durumda p85'e yabancı tip reseptörle benzer affiniteyle bağlanıyor, fakat TNF- α verildiğinde p85 bağlanma etkinliği çok yükseliyordu. T411D/T417D ise, TNF- α 'sız durumda dahi sanki TNF- α muamelesi yapılmış gibi p85'e bağlanıyor, TNF- α muamelesiyle bağlanma etkinliği biraz daha kuvvetleniyordu (Şekil 4.20).



Şekil 4.21: TNFR1 üzerindeki muhtemel PKA fosforilasyon nokta mutantlarının TNFR1-p85 arasındaki fiziksel etkileşime etkilerinin belirlenmesi. Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının a)A ile ve b) D ile değiştirilmesinin p85 bağlantısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. c)a'ya, d)b'ye ait grafik. Grafikler, p85

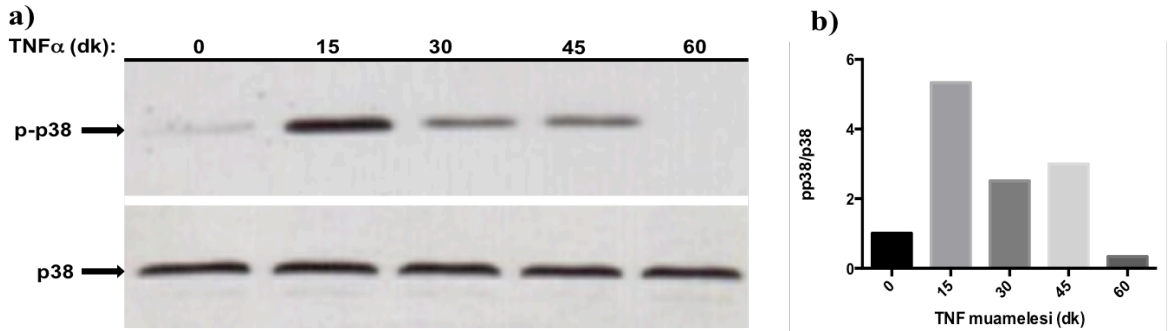
bant intensitesinin IgG bant intensitesine bölünmesi ile elde edilmiştir. IP: Immunopresipitasyonun gerçekleştirildiği antikor. Immunopresipitasyon, sadece transfecte edilen reseptörün indirilebilmesi için His-probe antikoruna ile, IgG örneğinde ise standart tavşan IgG'si ile yapılmıştır. Western blot, p85 monoklonal antikoruna ile gerçekleştirilmiş olup, en sağ kuyucuklar, 50µg hücresel lizatı göstermektedir.

4.14. TNFR1 Mutantlarının TNF-α Aracılı p38 Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

TNF-α aracılı p38 sinyal iletimine TNFR1 fosforilasyon mutantlarının etkisini belirlemek için de, ERK ve Akt deneylerinde olduğu gibi, maksimum p38 aktivasyonunun kaç dakika TNF-α muamelesi sonucu gerçekleştiğini belirledik. Ardından, mutant ekspresyon vektörleri ile transfecte edilmiş hücrelerde, fosfo-p38/p38 oranının yabancı tip TNFR1 vektörü ile transfecte edilmiş hücrelere nazaran nasıl değiştiğini inceleyerek p38 aktivasyonunun nasıl etkilendiğini belirledik.

4.14.1 TNF-α Aracılı p38 Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi

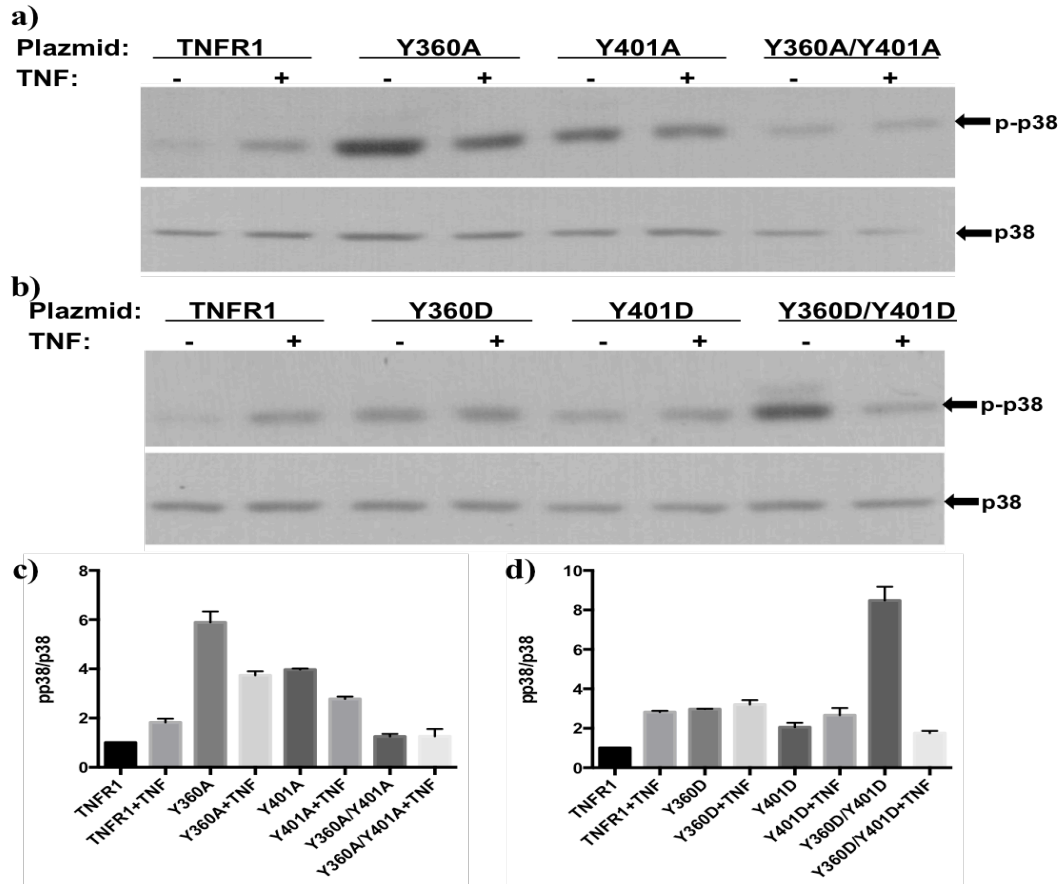
16 saat boyunca serum starve edilmiş 293T hücrelerine, 1 saat Na₃VO₄ muamelesinin ardından; 0, 15, 30, 45 ve 60 dakika TNF-α muamelesi yaptık. Bu hücrelerden lizat alıp, SDS-PAGE'de yürüttük ve PVDF membrana transfer sonrasında blotlarda önce fosfo-p38 (p-p38), sonra da strip off yapıp p38 işaretlemesi gerçekleştirdik. P-p38/p38 oranının hesaplanmasıyla, p38 aktivasyon seviyesini belirledik. Elde ettiğimiz sonuca göre, 15 dakika TNF-α muamelesi ile p38 aktivasyonu kontrolün 5 katından daha yüksek bir değere çıkarken, 30 dakikadan itibaren düşüş başlamakta ve 60.dakikada p38 aktivasyonu sıfırlanmaktadır. Dolayısıyla, TNF-α, p38'i çok hızlı ve geçici bir şekilde aktive etmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.22: TNF aracılı p38 aktivasyon kinetiği. a) 100µg hücre lizatı ile yapılan western blot'da, önce pp38 işaretlemesi, sonrasında aynı blot üzerinde strip off'u takip eden p38 işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) Blot'da elde edilen bantların dansitometrik analizi ImageJ ile yapıp, TNF'siz ortamdaki pp38/p38 oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir. Grafik, GraphPad Prism yazılımıyla çizilmiştir.

4.14.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının p38 Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

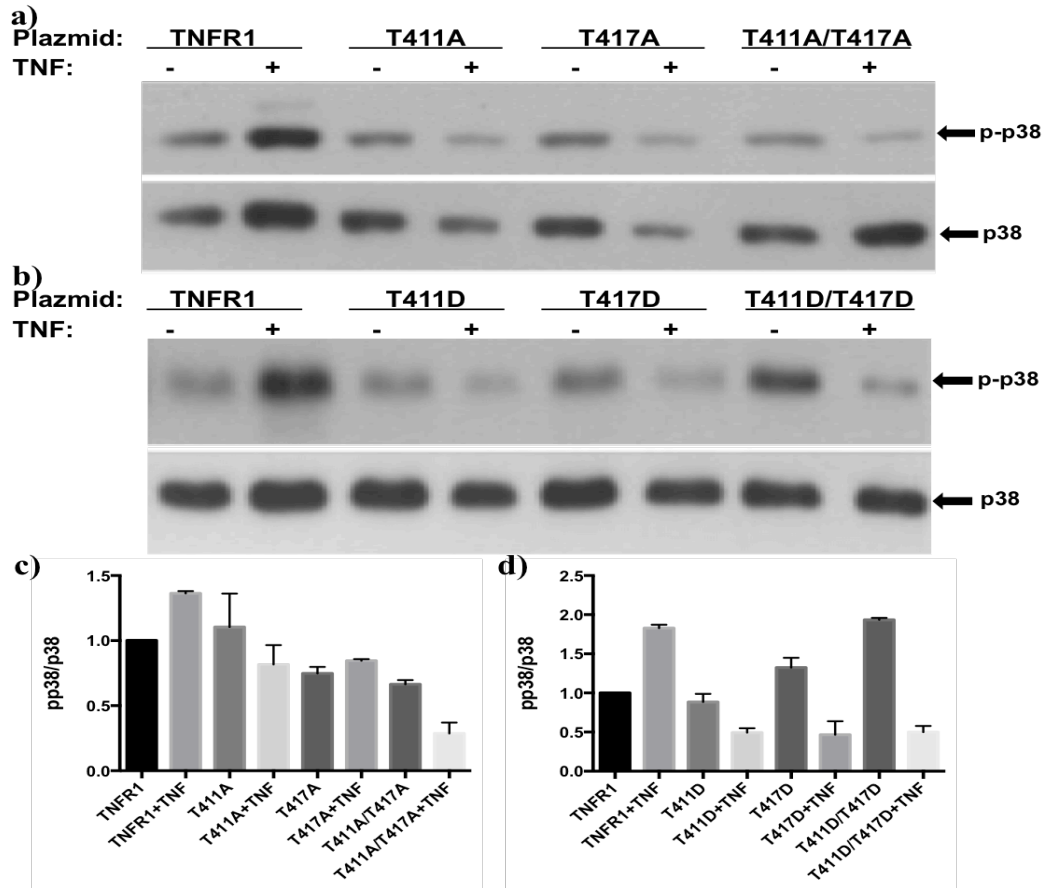
Tirozin fosforilasyon mutantlarının TNF- α aracılı ya da TNF- α olmaksızın p38 aktivasyonunu nasıl etkilediğini incelediğimizde, Y360A ve Y401A mutantlarının hem TNF'siz hem de TNF'li ortamda p38 aktivasyonunu bariz bir şekilde arttırdığını gözlemledik. İlginç bir şekilde, Y360A mutanlığı ile transfekte edilen hücrelerde TNF'siz ortamda çok yüksek seyreden p38 aktivasyon seviyesi, TNF- α verildiğinde bir nebze düşmektedir. Yine de bu düştüğü seviye dahi, yabancı tip TNFR1 vektörü ile transfekte edilmiş hücrelerin TNF- α muamelesi sonrası kazandığı p38 aktivasyon seviyesinin 2 katıdır (Şekil 4.22).



Şekil 4.23: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı p38 aktivasyonuna olan etkisi. a) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantlarının p38 aktivasyonuna etkisi. b) Tirozin fosforilasyon noktalarının D mutantlarının p38 aktivasyonuna etkisi. a ve b'de, üst resim pp38, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total p38 işaretlemesini göstermektedir. c) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış p-p38/p38 işaretlemelerinin densitometrik analiz grafiği. d) Tirozin fosforilasyon noktalarının D mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış pp38/p38 işaretlemelerinin densitometrik analiz grafiği. c ve d'de, yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pp38/p38 oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.14.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının p38 Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1'in PKA bölge mutantlarının TNF- α aracılı p38 aktivasyonuna etkisine baktığımızda, muhtemel PKA fosforilasyon bölgelerinin A mutantlarının TNF- α aracılı p38 aktivasyonunu engellediğini, TNF'siz ortamdaki p38 aktivasyon seviyelerinde ise belirgin bir farklılık olmadığını gözlemledik. D mutantlarında ise, ilginç bir şekilde, TNF'siz ortamda normal seyreden p38 aktivasyon seviyesi, TNF- α muamelesinin ardından çok düşük seviyelere gerilemektedir (Şekil 4.23).



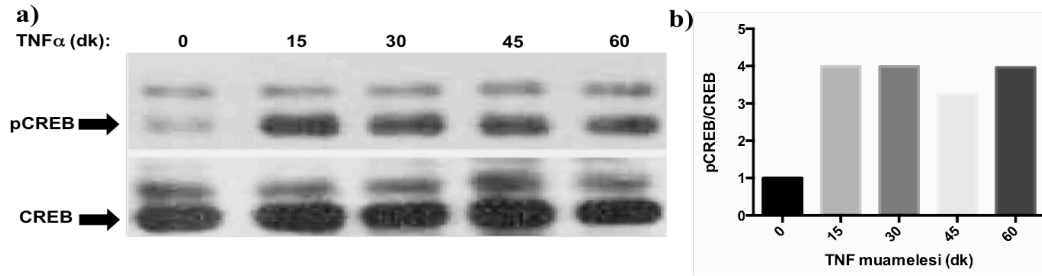
Şekil 4.24: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı p38 aktivasyonuna etkisi. a) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ve b) D mutantlarının TNF aracılı p38 aktivasyonuna etkisi. Üst blot, pp38; alt blot p38. c) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantları ve d) D mutantları ile farklı zamanlarda tekrarlanmış pp38/p38 işaretlemelerinin dansitometrik analiz grafiği. yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pp38/p38 oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.15. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı CREB Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

TNF- α 'nın, CREB fosforilasyonuna yol açtığı bilinmekte ve bu fosforilasyonun p38 aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (Gustin ve ark., 2004; Ono ve ark., 2006). Biz de p38 aktivasyon profillemesinin ardından, TNFR1 mutantlarının CREB aktivasyonunu nasıl etkilediğini de inceledik.

4.15.1 TNF- α Aracılı CREB Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi

Farklı süreler boyunca TNF- α ile muamele edilmiş 293T hücrelerinden alınan lizatlarla yaptığımız western blot ile, TNF- α aracılı CREB fosforilasyonunun 15 dakika TNF- α muamelesinden sonra kontrolün 4 katına çıktığını, 1 saat boyunca da stabil kaldığını belirledik (Şekil 4.24). Bu nedenle, TNFR1 mutantlarının CREB fosforilasyonu üzerindeki etkisini incelediğimiz deneylerde, 15 dakika TNF- α muamelesi gerçekleştirdik.

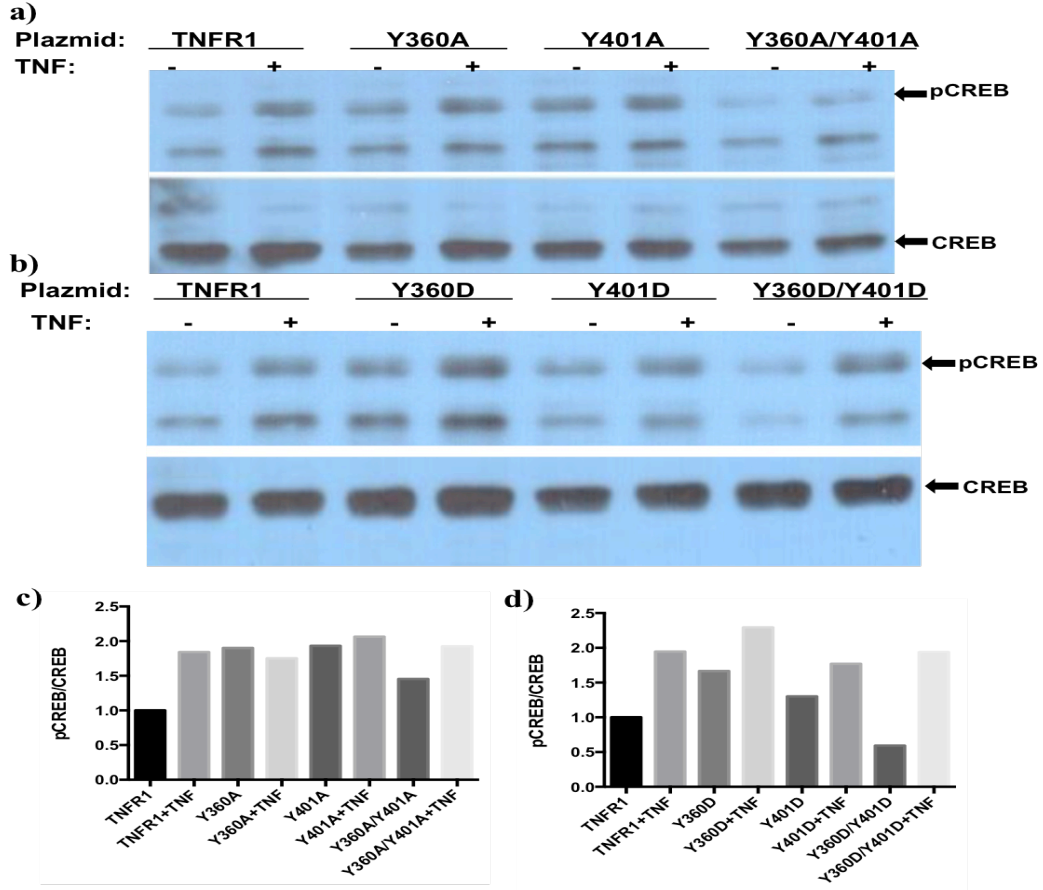


Şekil 4.25: TNF aracılı CREB aktivasyon kinetiği (TNF time course). a) 100 μ g hücre lizatı ile yapılan western blot'da, önce pCREB işaretlemesi, sonrasında aynı blot üzerinde strip off'u takip eden CREB işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) Blot'da elde edilen bantların dansitometrik analizi ImageJ ile yapıp, TNF'siz ortamdaki pCREB/CREB oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir. Grafik, GraphPad Prism yazılımıyla çizilmiştir.

4.15.2 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının CREB Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Yabancı tip TNFR1 eksprese eden hücrelerde, 15 dakika TNF- α muamelesi, CREB fosforilasyonunu kontrolün iki katına çıkartmaktadır. Y360A ve Y401A mutantlarında, CREB fosforilasyonu, TNF- α muamelesi olmaksızın TNF- α muamelesi yapılan hücrelerdeki kadar gözlenmekte, TNF- α muamelesi ise CREB fosforilasyonunda ekstra bir artışa yol açmamaktadır. Her iki tirozinin birden alanine çevrildiği mutantta ise, yabancı tip TNFR1'deki gibi bir CREB fosforilasyon paterni izlenmektedir.

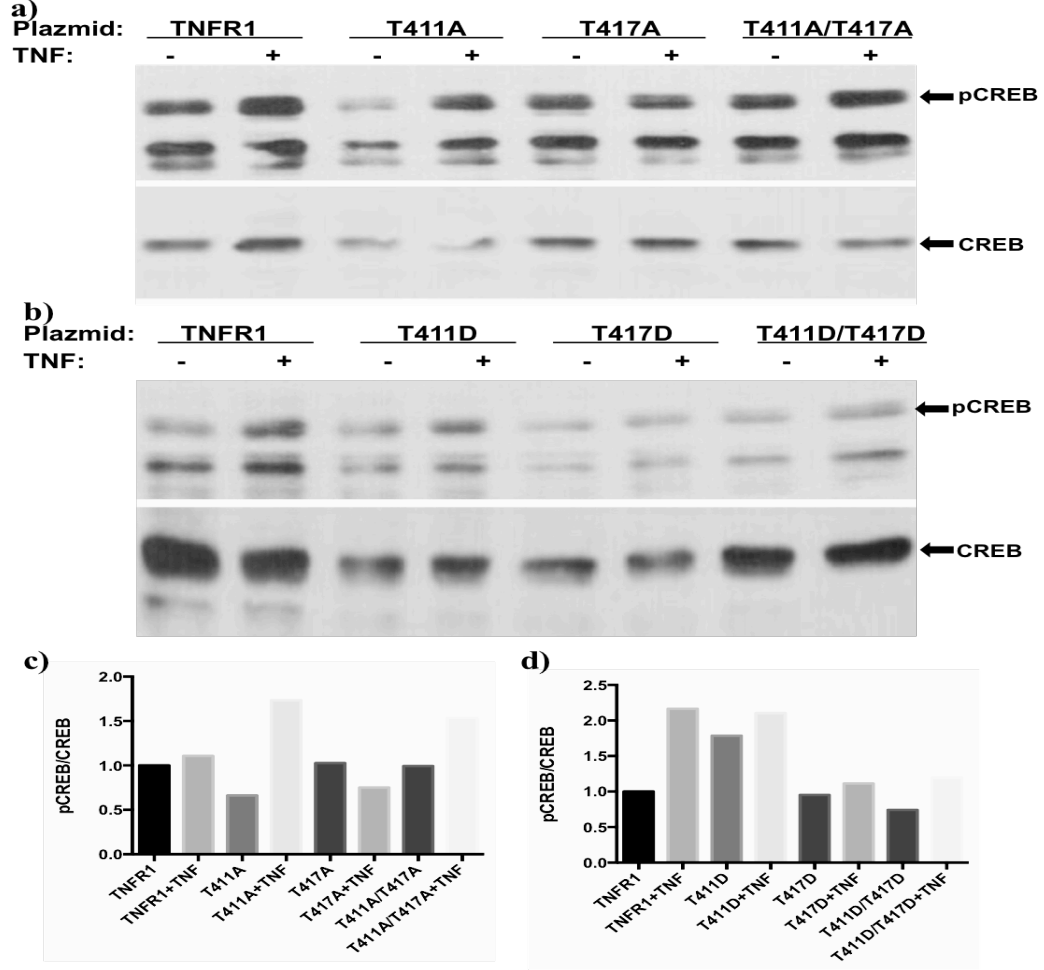
Tirozinlerin fosforilasyonunu taklit ettiğini düşündüğümüz D mutantlarına baktığımızdaysa, Y401D mutantının yabancı tip reseptöre benzer bir CREB fosforilasyon profili sergilediğini; Y360D mutantının ise hem TNF'siz, hem de TNF'li ortamda artmış CREB fosforilasyonuna yol açtığını gözlemledik. Y360D/Y401D mutantındaysa, TNF'siz ortamda kontrolün yarısına düşmüş olan CREB fosforilasyonu, TNF- α muamelesinin ardından yabancı tip reseptörü eksprese edip TNF- α ile muamele edilmiş hücrelerin seviyesine çıkmıştır (Şekil 4.25)



Şekil 4.26: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının CREB fosforilasyonuna etkisi. a) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ve b) D mutantlarının CREB aktivasyon fosforilasyonuna etkisi. a ve b'de, üst resim pCREB, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total CREB işaretlemesini göstermektedir. c) a'daki d) b'deki blotların dansimetrik analiz grafiği. c ve d'de, yabancı tip TNFR1 ile transfecte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pCREB/CREB oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.15.3 TNFR1 Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının CREB Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A ve D mutantlarına baktığımızda, hem A mutantlarında, hem de D mutantlarında azalmış CREB fosforilasyonu gözlemledik (Şekil 4.26).

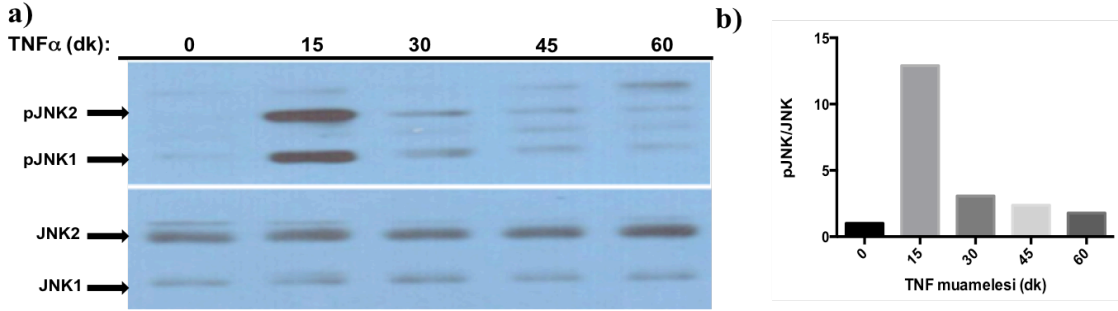


Şekil 4.27: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının CREB fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi. a) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ve b) D mutantlarının TNF aracılı CREB aktivasyonuna etkisi. Üst blot, pCREB; alt blot CREB. c) a'da, d) b'de gösterilen verilerin dantsitometrik analizi. Yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pCREB/CREB oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.16. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı JNK Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

4.15.1 TNF- α Aracılı JNK Aktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi

16 saat boyunca serum starve edilmiş 293T hücrelerine, 1 saat Na₃VO₄ muamelesinin ardından; 0, 15, 30, 45 ve 60 dakika TNF- α muamelesi yaptık. Bu hücrelerden lizat alıp, SDS-PAGE’de yürüttük ve PVDF membrana transfer sonrasında blotlarda önce fosfo-JNK (pJNK), sonra da strip off yapıp JNK işaretlemesi gerçekleştirdik. pJNK/JNK oranının hesaplanmasıyla, JNK aktivasyon seviyesini belirledik. TNF- α aracılı JNK aktivasyonu da, TNF- α aracılı p38 aktivasyonu gibi, hızlı ve geçici bir şekilde gerçekleşmektedir. 15 dakika TNF- α muamelesi ile JNK aktivasyonu kontrolün 12 katından daha yüksek bir değere çıkarken, 30 dakikadan itibaren kontrolün 2 katına düşmektedir (Şekil 4.27).

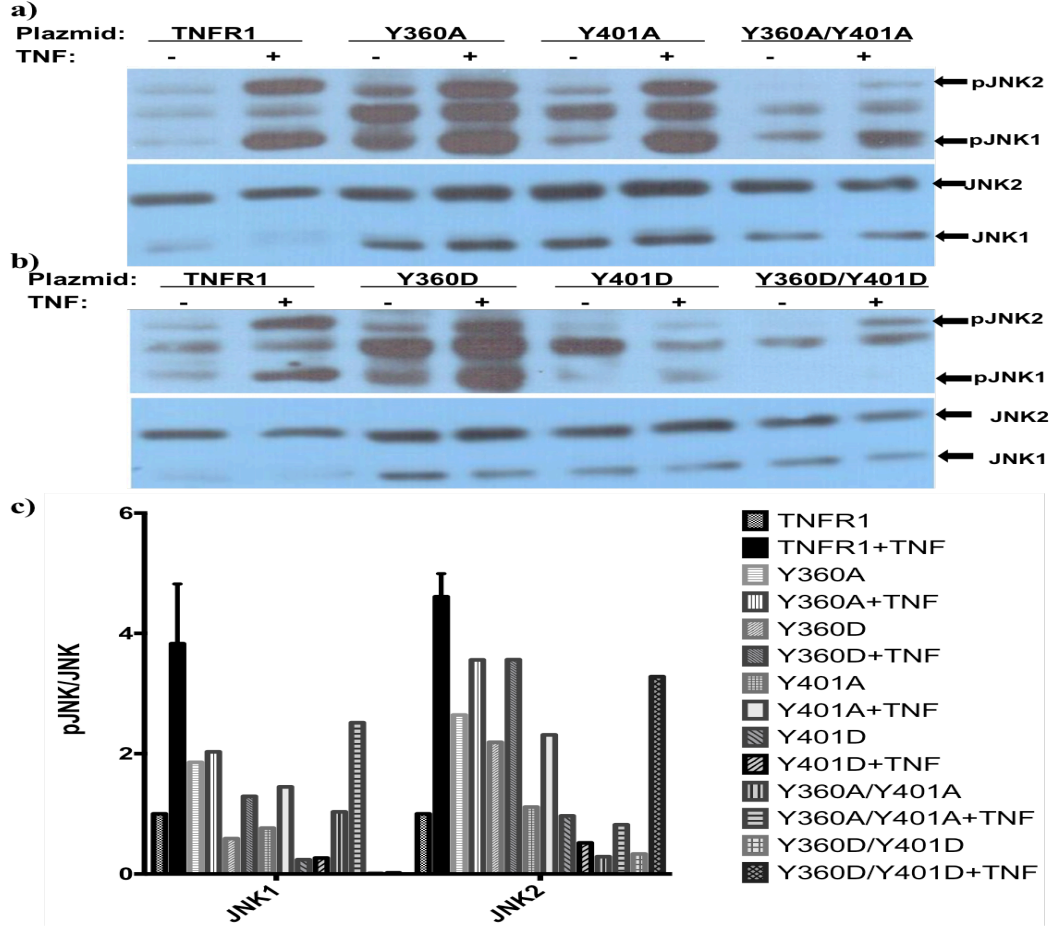


Şekil 4.28: TNF aracılı JNK aktivasyon kinetiği. a) 100 μ g hücre lizatı ile yapılan western blot’da, önce pJNK işaretlemesi, sonrasında aynı blot üzerinde strip off’u takip eden JNK işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) Blot’da elde edilen bantların dansitometrik analizi ImageJ ile yapıp, TNF’siz ortamdaki pJNK/JNK oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir. Grafik, GraphPad Prism yazılımıyla çizilmiştir.

4.16.2 TNFR1’in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının JNK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

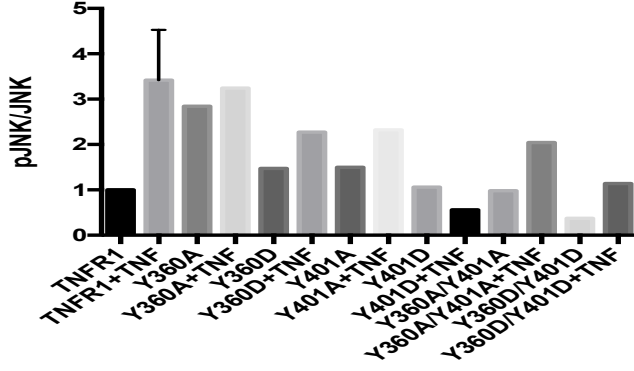
TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının JNK aktivasyonu üzerindeki etkisini incelemek için yabancı tip ve mutant TNFR1 ile hücreleri transfecte edip TNF- α muamelesi olmaksızın ya da 15 dakika TNF muamelesi ile lizatları topladık. İlginç bir şekilde, TNFR1 transfeksiyonu, özellikle de mutant TNFR1 vektörlerinin transfeksiyonu, pJNK1 ve pJNK2 arasında kalan üçüncü bir fosforile JNK izoformunun belirgin hale gelmesine neden oluyordu. pJNK1 ve pJNK2 bantlarını analiz ettiğimizde,

JNK1 fosforilasyonunun da, JNK2 fosforilasyonunun da bütün mutantlarda yabancı tip TNFR1'e göre daha düşük olduğunu belirledik. Mutantlar kendi içerisinde değerlendirildiğindeyse, her bir noktanın D mutantının, A mutantına nazaran daha düşük JNK aktivasyonu ile sonuçlandığı görülmekteydi (Şekil 4.28).



Şekil 4.29: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna olan etkisi. a) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ve b) D mutantlarının JNK aktivasyonuna etkisi. Üst resim pJNK, alt resim JNK işaretlemesi c) ImageJ ile a ve b'deki figürler analiz edilip GraphPad ile grafiklendirilmiştir.

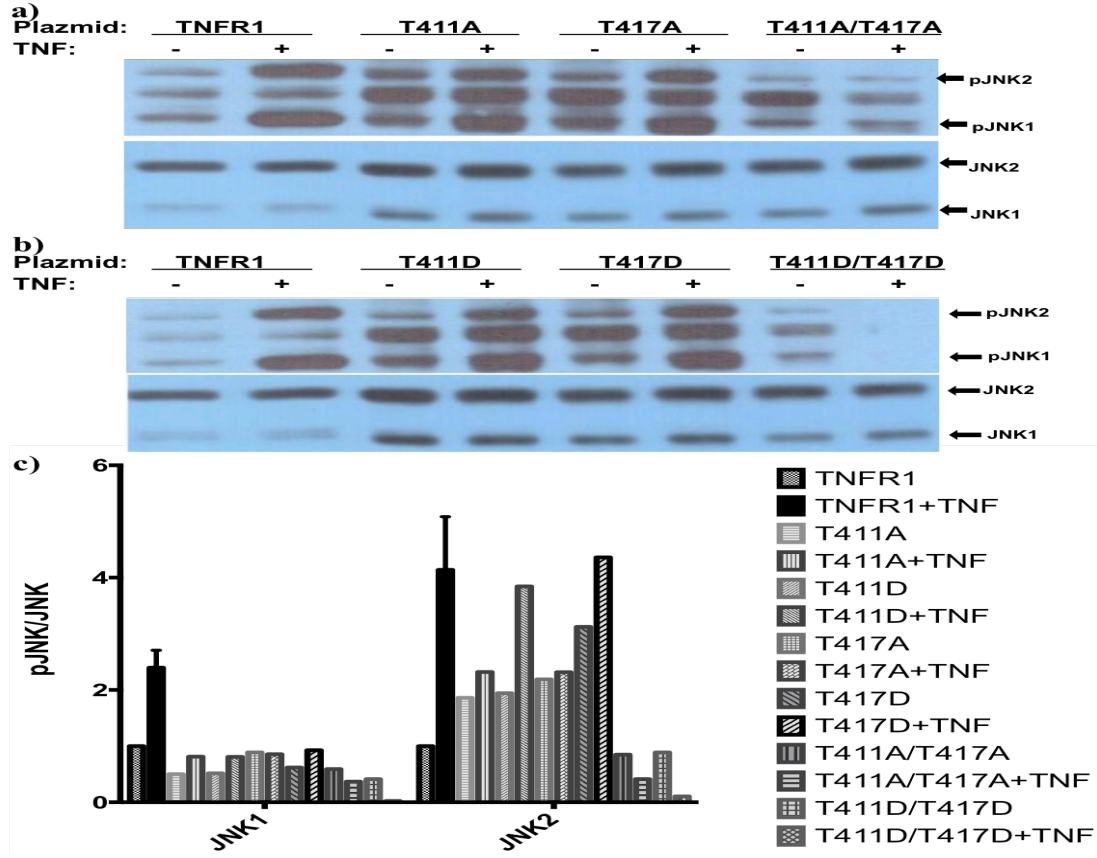
JNK1 ve JNK2 ile eşleşmeyen, ortadaki pJNK bandı da dikkate alınarak analiz gerçekleştirildiğinde, pJNK/JNK oranının, D mutantlarında A mutantlarına göre daha düşük olduğu daha bariz bir şekilde ortaya çıkmaktadır. A mutantları ile yabancı tip TNFR1 arasındaki belirgin fark azalmakta fakat bunlara nazaran tirozin fosforilasyonunun taklit edilmesi durumunda JNK aktivasyonu baskılanmaktadır (Şekil 4.29).



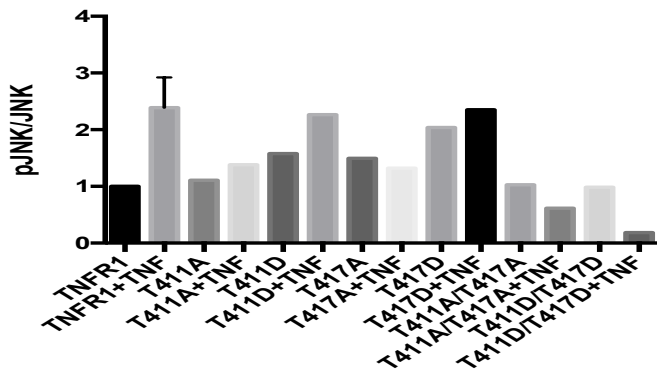
Şekil 4.30: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna olan etkilerinin bütün fosfo-JNK bantları değerlendirilerek incelenmesi. Şekil 4.21'deki figürde bulunan bütün fosfo-JNK bantlarının intensiteleri analiz edilip toplandıktan sonra, bütün JNK bantlarının toplam intensitesine bölünerek hesaplama yapılmıştır. Yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF olmaksızın toplanan lizatlardaki pJNK/JNK oranı 1 kabul edilerek bütün değerler normalize edilmiş ve GraphPad Prism ile grafiklendirilmiştir.

4.16.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının JNK Aktivasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1'in PKA bölge mutantlarının TNF- α aracılı JNK aktivasyonuna etkisine baktığımızda, JNK1 ve JNK2 bantları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, PKA fosforilasyonunun engellendiği ya da taklit edildiği mutantlar arasında sonuca vardırııcı bir fark gözlenmemektedir. Dolayısıyla PKA fosforilasyonunun TNF- α aracılı JNK aktivasyonunda etkisinin olmadığı düşünülebilir (**Şekil 4.30**). Öte yandan, tirozin fosforilasyon mutantları gibi, JNK'da da 3 fosfo-JNK bandının intensitesi 2 JNK bandının intensitesine oranlandığında ise, D mutantlarında, kendilerine tekabül eden A mutantlarına nazaran daha yüksek pJNK/JNK seviyesi tespit edilmektedir (**Şekil 4.31**). Dolayısıyla, PKA fosforilasyonu, TNF- α aracılı JNK aktivasyonunu destekliyor görünmektedir.



Şekil 4.31: Muhtemel PKA fosforilasyon bölgesinin TNF aracılı JNK aktivasyonuna etkisi. a) Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ve b) D mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna etkisi. Üst blot, pJNK; alt blot JNK. c)) ImageJ ile a ve b'deki figürler analiz edilip, TNFR1 transfekte, TNF'siz lizattaki pJNK/JNK oranı 1 kabul ederek değerler normalize edilmiş ve GraphPad ile grafiklendirilmiştir.



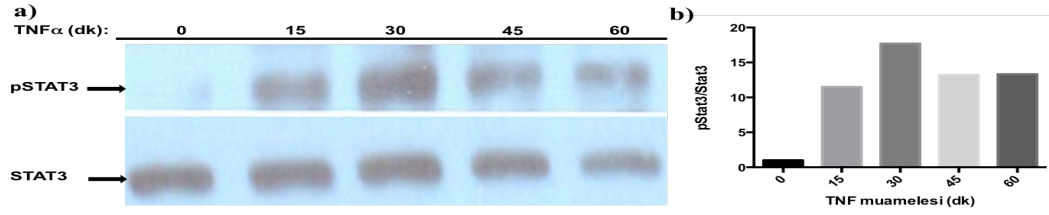
Şekil 4.32: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının TNF aracılı JNK aktivasyonuna etkisinin bütün pJNK bantları dikkate alınarak değerlendirilmesi

4.17. TNFR1 Mutantlarının TNF- α Aracılı Stat3 Y705 Fosforilasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

TNFR1'in, Stat3'ü aktive ettiği bilinmektedir (Guo ve ark., 1998a). JAK2'nin TNFR1'i fosforile ettiğini göstermiş olmamız da, TNFR1 aracılı Stat3 aktivasyonunu bu tez çalışması açısından daha önemli bir yere taşımaktadır. Bu yüzden, diğer yollarda olduğu gibi, Stat3 için de önce TNF- α aracılı fosforilasyon kinetiğini belirledik, ardından mutantlarla transfekte edilmiş hücrelerde yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilmiş hücrelere göre Stat3 fosforilasyon seviyesinin nasıl değiştiğini inceledik.

4.17.1 TNF Aracılı Stat3 Y705 Fosforilasyon Kinetiğinin Belirlenmesi

Stat3 Y705 fosforilasyon kinetiğini incelediğimizde, TNF- α muamelesinin 15.dakikasında Stat3 fosforilasyonunun gözlemlenmeye başladığını, 30. dakikada maksimum seviyesine eriştiğini, 45. dakikada ise tekrar 15 dakika seviyesine gerilediğini belirledik (Şekil 4.32). Bu yüzden, Stat3 aktivasyonunu incelediğimiz deneylerde, 30 dakika TNF- α muamelesi sonrasında hücresel lizatları topladık.

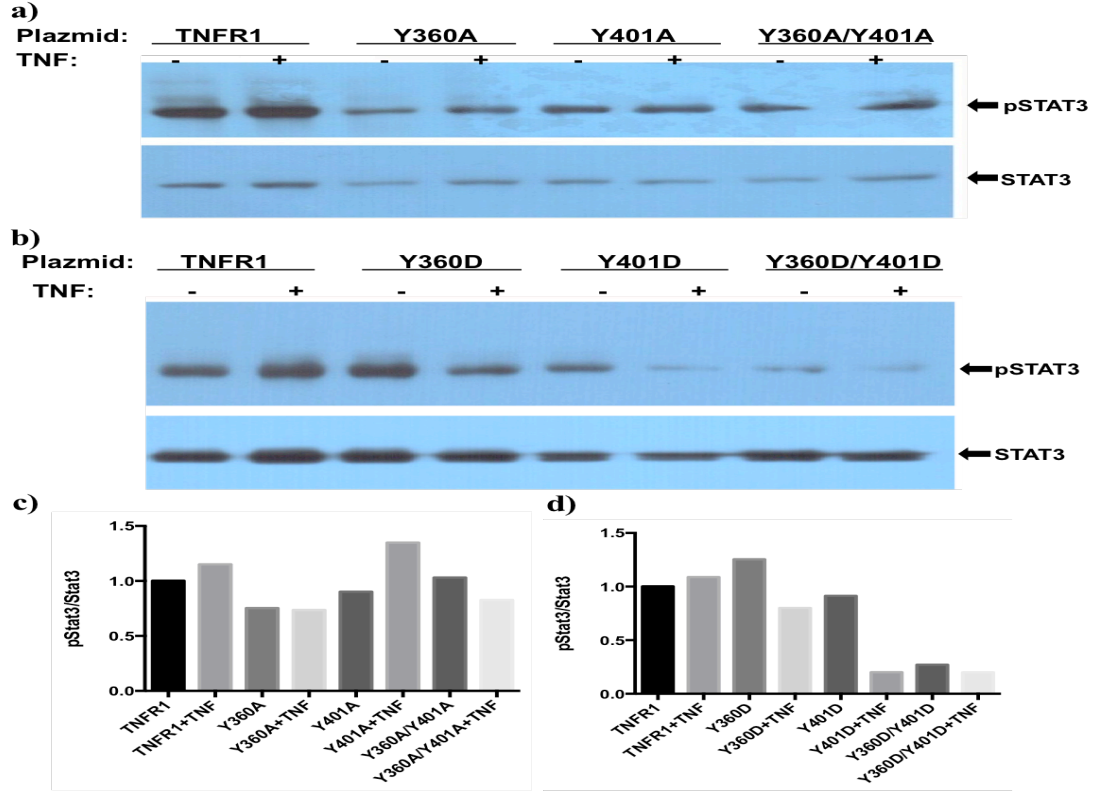


Şekil 4.33: TNF aracılı Stat3 aktivasyon kinetiği (TNF time course). a) 100 μ g hücre lizatı ile yapılan western blot'da, önce pStat3 işaretlemesi, sonrasında aynı blot üzerinde strip off'u takip eden Stat3 işaretlemesi gerçekleştirilmiştir. b) Blot'da elde edilen bantların dansitometrik analizi ImageJ ile yapıлып, TNF'siz ortamdaki pStat3/Stat3 oranı 1 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir. Grafik, GraphPad Prism yazılımıyla çizilmiştir.

4.17.2 TNFR1'in Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının Stat3 Y705 Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Yabancı tip ya da tirozin mutant TNFR1 ekspresyon vektörleri ile transfekte edildikten sonra, 1 saat Na₃VO₄ ile muamele edilip, TNF'siz ya da 30 dakika TNF- α muamelesi yapılarak toplanan lizatlarda pStat3 ve Stat3 işaretledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, TNFR1 Y360D mutanı, TNF- α muamelesi olmaksızın dahi yabancı tip vektörle transfekte edilip TNF- α ile muamele edilmiş hücrelerden daha yüksek seviyede Stat3 fosforilasyonu göstermiştir. Y401D mutantında ise, TNF- α 'siz ortamda kontrole

benzer seviyede Stat3 fosforilasyonu söz konusuysen, TNF- α muamelesi sonrasında Stat3 fosforilasyon seviyesi ciddi bir şekilde düşmektedir. İkili D mutantında ise, hem TNF- α 'siz hem de TNF'li ortamda çok düşük Stat3 fosforilasyonu söz konusudur. Y401A mutantında, Y401D'deki durumun tam tersi, yani artmış Stat3 fosforilasyonu gözlenmiştir. Y360A'da ise, TNF muamelesi Stat3 fosforilasyonunda bir artışa yol açmamıştır (Şekil 4.33).

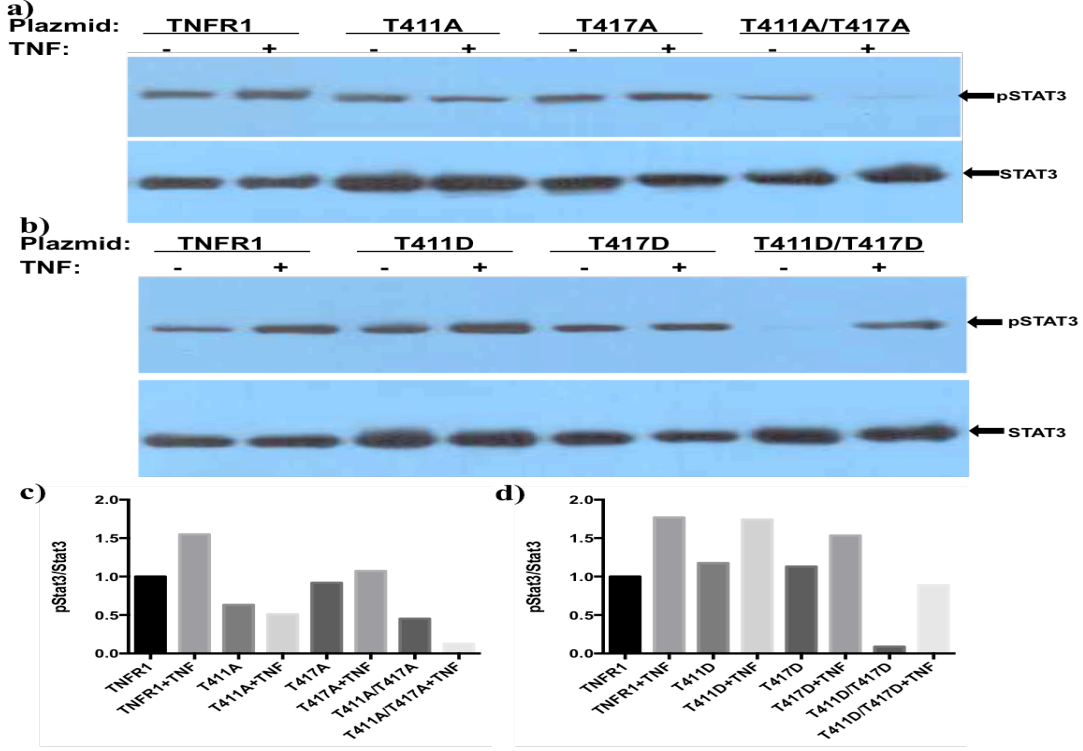


Şekil 4.34: TNFR1 tirozin mutantlarının TNF aracılı Stat3 aktivasyonuna etkisi a) Tirozin fosforilasyon noktalarının A mutantlarının ve b) D mutantlarının Stat3 aktivasyon fosforilasyonuna etkisi. a ve b'de, üst resim pStat3, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total Stat3 işaretlemesini göstermektedir. c) a'daki d) b'deki blotların dansitometrik analiz grafiği. c ve d'de, yabancı tip TNFR1 ile transfecte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pStat3/Stat3 oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.17.3 TNFR1'in PKA Bölge Mutantlarının Stat3 Y705 Fosforilasyonuna Etkilerinin Belirlenmesi

Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A ve D mutantları ile yaptığımız Stat3 işaretlemelerinde, PKA fosforilasyonunun engellenmesinin Stat3 fosforilasyonunu engellediğini, bu etkinin T411'de daha baskın, T417'de daha az belirgin olduğunu belirledik. T411D ve T417D mutantlarında ise, yabancı tip TNFR1'den daha farklı bir

Stat3 fosforilasyon seviyesi gözlemlenmedi. Öte yandan hem T411'in hem de T417'nin değiştirildiği ikili A mutantında da, ikili D mutantında da Stat3 fosforilasyonu baskılanmıştı (Şekil 4.34).

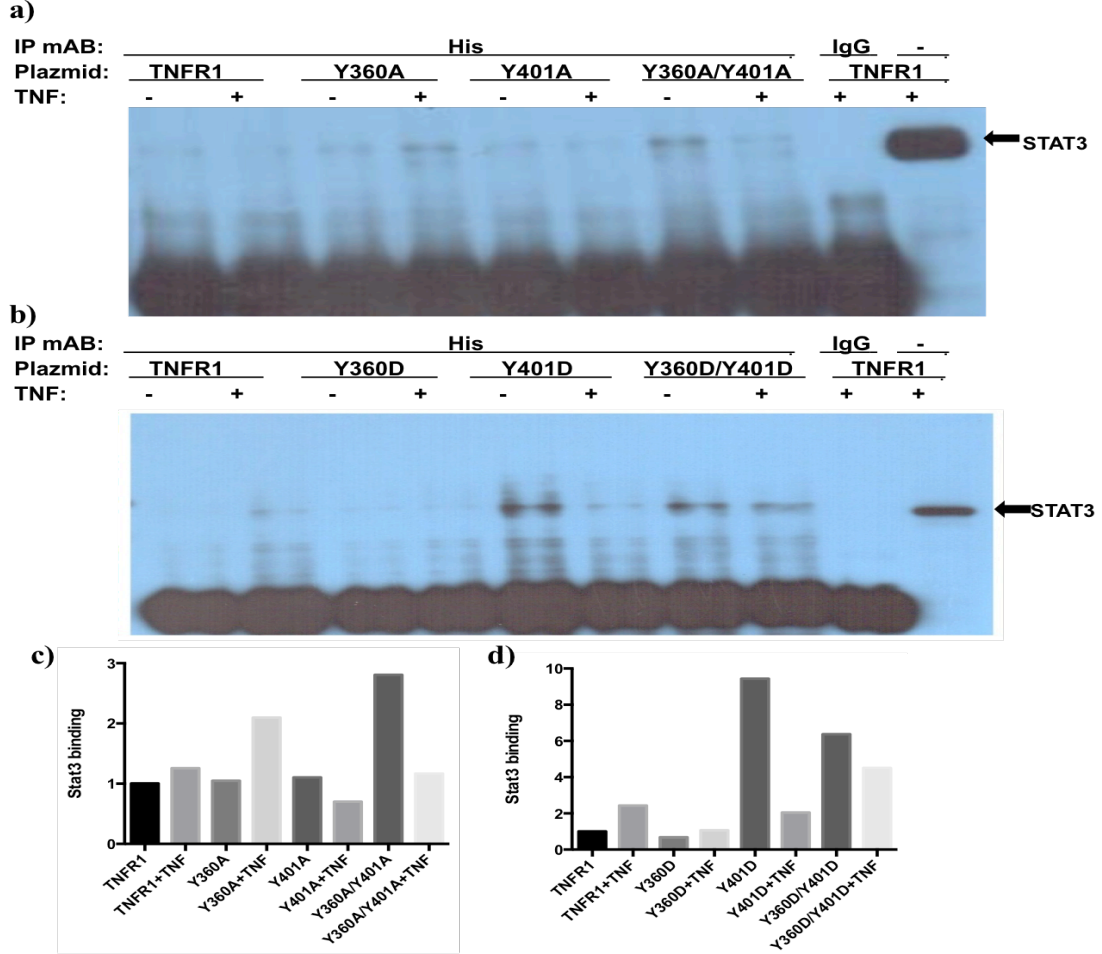


Şekil 4.35: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF aracılı Stat3 aktivasyonuna etkisi. a) Muhtemel PKA fosforilasyon A mutantlarının ve b) D mutantlarının Stat3 aktivasyon fosforilasyonuna etkisi. a ve b'de, üst resim pStat3, alt resim aynı blot üzerinde strip off sonrası total Stat3 işaretlemesini göstermektedir. c) a'daki d) b'deki blotların dansitometrik analiz grafiği. c ve d'de, yabancı tip TNFR1 ile transfecte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerde pStat3/Stat3 oranı 1 kabul edilerek diğer değerler normalize edilmiştir.

4.18. TNFR1 Mutantlarının TNFR1-Stat3 Arasındaki Fiziksel Etkileşime Etkilerinin Belirlenmesi

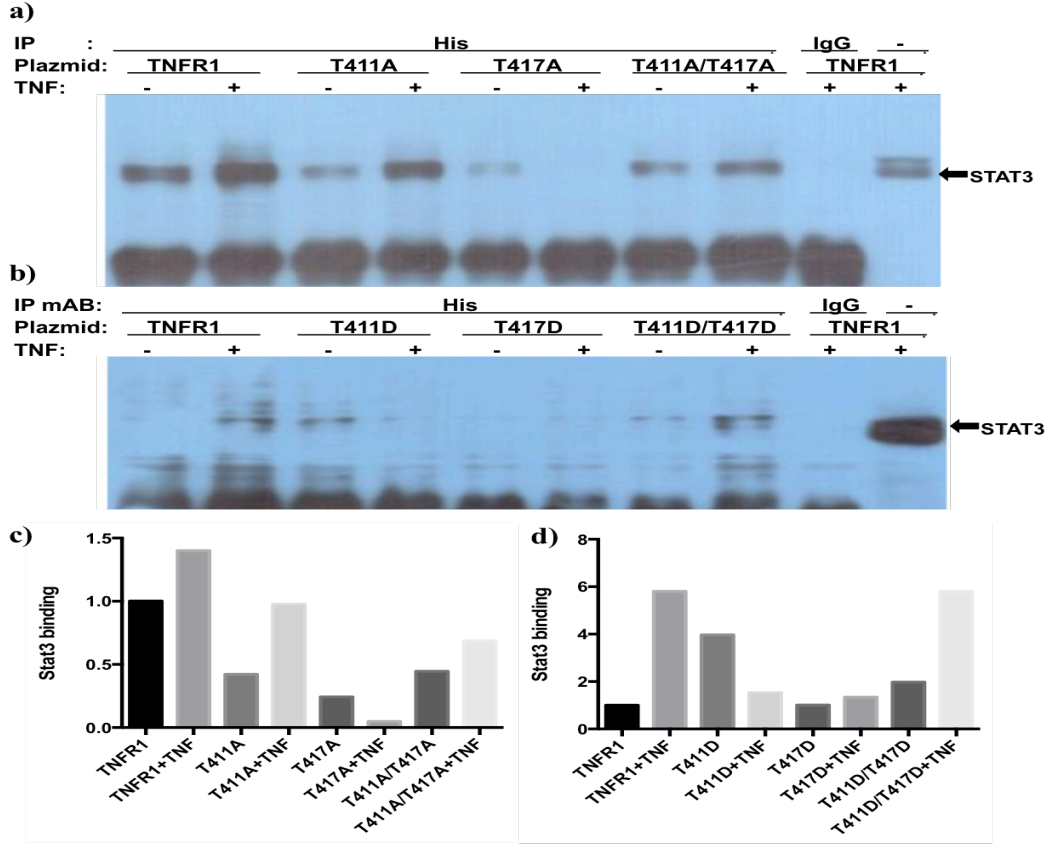
Çalışmamızda, TNFR1 post-translasyonel fosforilasyonlarının, TNFR1 aracılı Stat3 fosforilasyonunun yanı sıra, TNFR1 ve Stat3 arasındaki fiziksel etkileşimi nasıl etkilediğini de inceledik. 4 bağımsız deneyde, TNFR1 Y401D mutantının Stat3'e en kuvvetli bağlanan reseptör formu olduğunu belirledik. 30 dakika TNF muamelesi sonrasında ise, Y401D mutantı ile Stat3 arasındaki bağlantının çok düşük seviyelere gerilediğini gözlemledik (Şekil 4.35). Bu gözlem, Y401D mutantı ile transfecte

hücrelerde, TNF- α muamelesi sonrasında Stat3 fosforilasyonunda gördüğümüz düşüş ile benzerlik sergilemektedir (Şekil 4.33).



Şekil 4.36: TNFR1 tirozin mutantlarının TNFR1-Stat3 fiziksel etkileşimine etkilerinin belirlenmesi. TNFR1 tirozin fosforilasyon noktalarının a)A ile ve b) D ile değiştirilmesinin Stat3 bağlantısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. c)a'ya, d)b'ye ait grafik. IP: Immunopresipitasyonun gerçekleştirildiği antikor. His: His-probe antikor, IgG: standart tavşan IgG'si. Western blot, Stat3 monoklonal antikor ile gerçekleştirilmiş olup, en sağ kuyucuklar, 50 μ g hücresel lizati göstermektedir..

Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A ve D ile değişiminin Stat3-TNFR1 etkileşimi üzerine olan etkilerine baktığımızda ise, hem A mutantlarının, hem de D mutantlarının yabancı tip TNFR1'e göre Stat3 bağlanma etkinliğinin daha düşük olduğunu belirledik. Özellikle T417A mutasyonunda, Stat3-TNFR1 etkileşimi TNF'siz ortamda çok azalmakta, TNF varlığında ise ortadan kalkmaktadır. Dolayısıyla, T417 fosforilasyonu değilse bile, T417 aminoasidi, TNFR1-Stat3 bağlantısı açısından önemli görünmektedir (Şekil 4.36).



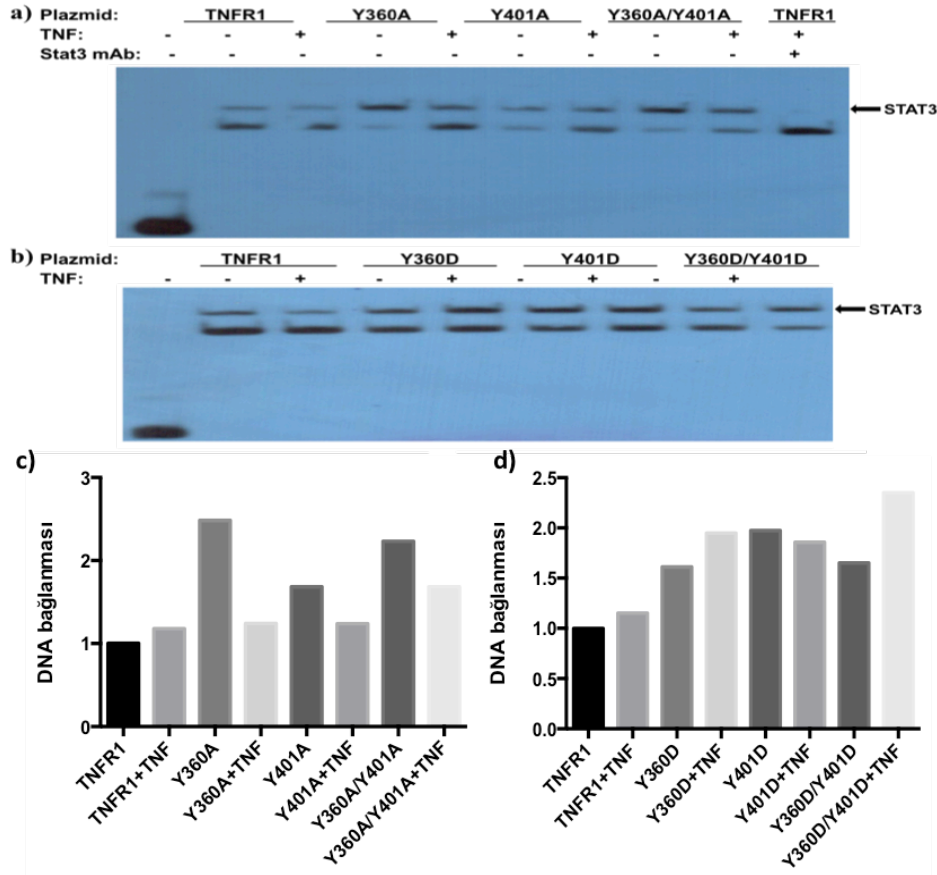
Şekil 4.37: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon mutasyonlarının TNFR1-Stat3 fiziksel etkileşimine etkilerinin belirlenmesi. TNFR1 PKA fosforilasyon noktalarının a)A ile ve b) D ile değiştirilmesinin Stat3 bağlantısı üzerindeki etkisinin belirlenmesi. c)a'ya, d)b'ye ait grafik. IP: Immunopresipitasyonun gerçekleştirildiği antikor. His: His-probe antikor, IgG: standart tavşan IgG'si. Western blot, Stat3 monoklonal antikor ile gerçekleştirilmiş olup, en sağ kuyucuklar, 50µg hüresel lisatı göstermektedir.

4.19. TNFR1 Mutantlarının Stat3'ün DNA'ya Bağlanma Kapasitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Stat3'ün aktivasyonundan bahsedilebilmesi için DNA'ya bağlanma etkinliğinin değerlendirilmesi gerektiğini düşündük. Bu nedenle, Stat3 EMSA (Electro-Mobility Shift Assay /gel shift) deneyi gerçekleştirdik. Gördüğümüz bantlardan hangisinin Stat3 bandı olduğunu belirleyebilmek için, yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF- α ile muamele edilmiş örneklerle kurduğumuz reaksiyonlardan birine, EMSA uyumlu Stat3 antikor ekledik. Antikor eklenmesi, bantlardan birinde supershift'e neden oldu. Bu sayede, bu bandın Stat3 bandı olduğundan emin olduk (Şekil 4.37).

4.19.1 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının Stat3'ün DNA'ya Bağlanma Kapasitesine Etkilerinin Belirlenmesi

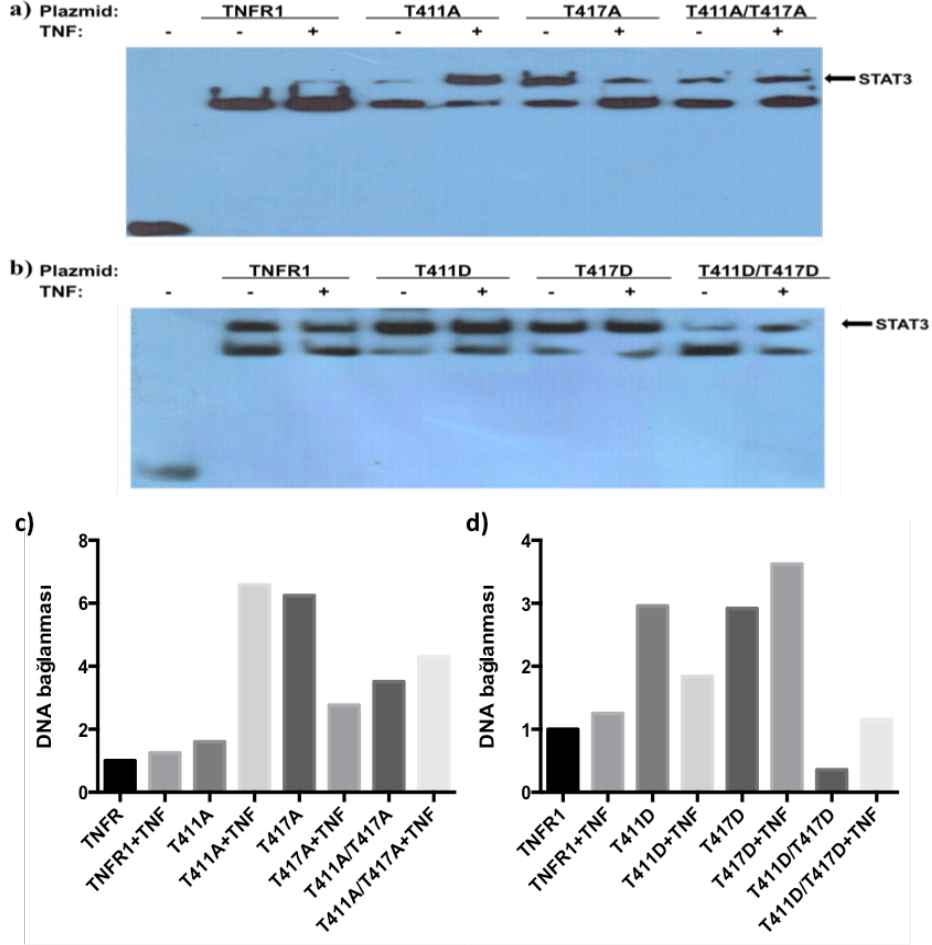
Stat3 tirozin fosforilasyon mutantlarının Stat3 EMSA sonuçlarına baktığımızda, Y360A ve Y401A mutantlarında TNF- α yokluğunda; Y360D ve Y401D mutantlarında ise hem TNF- α 'lı, hem de TNF'siz ortamda artmış Stat3 aktivasyonu gözlemledik. Y360D mutantına TNF muamelesi Stat3 aktivasyonunda hafif bir artışa daha yol açıp Y401D seviyesine gelmesine yol açarken, Y401D transfeksiyonunda TNF- α muamelesi Stat3 aktivasyon seviyesinde belirgin bir fark oluşturmamaktaydı (Şekil 4.37).



Şekil 4.38: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının Stat3 EMSA sonuçları. Tirozin fosforilasyon noktalarının a) A mutantlarının ve b) D mutantlarının EMSA sonuçları. Free probe örnekleri, lizat koyulmaksızın kurulan reaksiyon ürünü, Supershift ise monoklonal Stat3 antikorunu eklenmiş olan reaksiyon ürünü göstermektedir. a ve b'de en sol kuyucuklar free probe, a'da en sağ kuyucuk supershift deneyidir. c) a'daki, d) b'deki sonuçların dansimetrik analizleri, üst bantların (stat3) intensitesinin, alt bantların (non-spesifik) intensitesiyle toplamına oranlanması ile (Stat3/Stat3+nonspesifik) gerçekleştirilmiş; grafikler GraphPad Prism ile çizilmiştir.

4.19.2 TNFR1'in Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının Stat3'ün DNA'ya Bağlanma Kapasitesine Etkilerinin Belirlenmesi

PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF- α varlığında ve yokluğunda Stat3 DNA bağlanma kapasitesine olan etkilerini incelediğimizde, T411A mutantında TNF- α muamelesi sonrasında, T417A mutantında ise TNF- α muamelesi yapılmadan artmış Stat3 aktivasyonu gözlemledik. T417A mutantında TNF muamelesi sonrasında Stat3 aktivasyonunda bir azalma söz konusuydu. Öte yandan, T411D ve T417D mutantlarının her ikisinde de, hem TNF- α varlığında, hem de TNF- α yokluğunda artmış Stat3 aktivasyonu söz konusuydu (Şekil 4.38).



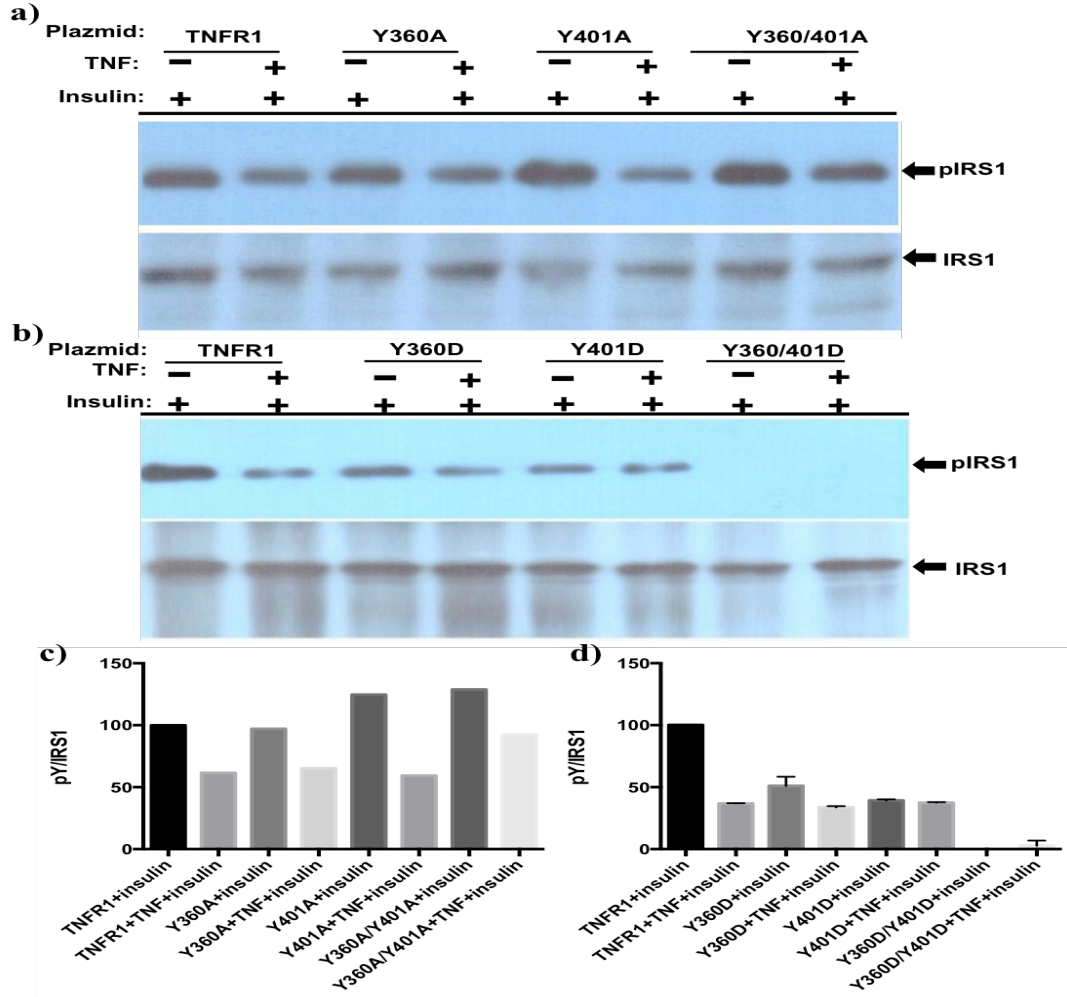
Şekil 4.39: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının Stat3 EMSA sonuçları. T411 ve T417 noktalarının a) A mutantlarının ve b) D mutantlarının EMSA sonuçları. a ve b'de en sol kuyucuklar Free probe örnekleridir. c) a'daki, d) b'deki sonuçların densitometrik analizleri, üst bantların (stat3) intensitesinin, alt bantların (non-spesifik) intensitesiyle toplamına oranlanması ile (Stat3/Stat3+nonspesifik) gerçekleştirilmiş; grafikler GraphPad Prism ile çizilmiştir

4.20 TNFR1 Mutantlarının İnsülin Sinyalleşmesine Etkilerinin Belirlenmesi

TNF- α 'nın, IRS-1'in serin/threonin fosforilasyonuna yol açarak tirozin fosforilasyonunu engellediği ve bu yolla insülin sinyalleşmesini baskıladığı bilinmektedir (Feinstein ve ark., 1993; Hotamisligil ve ark., 1996). TNFR1 post-translasyonel fosforilasyonlarının insülin sinyalleşmesinin TNF tarafından baskılanması sürecini nasıl etkilediğini belirlemek için, yabancı tip ve mutant vektörlerle transfekte edilmiş hücrelere, TNF varlığında ve TNF yokluğunda 5 dakika insülin muamelesi gerçekleştirdik. Bu hücrelerden topladığımız lizatları kullanarak western blot ile önce fosfo-tirozin işaretlemesi, ardından strip off yapıp aynı blotlarda IRS1 işaretlemesi gerçekleştirdik. Böylece, IRS-1 tirozin fosforilasyonunun mutant reseptörlerden nasıl etkilendiğini saptamaya çalıştık.

4.20.1 TNFR1 Tirozin Fosforilasyon Mutantlarının İnsülin Sinyalleşmesine Etkilerinin Belirlenmesi

Tirozin fosforilasyon mutantlarının IRS-1 tirozin fosforilasyonu üzerindeki etkilerini incelediğimizde (**Şekil 4.39**), Y360A mutantını eksprese eden hücrelerde, TNF- α varlığında ve yokluğunda insülin indüklü IRS1 tirozin fosforilasyonunun yabancı tip TNFR1 eksprese eden hücrelerle benzer seviyelerde olduğunu, Y401A ve Y360A/Y401A mutantlarını eksprese eden hücrelerdeyse özellikle TNF yokluğunda artmış IRS-1 tirozin fosforilasyonu gözlendiğini belirledik.

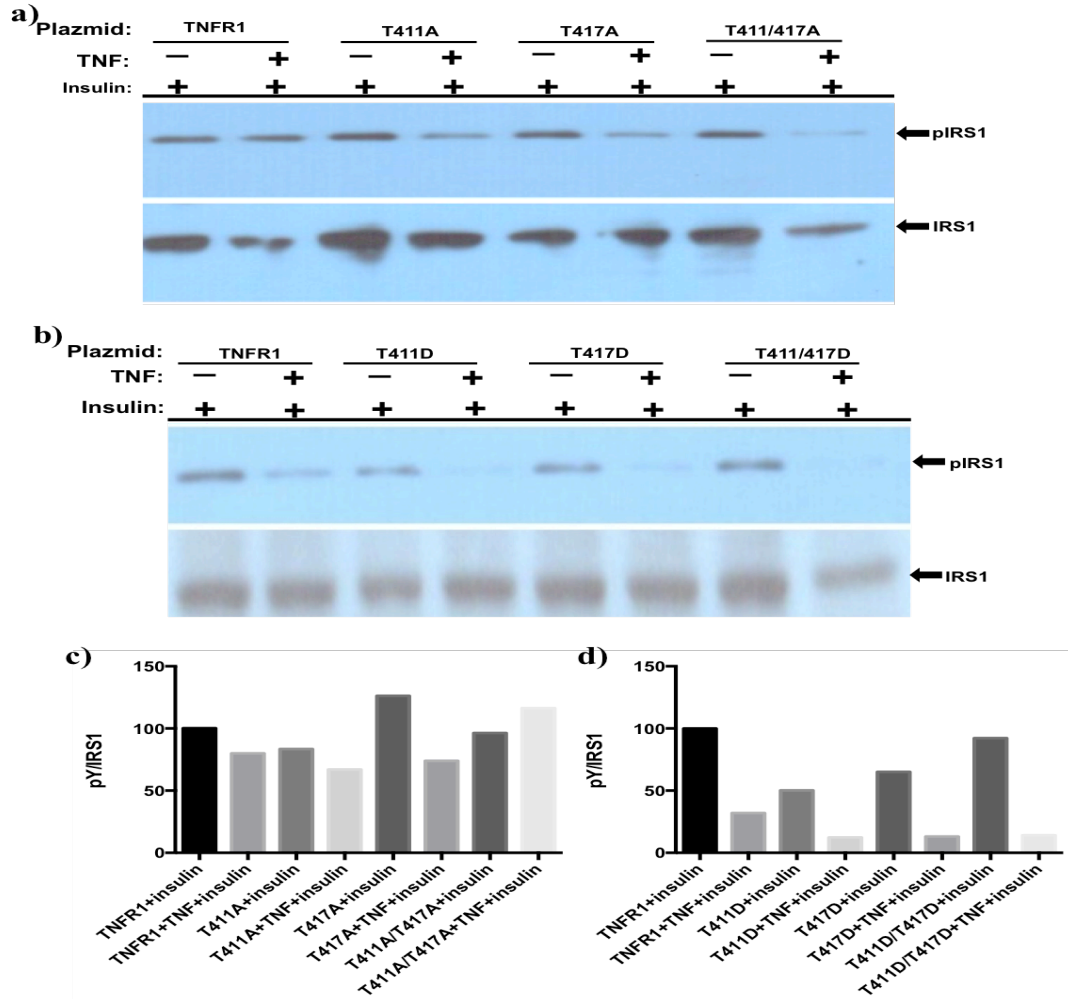


Şekil 4.40: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi. Y360 ve Y401 noktalarının a) A mutantları ve b) D mutantları ile transfekte edilmiş hücrelerde TNF varlığında ve yokluğunda insülin muamelesi yapılmış, fosfo-tirozin (pY20) ve IRS-1 işaretlemeleri gerçekleştirilmiştir. c) a'daki, d)b'deki blotlardaki pY bant intensiteleri, IRS-1 bant intensitelerine oranlanarak relatif IRS-1 tirozin fosforilasyon değerleri hesaplanmış, yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerdeki pY/IRS-1 oranı 100 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir.

Tirozin fosforilasyonunu taklit ettiğini varsaydığımız aspartik asit mutasyonlarında ise durum tam tersiydi. IRS1 tirozin fosforilasyonu, Y360D ve Y401D mutantlarında TNF- α muamelesine gereksinim duyulmaksızın baskılanmış, Y360D/Y401D mutantında ise tamamen ortadan kalkmıştı. Y360D'de TNF- α muamelesi IRS-1 fosforilasyonunu bir nebze daha azaltmış, Y360D/Y401D'de ise TNF- α muamelesi ile çok hafif bir IRS-1 tirozin fosforilasyonu gözlemlenmeye başlanmıştı (data gösterilmedi). Dolayısıyla, TNFR1'in tirozin fosforilasyonu, insülin sinyalleşmesinin baskılanmasında primer rolü oynuyor görünmektedir.

4.20.2 TNFR1 Muhtemel PKA Fosforilasyon Bölge Mutantlarının İnsülin Sinyalleşmesine Etkilerinin Belirlenmesi

Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNF- α varlığında ve yokluğunda IRS-1 tirozin fosforilasyonu üzerindeki etkilerini incelediğimizde (Şekil 4.40), T417A mutantında TNF- α muamelesi yapılmamış, T411A/T417A mutantındaysa TNF- α muamelesi yapılmış hücrelerde artmış IRS-1 tirozin fosforilasyonu gözlemledik. T411D ve T417D mutantlarındaysa, hem TNF- α varlığında, hem de TNF- α yokluğunda azalmış IRS-1 tirozin fosforilasyonu, dolayısıyla baskılanmış insülin sinyalleşmesi söz konusuydu (Şekil 4.40).



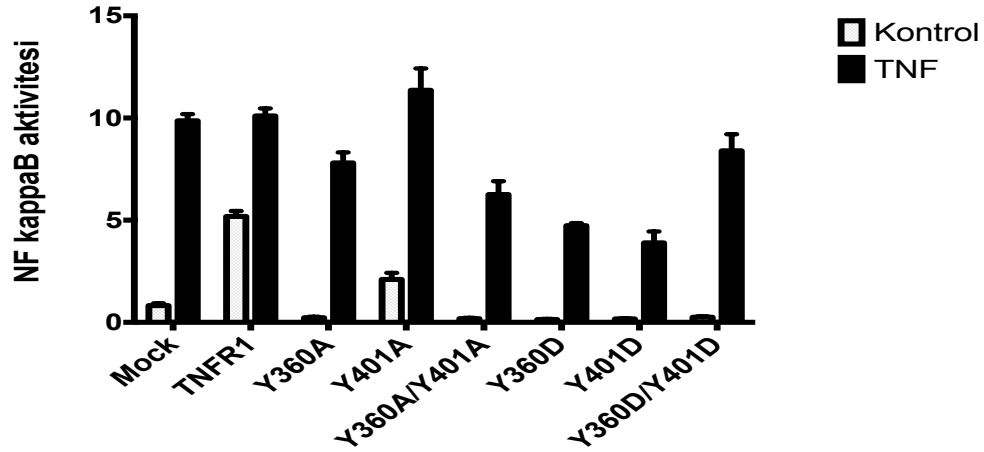
Şekil 4.41: TNFR1 muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının IRS1 tirozin fosforilasyonuna etkilerinin belirlenmesi. T411 ve T417 noktalarının a) A mutantları ve b) D mutantları ile transfekte edilmiş hücrelerde TNF varlığında ve yokluğunda insülin muamelesi yapılmış, fosfo-tirozin (pY20) ve IRS-1 işaretlemeleri gerçekleştirilmiştir. c) a'daki, d)b'deki blotlardaki pY bant intensiteleri, IRS-1 bant intensitelerine oranlanarak relatif IRS-1 tirozin fosforilasyon değerleri hesaplanmış, yabanıl tip TNFR1 ile

transfekte edilip TNF ile muamele edilmemiş hücrelerdeki pY/IRS-1 oranı 100 kabul edilerek değerler normalize edilmiştir.

4.21. TNFR1 Mutantlarının TNF Aracılı NF-κB Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

TNFR1 mutantlarının NF-κB aktivasyonuna olan etkilerini belirleyebilmek için, 293T hücrelerini, yabanıl tip ve mutant TNFR1 vektörleri ile beraber, promotor bölgesinde NF-κB bağlanma bölgesi bulunduran lusiferaz reporter plazmidi (NF-luc) ile de ko-transfeksiyona uğrattık.

TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının transfekte edildiği hücrelerden alınan lusiferaz sinyallerini değerlendirdiğimizde, Y401A mutanı haricindeki mutantlarının hepsinin bazal NFκB aktivitesini susturduğunu, Y401A'da TNFR1 transfekte edilmemiş hücreden daha yüksek fakat yabanıl tip TNFR1 transfekte edilmiş hücreden daha düşük NFκB aktivitesi gözlendiğini belirledik. Bunun yanı sıra; Y360A, Y360A/Y401A, Y360D ve Y401D mutantlarında, TNF-α gözlenen NFκB aktivitesinin yabanıl tip vektörle transfekte edilmiş hücrelerde TNF-α gözlenenden daha düşük olduğunu gördük (Şekil 4.41, tablo 4.1). TNF-α varlığında bazala nazaran NFκB aktivasyonunda gözlenen artış, bütün mutantlarda yabanıl tip TNFR1'den daha yüksekti.

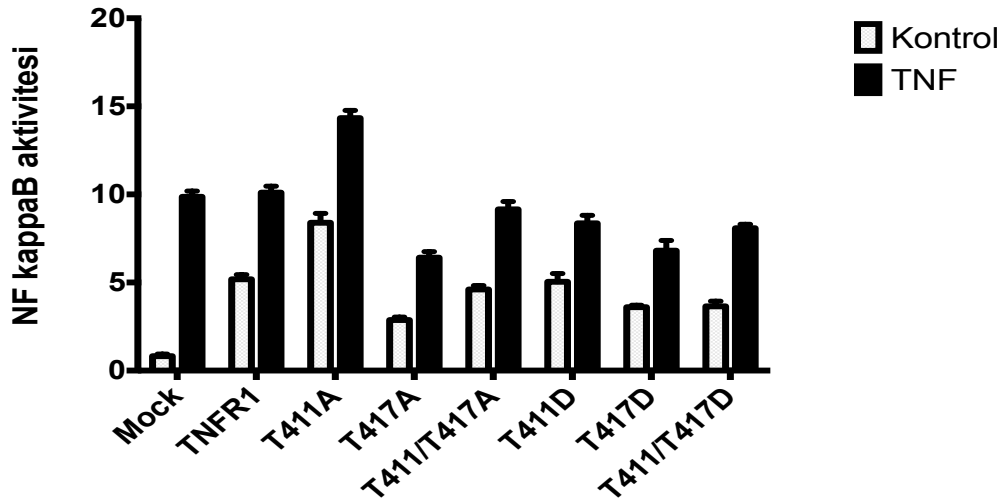


Şekil 4.42: TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarının NFκB aktivitesine etkisinin belirlenmesi. Lusiferaz aktivitesine bağlı olarak değerlendirilen NF-κB aktivitesi, mock transfekte edilip TNF muamelesi yapılmamış hücrelerde 1 kabul edilerek normalize edildi. Veriler GraphPad prism yardımıyla grafiklendirildi ve istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

Mutant	Ctrl (vs. TNFR1)	+ TNF (vs. TNFR1+TNF)
Y360A	0.0079	0.0079
Y401A	0.0079	0.31
Y360A/Y401A	0.0079	0.0079
Y360D	0.0079	0.0079
Y401D	0.0079	0.0079
Y360D/Y401D	0.0079	0.15

Tablo 4.1: TNFR1 Tirozin mutantlarının NF- κ B aktivasyonuna olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri

Muhtemel PKA fosforilasyon bölgelerinin A ve D mutantlarına baktığımızda ise, bazal NF κ B aktivitesinin T411A mutantında arttığını, T417A'da ise azaldığını belirledik. T411D mutantında ise bazal NF κ B aktivitesi, yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerden anlamlılık derecesinde farklı değildi. T411D, T417D ve T411D/T417D mutantlarında TNF- α varlığında gözlenen NF κ B aktivitesi hem mock transfekte, hem de yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerden daha düşüktü. T411A/T417A mutantında TNF- α varlığında yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelere benzer NF κ B aktivasyonu gözlenirken, T411A mutantında TNF- α varlığında görülen NF κ B aktivasyonu yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerin 1,5 katı idi.



Şekil 4.43: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının NF κ B aktivitesine etkisinin belirlenmesi. Lusiferaz aktivitesine bağlı olarak değerlendirilen NF- κ B aktivitesi, mock transfekte edilip TNF muamelesi yapılmamış hücrelerde 1 kabul edilerek normalize edildi. Veriler GraphPad prism yardımıyla grafiklendirildi ve istatistiksel analiz gerçekleştirildi.

Mutant	Ctrl (vs. TNFR1)	+ TNF (vs. TNFR1+TNF)
T411A	0.0079	0.0079
T417A	0.0079	0.0079
T411A/T417A	0.15	0.22
T411D	0.53	0.0079
T417D	0.0079	0.0079
T411D/T417D	0.0079	0.0079

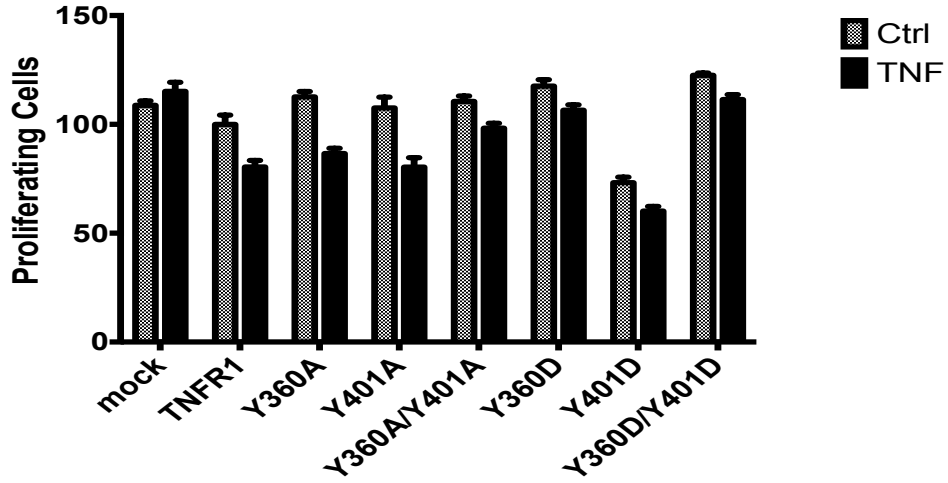
Tablo 4.2: TNFR1 PKA fosforilasyon mutantlarının NF-kB aktivasyonuna olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri

4.22. TNFR1 Mutantlarının Hücre Sağ Kalımına Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1 post translasyonel modifikasyonlarının hücre proliferasyonunu nasıl etkilediğini belirlemek için, MTT analizinden faydalandık. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), hücre sel NAD(P)H-bağımlı oksidoredüktazlar tarafından formazan'a indirgenir. Formazan renk yoğunluğunun kolorimetrik ölçümüyle, o anda analiz edilen örneklerdeki metabolik aktivite gösteren hücre miktarı görece olarak hesaplanabilir (Mosmann, 1983). Biz de, boş pcDNA3.1a plazmidi ile, yabancı tip ve mutant TNFR1 plazmidleri ile 293T hücrelerini Lipofektamin-2000 aracılı ters transfeksiyonuna uğrattık. Transfeksiyon sonrası 48. Saatten itibaren, hücrelere taze besiyeri ya da 10ng/ml final konsantrasyona erişecek şekilde TNF- α içeren taze besiyeri ekleyip 24 saat inkübe ettik. İnkübasyon süresinin ardından, MTT analizini gerçekleştirdik.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, yabancı tip TNFR1 vektörü ile transfekte hücreler, boş plazmidle transfekte edilmiş hücrelere göre daha düşük sağ kalım göstermektedir. 24 saat TNF- α muamelesi ektopik TNFR1 transfeksiyonu yapılmamış hücrelerde hücre sağ kalımını anlamlı bir şekilde etkilemezken, yabancı TNFR1'in ektopik ekspresyonunun sağlandığı hücrelerin sağ kalımını azaltmaktadır. Y360D mutanı yabancı tip TNFR1'e göre anlamlı şekilde artmış, Y401D mutanı ise yabancı tip TNFR1'e göre anlamlı şekilde azalmış proliferasyona neden olmaktadır. Tirozin fosforilasyonunun engellendiği mutantlarda TNF- α muamelesi ile hücre sağ kalımı yabancı tip vektörle transfekte

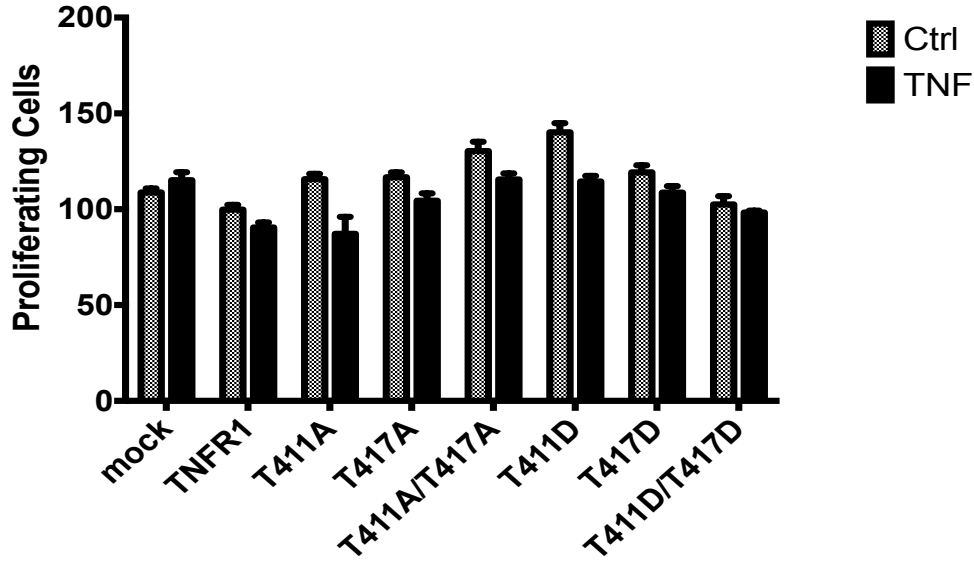
hücelere benzer şekilde azalırken, tirozin fosforilasyon noktalarının D mutantlarında TNF- α etkisi hafiflemektedir. Muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının tekli A ve D mutantları, yabancı tip TNFR1'e göre artmış proliferasyona yol açarken, T411D/T417D ikili mutantındaki hücre sağ kalım oranı yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerle benzerlik göstermekte fakat bu hücrelerde ve T417D mutanı ile transfekte hücrelerde TNF- α muamelesi hücre sağ kalımını etkilememektedir (Şekil 4.43/Tablo 4.3 ve Şekil 4.44/Tablo 4.4).



Şekil 4.44: Tirozin fosforilasyon mutantlarının hücre sağ kalımına etkilerinin belirlenmesi. 6'şar tekrar halinde transfekte edilmiş hücreler, TNF- α muamelesi olmaksızın ya da 24 saat 10ng/ml TNF- α ile inkübe edilerek MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

Mutant	Ctrl (vs. TNFR1)	+ TNF (vs. TNFR1+TNF)
Y360A	0.082	0.084
Y401A	0.238	0.79
Y360A/Y401A	0.065	0.004
Y360D	0.026	0.002
Y401D	0.002	0.002
Y360D/Y401D	0.002	0.002

Tablo 4.3: TNFR1 Tirozin mutantlarının hücre sağkalımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri. Anlamlılık ifade eden ($p < 0.05$) değerler koyu yazılmıştır.



Şekil 4.45: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının hücre sağ kalımına etkilerinin belirlenmesi. 6'şar tekrar halinde transfecte edilmiş hücreler, TNF- α muamelesi olmaksızın ya da 24 saat 10ng/ml TNF- α ile inkübe edilerek MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

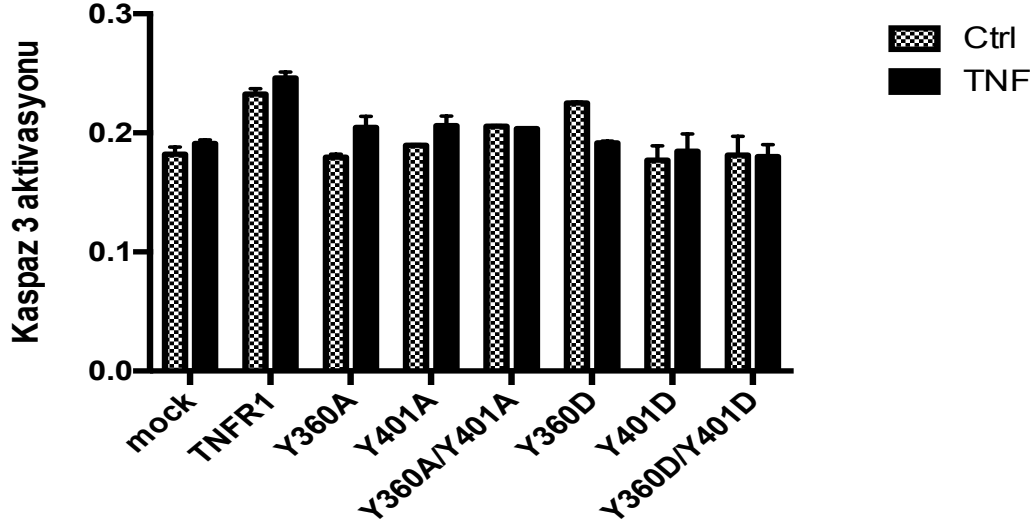
Mutant	Ctrl (vs. TNFR1)	+ TNF (vs. TNFR1+TNF)
T411A	0.008	0.675
T417A	0.004	0.065
T411A/T417A	0.002	0.002
T411D	0.002	0.002
T417D	0.004	0.002
T411D/T417D	0.457	0.041

Tablo 4.4: TNFR1 PKA fosforilasyon mutantlarının hücre sağkalımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri. Anlamlılık ifade eden ($p < 0.05$) değerler koyu yazılmıştır.

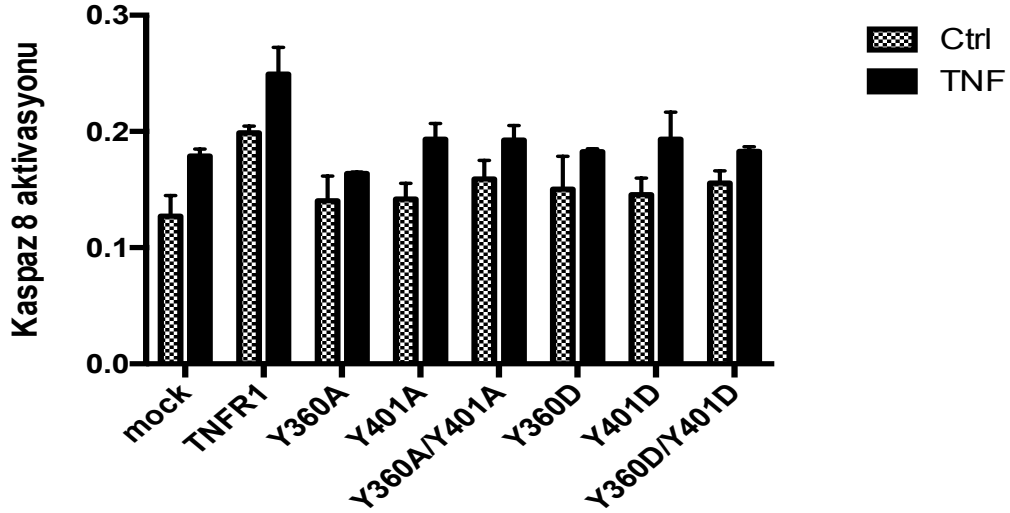
4.23. TNFR1 Mutantlarının Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 Aktivasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

TNFR1 post-translasyonel fosforilasyonlarının TNF ilişkili apoptosisi nasıl etkilediğini belirlemek için, boş pcDNA3.1a plazmidi, yabancı tip TNFR1 ve mutant reseptörleri eksprese eden plazmidlerle 293T hücreleri transfecte edildi. Transfeksiyon sonrası 48.saatte, TNF- α verilmeden ya da 10ng/ml TNF- α verilip, hücreler 24 saat daha inkübe edildi. Ardından hücresel lizatlar toplanıp, p-nitroaniline (pNA) kromoforu

ile işaretli IETD (kaspaz 8) ya da DEVD (kaspaz 3) süstratları ile proteolitik kırılma için uygun reaksiyon koşullarında (kolorimetrik kaspaz assay kitleri kullanılarak) ve 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.

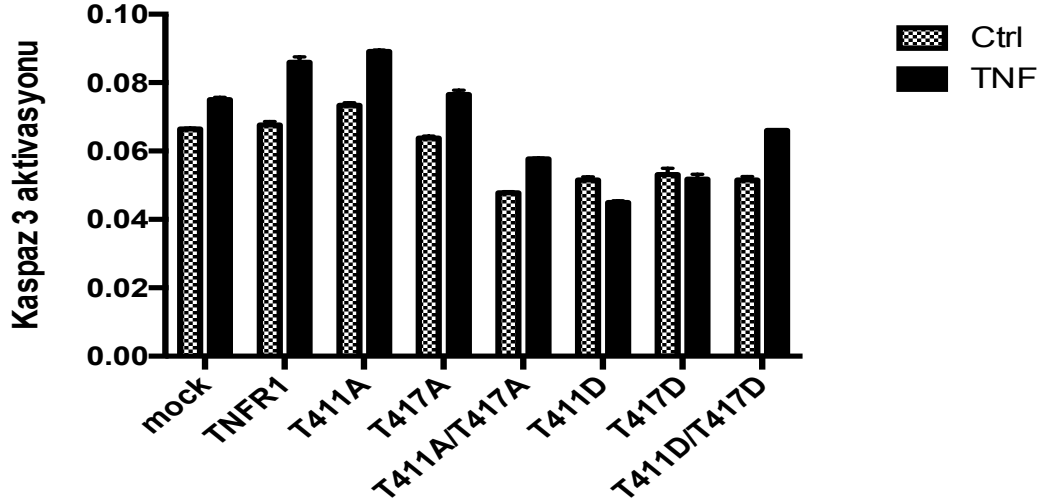


Şekil 4.46: Tirozin fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 3 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi

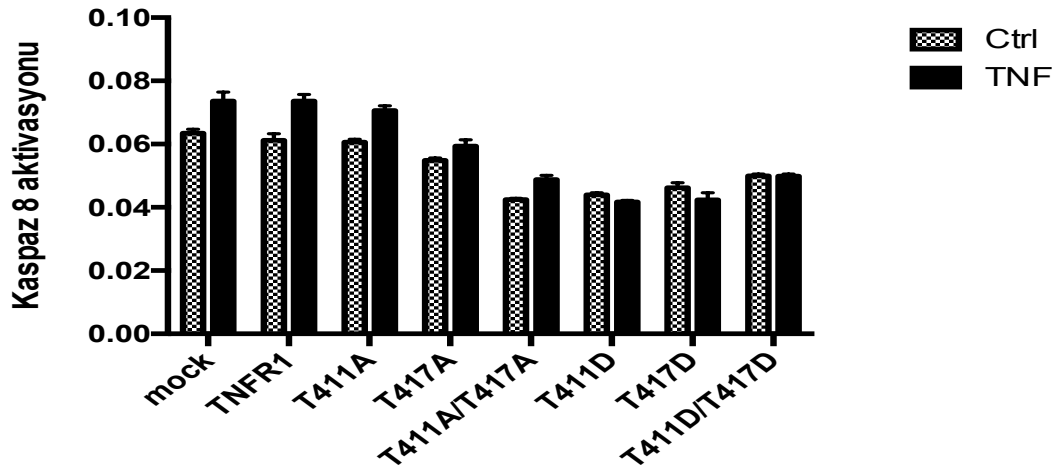


Şekil 4.47: Tirozin fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 8 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi

TNFR1 tirozin fosforilasyon mutantlarına baktığımızda, hem A mutantlarında, hem de D mutantlarında, yabani tip göre azalmış; kontrole benzer bir kaspaz 3 (Şekil 4.45) ve kaspaz 8 (Şekil 4.46) aktivasyon profili gözlemledik.



Şekil 4.48: Muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 3 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi



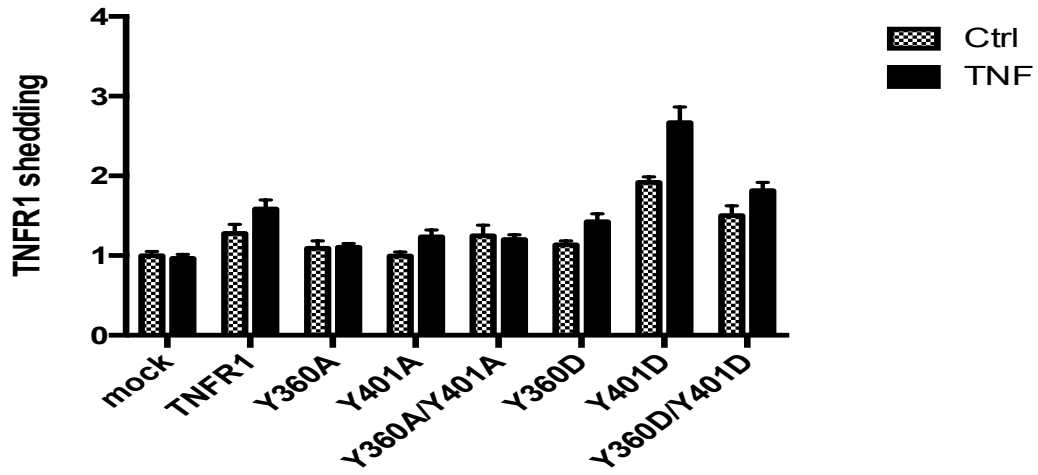
Şekil 4.49: Muhtemel PKA fosforilasyon mutantlarının Kaspaz 8 aktivasyonuna etkilerinin belirlenmesi

TNFR1 üzerindeki muhtemel PKA fosforilasyon noktalarının A ve D mutantlarını incelediğimizdeyse, T411A ve T417A mutantlarında yabancı tip TNFR1'e benzer Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 aktivasyonu gözlemlenirken, ikili A mutantında ve bütün D mutantlarında, boş plazmidle transfekte edilmiş kontrolden dahi daha düşük seviyelere gerilemiş kaspaz aktivasyonu söz konusuydu (Şekil 4.47 ve Şekil 4.48).

4.24. TNFR1 Mutantlarının TNFR1 Salınımına (Shedding) Etkilerinin Belirlenmesi

TNFR1 sinyal iletiminin susturulmasını sağlayan süreçlerden biri, TNFR1'in TACE aracılı kırılımı ile ekstraselüler bölgesinin salınması, yani shedding'dir. Tez

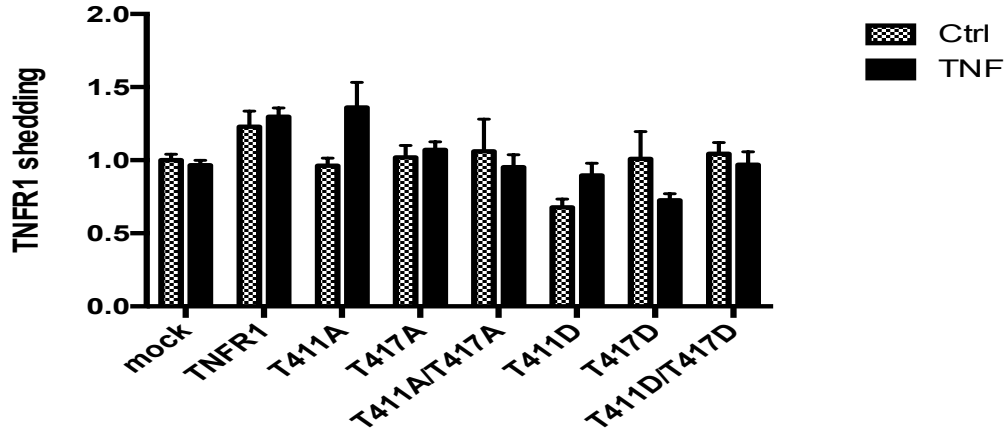
projemizde incelediğimiz TNFR1 mutantlarının shedding sürecini etkileyip etkilemediğini belirlememizin, reseptörlerin sinyal iletim kapasitelerini tam olarak yorumlamamızda fayda sağlayacağını düşündük. Bu amaçla, 293T hücrelerini lipofektamin 2000 kullanarak ters transfekte ettik. Transfeksiyon sonrası 24. saatte, kuyucuklara tam besiyeri ya da final konsantrasyonu 10ng/ml'yi sağlayacak kadar TNF- α eklenmiş tam besiyeri ekledik. 24 saat inkübasyonun ardından, ELISA ile besiyerine salınmış TNFR1 düzeyini belirleyip, bu sonuçları eşzamanlı gerçekleştirilen MTT analizi ile oranlayarak hücre sayısına göre normalize ettik.



Şekil 4.50: Tirozin fosforilasyon mutantlarının TNFR1 salınımına etkilerinin belirlenmesi

Mutant	Ctrl (vs. TNFR1)	+ TNF (vs. TNFR1+TNF)
Y360A	0.305	0.004
Y401A	0.026	0.065
Y360A/Y401A	0.571	0.026
Y360D	0.3874	0.387
Y401D	0.0043	0.002
Y360D/Y401D	0.132	0.238

Tablo 4.5: TNFR1 Tirozin mutantlarının TNFR1 salınımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri. Anlamlılık ifade eden ($p < 0.05$) değerler koyu yazılmıştır.



Şekil 4.51: Muhtemel PKA fosforilasyon bölge mutantlarının TNFR1 salınımına etkilerinin belirlenmesi

Mutant	Ctrl (vs. TNFR1)	+ TNF (vs. TNFR1+TNF)
T411A	0.22	0.416
T417A	0.8	0.05
T411A/T417A	0.15	0.004
T411D	0.008	0.004
T417D	0.056	0.004
T411D/T417D	0.09	0.052

Tablo 4.6:: TNFR1 PKA fosforilasyon mutantlarının TNFR1 salınımına olan etkilerinin Mann Whitney U test'e göre p değerleri. Anlamlılık ifade eden ($p < 0.05$) değerler koyu yazılmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, TNF- α muamelesi ile TNFR1 salınımı artmakta, bu artış, en belirgin şekilde Y401D mutantında gözlenmektedir. TNFR1 tirozin fosforilasyonunun engellendiği mutantlarda, TNFR1 salınımının azaldığını, Y401D ve Y360D/Y401D mutantında arttığını belirledik. Tirozin fosforilasyonunu taklit eden mutantların TNF- α ile muamelesi TNFR1 salınımı üzerinde pozitif etkiye sahipken, tirozin fosforilasyon bölgelerinin A mutantlarında bu farkın anlamlılığı kaybolmaktaydı. PKA fosforilasyon motiflerinin D mutantlarında ise, TNFR1 salınımında bir azalma söz konusuydu. T417D mutantında, TNF- α muamelesi, TNFR1 salınımında bir artışa değil, azalmaya neden oluyordu. Benzer bir şekilde, T411D/T417D mutantında da TNF- α muamelesi sonucunda reseptör salınımı artmamaktaydı (Şekil 4.50/Tablo 4.5 ve Şekil 4.50/Tablo 4.6).

5. TARTIŞMA

TNF- α 'nın fizyolojik etkilerinin çoğundan sorumlu olan reseptörü TNFR1'in, ekstraselüler kısmında dört adet sistein zengin bölge (CRD) (Chen ve ark., 1995), sitoplazmik kısmında ise 309-319. aminoasitler arasında nötral spingomyelinaz aktivasyon bölgesi (Adam ve ark., 1996) ve 356-441. aminoasitler arasında ölüm bölgesi (DD) (Tartaglia ve ark., 1993a) bulunur. TNFR1'in apoptoz indüksiyonunda, NF- κ B aktivasyonunda, MAPK'leri aktive etmesinde, kısacası ana sinyal yollarında DD bölgesi rol oynamaktadır (Boone ve ark., 1998) (Hsu ve ark., 1995). TNFR1'in TNF- α ile bağlanması sonucunda NF- κ B ve kaspaz aktivasyonuna yol açan ana sinyal kompleksleri bilinmektedir, fakat TNFR1 aracılığıyla MAPK'lerin, Akt'nin ve Stat proteinlerinin aktivasyon mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. TNFR1 sinyal iletiminin TNFR1'e bağlanan proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarından nasıl etkilendiğine dair birçok çalışma yapılmış olduğu halde, TNFR1'in post-translasyonel modifikasyonlarının TNF- α sinyal iletimini nasıl etkilediğine dair bilgilerimiz kısıtlıdır. TNFR1'in bilinen ERK aracılığıyla fosforilasyonu, TNFR1 aracılı apoptoz indüksiyonunda baskılayıcı bir etkiye sahiptir (Cottin ve ark., 1999; Cottin ve ark., 2001). Bunun yanı sıra, T hücrelerinde, TNFR1'in IKK β aracılı S381 fosforilasyonu gösterilmiş ve bu fosforilasyonun TNFR1-TRADD etkileşiminde rol aldığı iddia edilmiş fakat aynı fosforilasyon B hücrelerinde tespit edilememiştir (Guan ve ark., 2011). TNFR1 ile c-Src ve JAK2 gibi tirozin kinazlar arasındaki fiziksel etkileşimin gösterilmiş olması (Pincheira ve ark., 2008), bize TNFR1'in tirozin fosforilasyonuna uğruyor olabileceğini düşündürdü. TNFR1 sitoplazmik bölgesinin aminoasit dizilimine baktığımızda, TNFR1 sinyal iletiminin ana sorumlusu olan DD bölgesinde iki adet potansiyel tirozin fosforilasyon bölgesi (Y360 ve Y401) saptadık. Benzer şekilde, DD üzerinde, TNFR1 karboksil ucuna daha yakın yerleşik (T411 ve T417) iki adet de potansiyel PKA fosforilasyon motifi bulunduğunu belirledik. Dolayısıyla, TNFR1'in hem tirozin fosforilasyonuna, hem de PKA fosforilasyonuna uğrayabileceğini, tirozin fosforilasyonun SH2 bölgesi barındıran proteinler için bağlanma bölgesi oluşturarak Akt ve ERK gibi yolların aktivasyonu

için pozitif sinyal oluştururken, PKA fosforilasyonunun tirozin fosforilasyonunu inhibe edici yönde etki göstereceğini öngördük (**Şekil 5.2**).

TNFR1'in tirozin fosforilasyonuna uğrayıp uğramadığını belirleyebilmek için, yabancıl tip TNFR1'in aşırı ekspresyonunu sağladığımız hücreleri farklı süreler boyunca TNF- α ile muamele ettiğimizde, TNFR1'in 30 dakika TNF- α muamelesinden sonra tirozin fosforilasyonuna uğradığını ve bu fosforilasyonun 90.dakikada hafif bir şekilde baskılanmasına rağmen 2 saat boyunca korunduğunu belirledik. TNFR1 fosforilasyonundan sorumlu tirozin kinazı belirleyebilmek adına, TNFR1 ile arasındaki fiziksel etkileşimin TNF- α muamelesi ile kuvvetlendiğini doğruladığımız JAK2 için *in vitro* kinaz reaksiyonu kurduk. *In vitro* ortamda, JAK2'nin TNFR1'i fosforile ettiğini ve bu fosforilasyonun JAK2 inhibitörü AZD1480'in olduğu ortamda engellendiğini belirledik. Dolayısıyla, TNFR1'in tirozin fosforilasyonuna uğradığını ve bu fosforilasyondan sorumlu tirozin kinazın JAK2 olduğunu tespit ettik.

TNFR1 DD'i üzerindeki PKA fosforilasyon motiflerinin gerçekten TNFR1 ve PKA arasında bir etkileşim sağlayıp sağlamadığını belirlemek için TNF- α muamelesi yapılmış ya da yapılmamış hücrelerden TNFR1 ve PKA proteinlerini çöktürüp, bunları PKA ve TNFR1 antikoları ile işaretledik. TNF- α olmayan ortamda da TNFR1'e bağlanıp TNF- α muamelesi ile bağlanma etkinliği artan JAK2'den farklı olarak, PKA'nın TNFR1'e TNF- α bağımlı bir şekilde bağlandığını tespit ettik. PKA aktivatörü forskolin, TNF- α bulunan ortamda TNFR1-PKA arasındaki etkileşimi kuvvetlendirse de, TNF- α 'nın olmadığı ortamda PKA'nın TNFR1'e bağlanmasını sağlayamadığı için; TNFR1 ve PKA arasındaki TNF- α bağımlı etkileşimin TNF- α aracılığıyla oluşan PKA aktivasyonundan değil, ligand bağlanması sonucunda TNFR1'in yapısında oluşması muhtemel konformasyonel değişiklikten kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. TNFR1'in PKA tarafından fosforile edilip edilmediğini belirlemek için TNF- α muamelesi yapılmış ya da yapılmamış hücrelerden çöktürdüğümüz TNFR1 proteini ile PKA katalitik alt ünitesi arasında *in vitro* kinaz reaksiyonu kurduğumuzda, TNF- α bağlı reseptörün PKA tarafından fosforile edildiğini, PKA inhibitörü PKI varlığında ise bu fosforilasyonun engellendiğini belirledik.

Hipotezimiz, PKA tarafından fosforilasyonun, TNFR1 tirozin fosforilasyonu üzerinde inhibitör bir etkisi olabileceği yönündeydi. Bunu test edebilmek için öncelikle yabancı tip TNFR1'in aşırı ekspresyonunun sağlandığı hücrelerde TNFR1 tirozin fosforilasyonunun forskolin varlığından nasıl etkilendiğini araştırdık. Forskolin muamelesinin, TNF- α muamelesi olmayan ortamda TNFR1'in bazal tirozin fosforilasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını, TNF- α muamelesi sonucunda ise Forskolin varlığının TNFR1 tirozin fosforilasyonunu tamamen baskıladığını belirledik. Bu veriler, TNF- α muamelesi olmadığı takdirde TNFR1 ve PKA arasında etkileşim olmadığını yönündeki önceki verilerimizle örtüşmekte ve TNFR1 ve aktif PKA arasındaki etkileşimin, TNFR1 tirozin fosforilasyonunu baskıladığını düşündürmektedir. Nitekim, potansiyel PKA fosforilasyon motiflerinin fosforile edilemez A ve fosforilasyonu taklit edebileceğini düşündüğümüz D mutantlarının tirozin fosforilasyon kapasitelerini incelediğimizde, T417 noktasının D mutantının, TNF- α muamelesi sonucu tirozin fosforilasyonuna uğramadığını, bazal tirozin fosforilasyon seviyesinin de azaldığını belirledik. Dolayısıyla, T417 noktasının PKA tarafından fosforilasyonu, TNFR1'in TNF- α ile bağlanması sonucunda gerçekleşen tirozin fosforilasyonunu baskılamaktadır. Motif taraması yaparak belirlediğimiz iki potansiyel PKA fosforilasyon motifinden, T417'nin mass spektrometrik analizlerle fosforilasyonu gösterildiği halde, T411'in fosforilasyonuna dair bir veri mevcut değildir (Hornbeck ve ark., 2015). Dolayısıyla, T411D ve T411D/T417D mutantlarımız, T417'nin fosforilasyonunu taklit ettiğini varsaydığımız T417D mutantının aksine, fizyolojik bir olayı taklit etmek yerine tamamen yapay bir değişikliğe yol açıyor olabilir.

Tirozin fosforilasyonunun ve PKA fosforilasyonunun TNFR1 aracılı sinyal iletimine etkilerini belirlemek adına, Y360, Y401, T411 ve T417 aminoasitlerini, hedeflendirilmiş mutasyonla fosforile edilemez A ve fosforilasyonu taklit edebileceğini düşündüğümüz D aminoasitlerine dönüştürüp, bunlarla 293T hücrelerini transfekte edip, bu hücrelerdeki TNF- α indüklü sinyal yollarının aktivasyon seviyelerini yabancı tip TNFR1 plazmidi ile transfekte edilmiş olan hücrelerdekiyle kıyasladık. Öncelikli olarak mutasyona uğratılmış plazmidlerimizin ve yabancı tip TNFR1 kodlayan plazmidin yol açtığı TNFR1 ekspresyon seviyelerini incelediğimizde, yabancı tip TNFR1'in boş plazmidle transfekte edilmiş hücrelerdekinin 25 katından daha fazla TNFR1 (p55-60)

ekspresyonuna yol açtığını belirledik. Dolayısıyla, transfeksiyon sonucu endojen TNFR1 ekspresyonununun %4 civarında, yani göz ardı edilebilir olduğunu düşünerek deney sonuçlarımızı yorumladık. Aslında bütün plazmidlerimizin TNFR1 aşırı ekspresyonuna yol açtığını, fakat Y360A, Y360A/Y401A, Y360D, Y401D ve Y360D/Y401D mutantlarının kırılıma uğradığını belirledik. Bu kırılım oranları, TNFR1 shedding datalarımızla paralel olmadığı ve kullandığımız antikor TNFR1'in 30-301 aminoasitleri arası bölgeyi tanıdığı için, bu kırılımın TACE aracılı kırılımdan farklı olduğunu düşünüyoruz. Yakın zamanda, TNFR1'in TACE aracılı kırılımını takiben, γ -Sekretaz tarafından da kırılarak 25kD'lik intraselüler fragment oluşturduğu gösterilmiştir (Chhibber-Goel ve ark., 2016). Bu kırılım bandının boyutu bizim gözlemlediğimiz bantlardan birinin boyutuyla uyumlu olsa da, kırılım bantlarının ekstraselüler ortama salınan TNFR1 miktarı ile orantılı olmaması, gözlemlediğimiz durumu bu mekanizma ile açıklamamızı zorlaştırmaktadır. Y401D mutantında oluşan REAQD-S motifi, NADPH oksidaz'ın kaspaz aracılı kırılımında tanınan motif olduğu için (Kumar ve ark., 2014), TNFR1 de TNF- α muamelesini takiben oluşan tirozin fosforilasyonu sebebiyle kaspaz aracılı kırılıma uğruyor olabilir. Diğer mutantlarda ise bilinen bir kaspaz kırılım bölgesi oluşmamaktadır. Transfeksiyonun 24 ve 48. Saatinde toplanan lizatlardan yaptığımız TNFR1 işaretlemesi, p55-60 bandının üzerinde, poliubikütinasyon bantlarına benzer, modifikasyonu işaret eden bantlar göstermektedir. Tirozin aminoasitlerinin değiştirilmesi, TNFR1'in çoklu post-translasyonel modifikasyonlara uğrayarak degrade olmasına yol açıyor olabilir. Bu mutantlarda gözlediğimiz farklı sinyal profilleri, bu kırılan parçaların sinyal iletiyor olmasından kaynaklanıyor olabileceği gibi, ektopik gen ekspresyonu yapılmamış 293T hücrelerine göre hâlâ 2-3 kat yüksek eksprese ettikleri p55 TNFR1'e bağlı da olabilir. Tirozin modifikasyonu sonucunda reseptör kırılımının γ -sekretaz inhibitörü, kaspaz inhibitörleri ve proteozom inhibitörü varlığında incelenmesi, kırılımın müsebbini açığa çıkarabilir. Müsebbib antikorun varlığında sinyal profillerinin değişip değişmediğinin incelenmesi de, kırılan TNFR1 parçalarının kendi başlarına sinyal iletip iletemedikleri sorusunu cevaplayabilir.

TNFR1 aşırı ekspresyonu hücre içi protein ekspresyon profilini değiştirebildiği için; ERK, p38, JNK, Akt, Stat3 ve CREB yolak aktivasyonlarını western blot ile incelerken, bu proteinlerin aktivasyon fosforilasyonuna uğramış formlarının bant

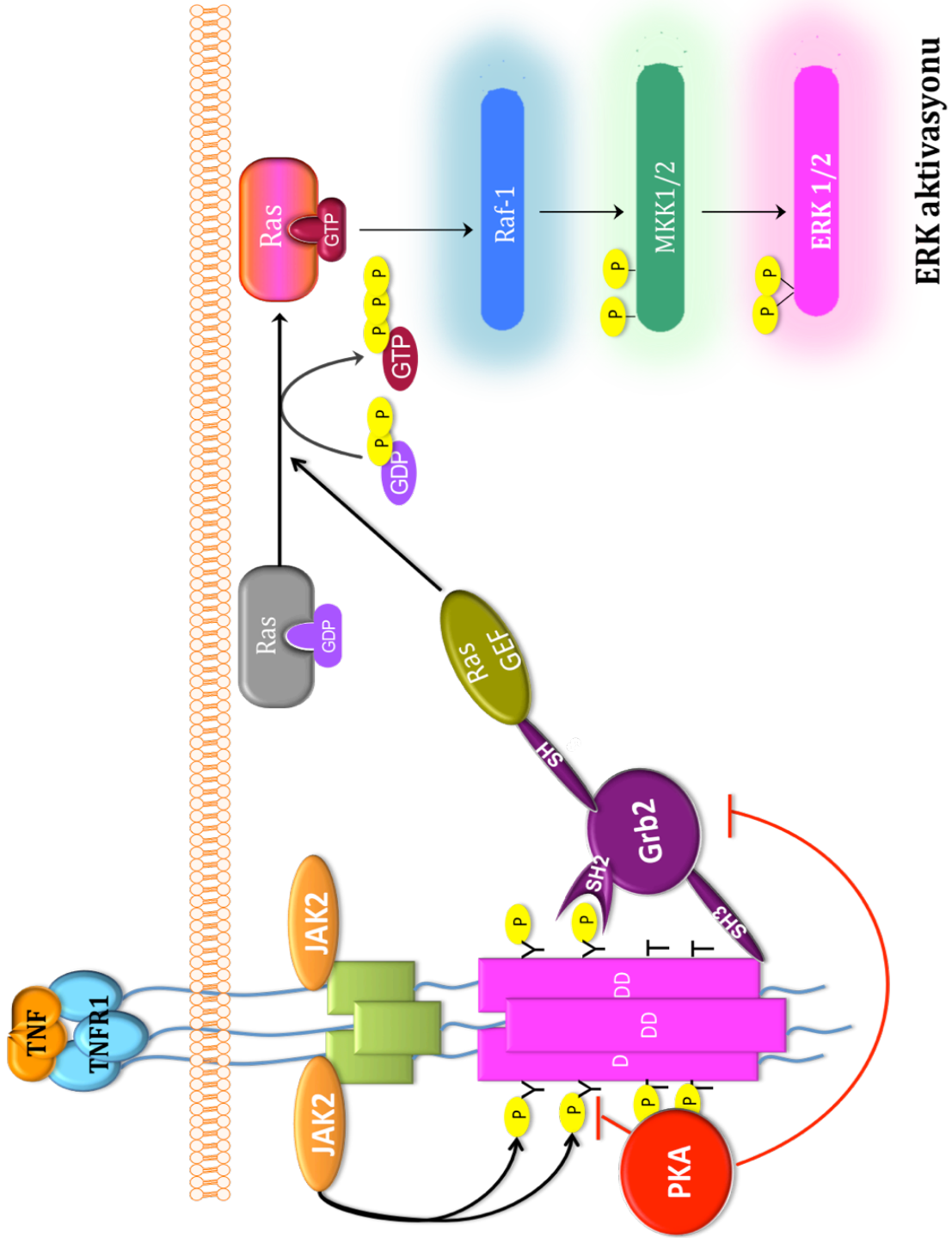
intensitelerini, GAPDH gibi bir demirbaş protein yerine, bu proteinlerin fosforile olan ve olmayan formlarını tanıyabilen antikorları ile yapılmış işaretlemelemlerden elde edilen bant intensitelerine oranladık. Bu yolakların TNF- α aracılı aktivasyon kinetiğini belirlemek için yaptığımız time-course deneylerini, transfeksiyon yapılmamış hücrelerden alınan lizatlarla gerçekleştirdik. Time-course deneylerimiz sonucunda, MAPK'lerin (ERK, JNK, p38) ve CREB'in aktivasyonlarının 15 dakika TNF- α muamelesi ile, Stat3 ve Akt'nin aktivasyonunun ise 30 dakika TNF- α muamelesi ile maksimum seviyeye ulaştığını belirledik. TNFR1 aşırı ekspresyonu yaptığımız örneklerde, time-course deneylerinde TNF- α varlığı ve yokluğu arasında gözlemlediğimiz kadar belirgin bir fark gözlemlemedik. Bu da bize, reseptör aşırı ekspresyonunun TNF- α yokluğunda dahi ligand varmış gibi bir etki uyandırdığını, bu nedenle mutantlarımızı boş plazmidle transfekte edilmiş hücrelerden ziyade yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilmiş hücrelerle kıyaslamamız gerektiğini düşündürdü.

TNFR1 aracılı ERK aktivasyonunu incelediğimizde, hipotezimizle uyumlu bir şekilde, Y401 noktasının A ile değiştirilmesinin ERK aktivasyonunu baskıladığını, D ile değiştirilmesinde ise TNF- α muamelesine gereksinim olmaksızın ERK aktivasyonunun gerçekleştiğini belirledik. Aynı zamanda Y401D mutanı, Grb2 adaptör protein bağlantısının da en kuvvetli gözlemlendiği reseptördü. İlginç bir şekilde, Y360D mutasyonu ERK aktivasyonunu negatif etkiliyorken, Grb2 bağlantısını negatif etkilemiyordu. Y360A mutanında ise Grb2 bağlantısı yabancı tip vektör kadar, ERK aktivasyonu artmaktaydı. Y360A ve Y360D verileri göz önüne alındığında, Y360 fosforilasyonunun, ERK de-aktivasyonuna yol açacak bir fosfatazın bağlanması için bölge teşkil ettiği düşünülebilir. Diğer yandan da, Y360 fosforilasyonu Y360A mutanı ile engellendiğinde, Y401'in fosforilasyonu için kolaylık sağlanıyor olabilir.

TNFR1 PKA fosforilasyon mutanı T417D, hipotezimizle uyumlu bir şekilde, azalmış Grb2 bağlantısı ve azalmış ERK aktivasyonuna, T417A ise hafif bir şekilde artmış Grb2 bağlantısı ve ERK aktivasyonuna yol açmaktaydı. ERK aktivasyon verilerimiz toplu bir şekilde göz önüne alındığında, TNFR1 Y401 noktasının fosforilasyonunun ERK aktivasyonunda pozitif, Y360 ve T417 noktalarının fosforilasyonununsa negatif rol aldığı görülmektedir. T417 noktasının TNFR1 tirozin

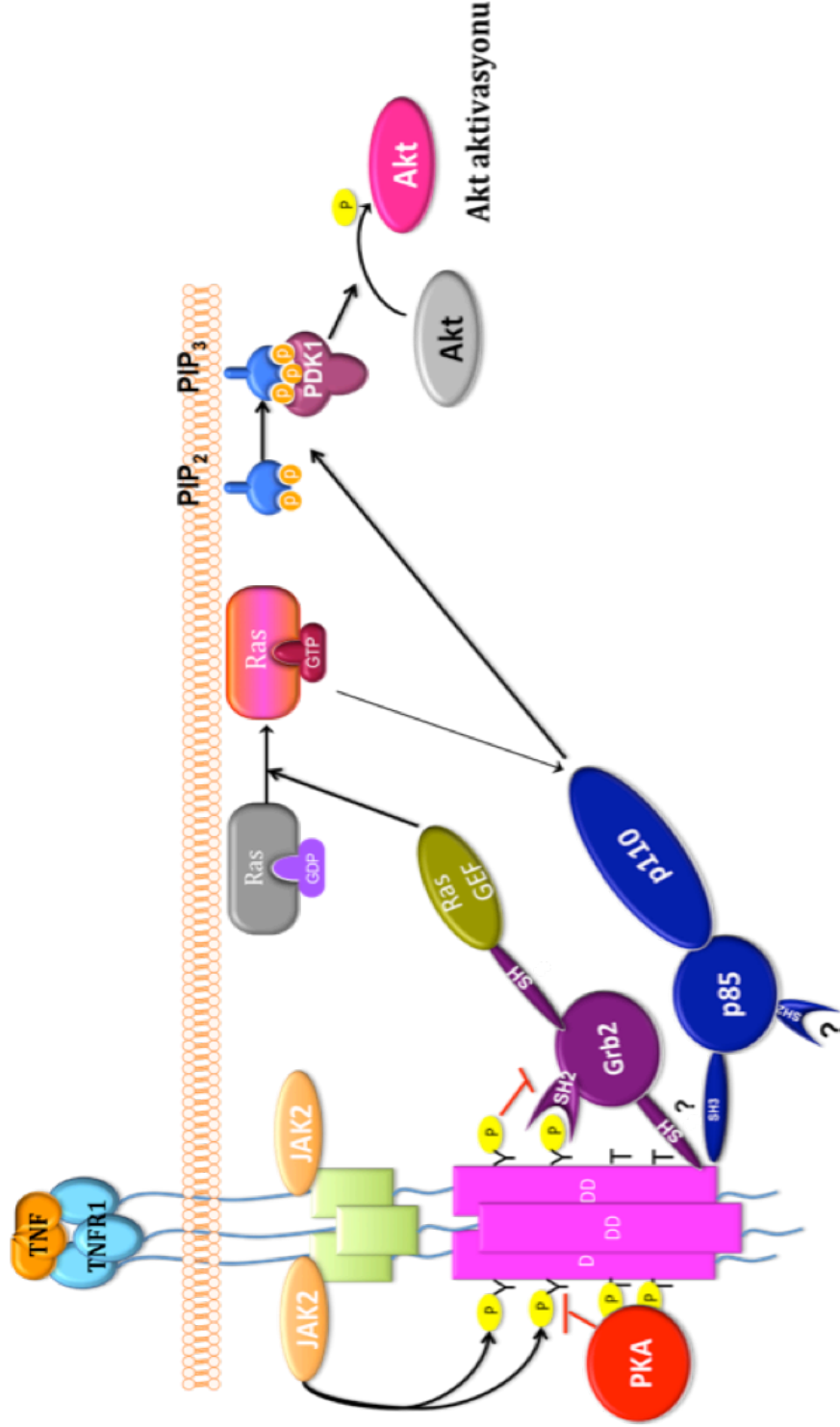
fosforilasyonunu baskıladığı göz önüne alındığında, bu beklendik bir sonuçtur (**Şekil 5.1**).

TNFR1 tirozin fosforilasyonu Grb2 bağlantısını kuvvetlendirirken, tirozin fosforilasyon motiflerinin A mutasyonu ile ortadan kaldırılması Grb2 bağlantısını azaltmakta fakat tamamen ortadan kaldırmamaktadır. Bu nedenle, TNFR1 ölüm bölgesi üzerindeki fosfo-tirozinlerin Grb2'nin SH2 bölgesi için bağlanma alanı oluşturabileceğini, fakat Grb2-TNFR1 interaksiyonunun tek yönünün pY-SH2 bağlantısı olmadığını, TNFR1 üzerindeki SH3 bağlanma bölgesinin de Grb2 ile bağlantı kurulmasında rol oynuyor olabileceğini düşünüyoruz (**Şekil 5.2**). Öte yandan, literatürde TNFR1-MADD etkileşiminin TNFR1-Grb2 etkileşiminde aracı görevi gördüğüne dair verilerin bulunması, TNFR1 tirozin fosforilasyonunun TNFR1-MADD etkileşimini etkiliyor olabileceğini de düşündürmektedir (Kurada ve ark., 2009). İlginç bir şekilde, TNFR1 sinyalzomunda Grb2'nin yer alabilmesi için MADD'ın gerekli olduğunu siRNA ile gösteren bu yayında, MADD varlığında dahi 50ng/ml TNF- α ile 2 dakika muamele edilen HeLa hücrelerinde oluşan kompleks, TNF- α muamelesinin 4. dakikasında ortadan kalkmaktadır. Bizim çalışmamızda ise, biz 293T hücrelerinde, 10ng/ml TNF- α ile 30 dakika boyunca muamele sonrasında dahi Grb2-TNFR1 bağlantısı görebilmekteyiz.



Şekil 5.1: TNFR1 fosforilasyonlarının TNFR1 aracılı ERK aktivasyonuna etkisinin şematik gösterimi. Y401 noktasının tirozin fosforilasyonu, hem Grb2 bağlanmasını, hem de ERK aktivasyon fosforilasyonunu pozitif etkilerken, Y360 ve T417 fosforilasyonu, negatif etki göstermektedir.

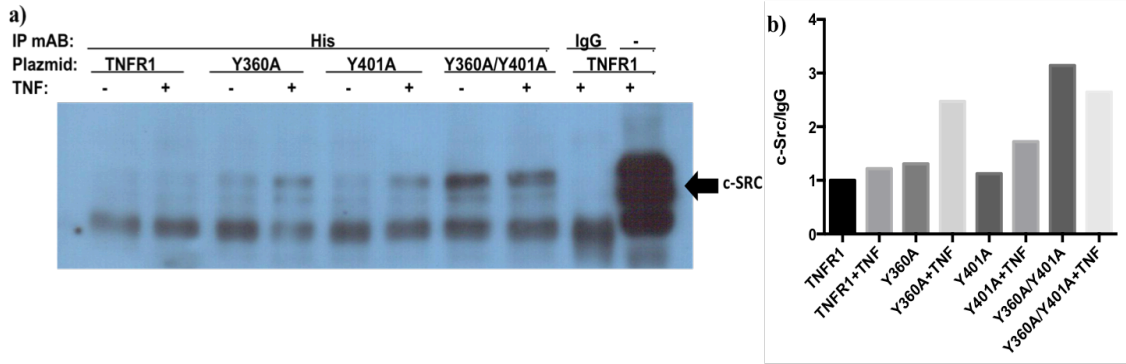
TNFR1 mutantlarının Akt aktivasyon seviyesine olan etkileri, ERK aktivasyon seviyelerine olan etkileriyle benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik, Akt ve ERK aktivasyon yollarının çakıştığını düşündürülebilir. Her ne kadar ERK aktivasyonunda rol alan MADD'ın Akt tarafından fosforilasyonunun TRAIL reseptörü DR4'e bağlanabilmesi için gerektiği gösterilmişse de (Li ve ark., 2010), TNF- α aracılı ERK aktivasyonunun Akt aktivasyonundan daha erken dönemde gerçekleşiyor olması, iki yolak arasındaki çakışma noktasının MADD olamayacağını düşündürmektedir. TNFR1 üzerinde p85'in direkt bağlanmasını sağlayacak YxxM motifi olmadığı halde, TNFR1 sinyal iletim kompleksinin içerisinde hem Grb2 hem de PI3K p85 alt ünitesinin bulunması, p85'in TNFR1'e Grb2-Ras aracılığıyla bağlandığını düşündürülebilir. TNF- α muamelesinin 30. dakikasında farklı TNFR1 mutantlarının sinyal iletim kompleksinde tespit ettiğimiz p85 ve Grb2 oranları tam bir paralellik göstermese de, Y360 ve Y401'in D mutantları, her iki proteinin bağlanma etkinliğini de arttırmaktadır. PKA bölge mutantları ile elde ettiğimiz Grb2 ve p85 bağlanma miktarları ise, oldukça farklıdır. p85, SH2 bölgesi ile kompleks içerisindeki başka bir proteine bağlanırken, SH3 bölgesi ile de TNFR1'e bağlanıyor olabilir (**Şekil 5.2**). Yine de, TNFR1 kompleksi içerisindeki p85'in doğrudan TNFR1'e mi yoksa kompleks içerisindeki Grb2'ye mi bağlandığının anlaşılabilmesi için, Grb2'nin susturulması ile p85 bağlantısının nasıl etkilendiği araştırılmalıdır.



Şekil 5.2: TNFR1 aracılı Akt Aktivasyonunun TNFR1 fosforilasyonları tarafından muhtemel düzenlenme mekanizmasının şematik gösterimi. TNFR1 sinyal iletim kompleksinde p85 bulunduğu halde TNFR1 üzerinde bu proteinin bağlanabileceği bir YxxM motifinin olmaması, p85'in SH2 bölgesi ile başka bir proteine bağlandığını düşündürmektedir. TNFR1 C-terminalinde yer alan bölge, p85'in SH3 aracılı bağlanmasını sağlayabilir. Akt aktivasyonunun TNFR1 tirozin fosforilasyonu ile pozitif regülasyonu, Grb2 aracılı olabilir.

TNF- α aracılı p38 ve JNK aktivasyonlarının TNFR1 fosforilasyonlarından nasıl etkilendiğini incelediğimizde, Y360A mutantında TNF- α muamelesi olmaksızın yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilmiş hücrelerde 15 dakika TNF- α muamelesine cevaben oluşan p38 fosforilasyonunun üç katı kadar bir p38 fosforilasyonu gözlemledik. Benzer bir şekilde, Y401A mutantında da TNF- α muamelesi yapılmaksızın yüksek p38 fosforilasyonu gözlemlenmekteydi. Her iki mutantla transfekte edilen hücrelerde, TNF- α muamelesi p38 fosforilasyonunda artış yerine azalmaya yol açmıştır. Y360A/Y401A mutantında ise, p38 fosforilasyon seviyesi yabancı tip vektörle transfekte hücrelerde gözlenen bazal p38 fosforilasyonu seviyesinde olup, TNF- α muamelesi p38 fosforilasyonunda bir artışa yol açmamıştı. İlginç bir şekilde, Y360D ve Y401D mutantlarında da TNF- α muamelesi yapılmadan da yabancı tip TNFR1 aşırı ekspresyonu yapan hücrelerin TNF- α muamelesi sonucunda edindiğine benzer oranda p38 fosforilasyonu gözlemlenmekte, TNF- α muamelesi A mutantlarındaki gibi p38 fosforilasyonunda anlamlı bir değişikliğe yol açmamaktaydı. Y360D/Y401D mutantında ise, Y360A/Y401A mutantının aksine, çok yüksek p38 fosforilasyonu gözlemlenmekte, TNF- α muamelesi sonucundaysa p38 fosforilasyonu düşüş göstermekteydi. Boş plazmidle transfekte edilmiş ya da TNFR1 aşırı ekspresyonu yapılmış hücrelerde TNF- α muamelesi p38 aktivasyonuna yol açarken, Y360A, Y401A ve Y360D/Y401D mutantlarının aşırı ekspresyonunun sağlandığı hücrelerde TNF- α muamelesi olmaksızın çok yüksek seyreden p38 fosforilasyonunun TNF- α muamelesi sonucunda düşmesi, bu hücrelerde p38'i defosforile eden mekanizmaların yabancı tip TNFR1'e göre TNF- α muamelesinin çok daha erken döneminde devreye girdiğini düşündürülebilir. Y360A ve Y401A mutantlarında, bir diğer MAPK olan JNK'in da bazal aktivasyonu yabancı tip TNFR1'e göre daha yüksek olduğu halde, bu mutantlarla transfekte hücrelerde TNF- α muamelesi azalışa değil artışa neden olmuştur. Dolayısıyla, bu mutantlarda MKK3/6 ve MKK4/7'nin aktivasyonuna yol açan mekanizmalar TNF- α muamelesi olmadan aktive olduğu halde, JNK'in değil fakat p38'in defosforilasyonuna yol açan bir fosfatazın TNF- α ile 15 dakika muamele sonrasında aktive olduğu düşünülebilir. Bu minvalde, MKP-1 (Guo ve ark., 1998b; Mendelson ve ark., 1996) gibi fosfatazların aktivasyonunun Y360A ve Y401A mutantlarınca nasıl etkilendiğinin araştırılması fayda sağlayabilir. Bazal p38 ve JNK aktivasyonunu arttıran Y360A ve Y401A mutantlarında, bazal NF- κ B

aktivitesinin artmış değil, bilakis azalmış olması, bu mutantların JNK ve p38 aktivasyonunu indükleme yollarının TAK ya da TRAF2 aracılı olmadığını düşündürmektedir. Tez çalışmamız dışında yapmış olduğumuz deneyler sonucunda, Y360A ve Y401A mutantlarının, TNF- α muamelesi olmayan ortamda, Src tirozin kinaz ailesine, yabancı tip TNFR1'in TNF- α muamelesi sonrasında bağlandığından daha kuvvetli bir şekilde bağlanmakta olduğunu biliyoruz (Şekil 5.3). Dolayısıyla, bu mutantların JNK ve p38 aktivasyonunda kullandığı yolak, c-Src aracılı MLK2 ve MLK3 aktivasyon yolağı olabilir.



Şekil 5.3: TNFR1 tirozin fosforilasyonunun engellenmesinin Src bağlanmasına etkisi. TNF- α muamelesi olmaksızın ya da 30 dakika 10ng/ml TNF- α muamelesinin ardından toplanmış olan lisatlerden His probe antikorunu ile ektopik eksprese ettirilmiş reseptör formları çöktürülüp, örnekler c-Src antikorunu ile western blot'a tabi tutuldu. Bağlanan c-Src miktarları, c-Src bant intensitesinin IgG bant intensitesine bölünüp, yabancı tip TNFR1'in bazal bağlantısı 1 kabul edilerek normalize edildi.

TNFR1 üzerindeki potansiyel PKA fosforilasyon noktalarının A mutantları, TNF- α muamelesi sonucunda sadece p38 aktivasyonunda değil, p38 protein miktarında da değişime yol açmıştır. TNFR1 T417D ve T411D/T417D mutantlarında, bazal p38 aktivasyonunda artış gözlenmiş, fakat Y360A ve Y401A mutantları gibi, bu mutantlarda da 15 dakika TNF- α muamelesi sonrasında p38 aktivasyonu baskılanmıştır. Dolayısıyla, TNFR1 tirozin fosforilasyonunun tirozin aminoasitlerinin alanin'e çevrilmesiyle ya da TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyonu ile engellenmesi, bazal p38 aktivasyonunda artışa, TNF- α muamelesi sonucundaysa p38 defosforilasyonuna neden olmaktadır. T411D ve T417D mutantlarında, bazal JNK fosforilasyonunun yabancı tip TNFR1'e nazaran artmış olduğu gözlenmiştir. Bu mutantları eksprese eden hücrelerde, TNF- α muamelesi sonrasında JNK fosforilasyon seviyesi bir miktar yükselmiş, fakat yabancı tip

TNFR1 ile transfekte hücrelerin TNF- α muamelesi sonrasında edindiği JNK fosforilasyon seviyesinin üzerine çıkmamıştır.

TNFR1 aracılı JNK aktivasyon verilerini değerlendirirken, yabancı tip ya da mutant TNFR1 ile transfekte edilmiş hücrelerde, pJNK işaretlemesi sırasında p46 ve p54'ün yanı sıra, yaklaşık 50kD civarında bir fosforile JNK bandı daha olduğunu gözlemledik. Bu bant, TNFR1 transfeksiyonu yapılmamış hücrelerde 45 dakika TNF- α muamelesi sonucunda silik bir şekilde ortaya çıkmakta fakat sonra kaybolmakta iken, TNFR1 aşırı ekspresyonu yapılan bütün hücrelerde gözlemlenmekte; fakat JNK antikoru ile tanınmamaktadır. Bu bandın TNFR1 mutantlarının TNF- α muamelesi sonucunda artış azalmaması, diğer MAPK'ler p38 ve ERK'ün paternine benzememektedir. JNK1 ve JNK2'yi tanıyan antikor tarafından tanınmayıp pJNK antikoruna tarafından tanınan bu protein, 293T hücrelerinde normalde çok düşük ekspresyon gösterip, uzun süre TNF- α maruziyeti sonucunda kuvvetli bir şekilde fosforilasyona uğrayan bir JNK izoformu olabilir. Nitekim benzer bir bant, iskemik şoka maruz bırakılmış kardiyak miyositlerinde (Hreniuk ve ark., 2001), uzun süre aktinomisin-D ile beraber TNF- α 'ya maruz bırakılmış hepatositlerde (Schlatter ve ark., 2011) de gözlemlenmiştir. Bu fosfo-protein, moleküler ağırlığı 49kD civarında olan JNK3, JNK1 α 2 veya JNK2 β 2 olabilir (UniProt, 2015). Üç fosforilasyon bandının da JNK bantları olduğunu düşünerek TNFR1 mutantlarının JNK fosforilasyonlarına olan etkilerini incelediğimizde, özellikle Y360A ve T417D mutantlarında bazal JNK fosforilasyonunun yabancı tip TNFR1'e göre bariz bir artış gösterdiğini, TNF- α muamelesinden sonra ise Y360A, T411D ve T417D mutantlarının yabancı tip TNFR1'in TNF- α muamelesi ile edindiğine benzer bir JNK fosforilasyon seviyesi kazandığını, diğer bütün mutantların TNF- α muamelesi sonrası yol açtığı JNK fosforilasyonunun yabancı tip TNFR1'den daha düşük kaldığını gözlemledik. Tirozin fosforilasyon bölgelerinin A mutantlarında JNK fosforilasyonunun yüksek seyrederken D mutantlarında azalmış olması ve PKA fosforilasyon motiflerinde yüksek seyretmesi, TNFR1 tirozin fosforilasyonunun kısa süreli JNK aktivasyonu için baskılayıcı bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Özellikle Y401D ve Y360D/Y401D mutantlarında, pJNK1 ve pJNK2 bantlarının neredeyse tamamen yok olmuş olması, bu düşüncüyü destekler niteliktedir.

TNFR1 Y360 ve Y401 mutantlarının aşırı ekspresyonunun, bazal ve 30 dakika TNF- α muamelesi sonrasında yol açtığı CREB fosforilasyon seviyelerine baktığımızda, hem A mutantlarında, hem de D mutantlarında bazal CREB fosforilasyonunun arttığını, TNF- α muamelesinin A mutantlarında CREB fosforilasyonunda ekstra bir artışa yol açmazken, D mutantlarında CREB fosforilasyonunu arttırdığını gözlemledik. Y360D/Y401D mutantında ise bazal CREB fosforilasyonunun azaldığını, TNF- α muamelesi sonrasında ise yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerin TNF- α muamelesi sonucunda edindiği CREB fosforilasyon seviyesine çıktığı gözlemlenmiştir. Y360D/Y401D mutanti dışındaki sonuçlar, beklendildiği üzere (Ono ve ark., 2004), p38 aktivasyon profilleri ile paralellik göstermektedir. PKA fosforilasyon bölgelerine baktığımızda ise, T411A mutantında bazal CREB fosforilasyonunun baskılanıp TNF- α muamelesi ile yabancı tip TNFR1'in TNF- α muamelesi sonucunda edindiği CREB fosforilasyonunun üzerine çıktığını; T411D mutantında ise bazal CREB fosforilasyonunun arttığı gözlenmektedir. Tirozin mutantlarının aksine, PKA mutantlarının CREB fosforilasyon seviyesinde yol açtığı değişiklikler, p38 sonuçları ile paralellik göstermemektedir. Dolayısıyla T411D mutanti, p38 aracılı değil, PKA aracılı CREB fosforilasyonuna yol açıyor olabilir (Delghandi ve ark., 2005). TNFR1'in PKA aktivasyonunda rol oynayabileceği bilindiği için, bu mutantın TNF- α aracılı PKA aktivasyonunda artışa yol açıp açmadığı, daha sonraki çalışmalarda sorgulanabilir.

TNFR1 post-translasyonel modifikasyonlarının Stat3 ile ilişkisini, Stat3'ün Y705 fosforilasyonu, TNFR1 sinyal komplekslerinde Stat3 bulunuşu ve Stat3 DNA bağlanma etkinliği açısından inceledik. İlginç bir şekilde, Stat3 DNA bağlanma etkinliğinin T411D/T417D mutanti haricindeki bütün mutantlarımızda arttığını gözlemledik. TNFR1 sinyal kompleksinde Stat3 bulunuşu ise, Y360A, Y360A/Y401A, Y401D, Y360D/Y401D ve T411D mutantlarında yabancı tip TNFR1'e göre daha yüksek; diğer mutantlarımızda ise daha düşük bulundu. Y360A, T411A, T411A/T417A, T417D ve T411D/T417D mutantlarında TNF- α muamelesi sinyal kompleksinde Stat3 bulunuşunu kuvvetlendirmişken; Y401A, Y360A/Y401A, Y401D, Y360D/Y401D, T417A ve T411D mutantlarında zayıflatmıştı. Y360A ve Y360D/Y401D mutanti dışındaki mutantlarda, TNF- α muamelesi ile Stat3'ün TNFR1 sinyalzomunda bulunuşunun artması ya da azalması, Stat3'ün DNA bağlanma etkinliğindeki artış ya da azalışla

benzer gözlemlendi. Stat3 tirozin fosforilasyonu ise, Y360A mutantında TNF- α muamelesinden etkilenmezken, yabancı tip TNFR1, Y401A, T417A, T411D, T417D ve T411D/T417D reseptörlerini eksprese eden hücrelerde TNF- α muamelesi sonucunda artmış; Y360A/Y401A, Y360D, Y401D, Y360D/Y401D, T411A, T411A/T417A mutantlarında ise TNF- α muamelesi sonucunda azalmıştı. TNFR1 mutantlarının bazal koşullardaki Stat3 bağlanma etkinliklerine baktığımızda, Y360A/Y401A, Y401D, Y360D/Y401D ve T411D mutantlarında oldukça yüksek; Y360D, T411A ve T417A mutantlarında ise düşük olduğunu belirledik. Stat3'ün TNFR1'e kuvvetli bağlandığı mutantlarda Stat3'ün DNA'ya bağlanma etkinliği yabancı tip TNFR1'e göre daha kuvvetli bulunmuşken, Stat3 Y705 fosforilasyonunda artış gözlenmemiştir. Bunun nedeni, TNFR1 sinyal iletim kompleksinde bulunan SHP-1 ve SHP-2 gibi fosfatazlar ya da Stat3'ün S727 fosforilasyonu olabilir (Wakahara ve ark., 2012). Nitekim, TNFR1 yolağı ile aktive olan JNK (Zhang ve ark., 2001), ERK(Sakaguchi ve ark., 2012), p38 (Riebe ve ark., 2011) ve mTOR gibi (Yokogami ve ark., 2000) birçok farklı S/T kinazın S727 fosforilasyonuna neden olabildiği gösterilmiştir. Çalıştığımız örneklerde, Stat3 Y705 fosforilasyon oranlarıyla Stat3'ün DNA'ya bağlanma etkinliğinin orantılı olmaması; Stat3 S727 fosforilasyonunun, Stat3'ün tirozin fosforilasyonunu engellediği halde, nükleer lokalizasyonunu ve DNA bağlanma etkinliğini engellememesinden (Hazan-Halevy ve ark., 2010; Wen and Darnell, 1997) ve Stat3'ün fosforile olmadan da DNA'ya bağlanabilmesinden (Timofeeva ve ark., 2012; Yang ve ark., 2007) kaynaklanıyor olabilir.

TNF- α aracılı TNFR1 sinyal iletiminin önemli fizyolojik etkilerinden biri de IRS-1'in insülin indüklü tirozin fosforilasyonunu engelleyerek yol açtığı insülin dirençliliğidir (Liang ve ark., 2008). Bu nedenle, TNFR1 mutantlarının TNF- α aracılı insülin dirençliliğine olan etkilerini belirleyebilmek için, yabancı tip ya da mutant TNFR1 plazmidleri ile transfekte edilmiş hücreleri, TNF- α muamelesi olmadan ya da 8 saat 10ng/ml TNF- α muamelesinden sonra 5 dakika 100ng/ml insülin ile muamele edip; bu hücrelerden topladığımız lizatlarda IRS-1 tirozin fosforilasyon seviyelerini inceledik. TNFR1 Y360A mutantında IRS-1 tirozin fosforilasyon seviyesi yabancı tip TNFR1 ile eşitken, Y401A ve Y360A/Y401A mutantlarında IRS-1 tirozin fosforilasyonunun artmış, Y360D, Y401D mutantlarında azalmış, Y360D/Y401D mutantında ise neredeyse

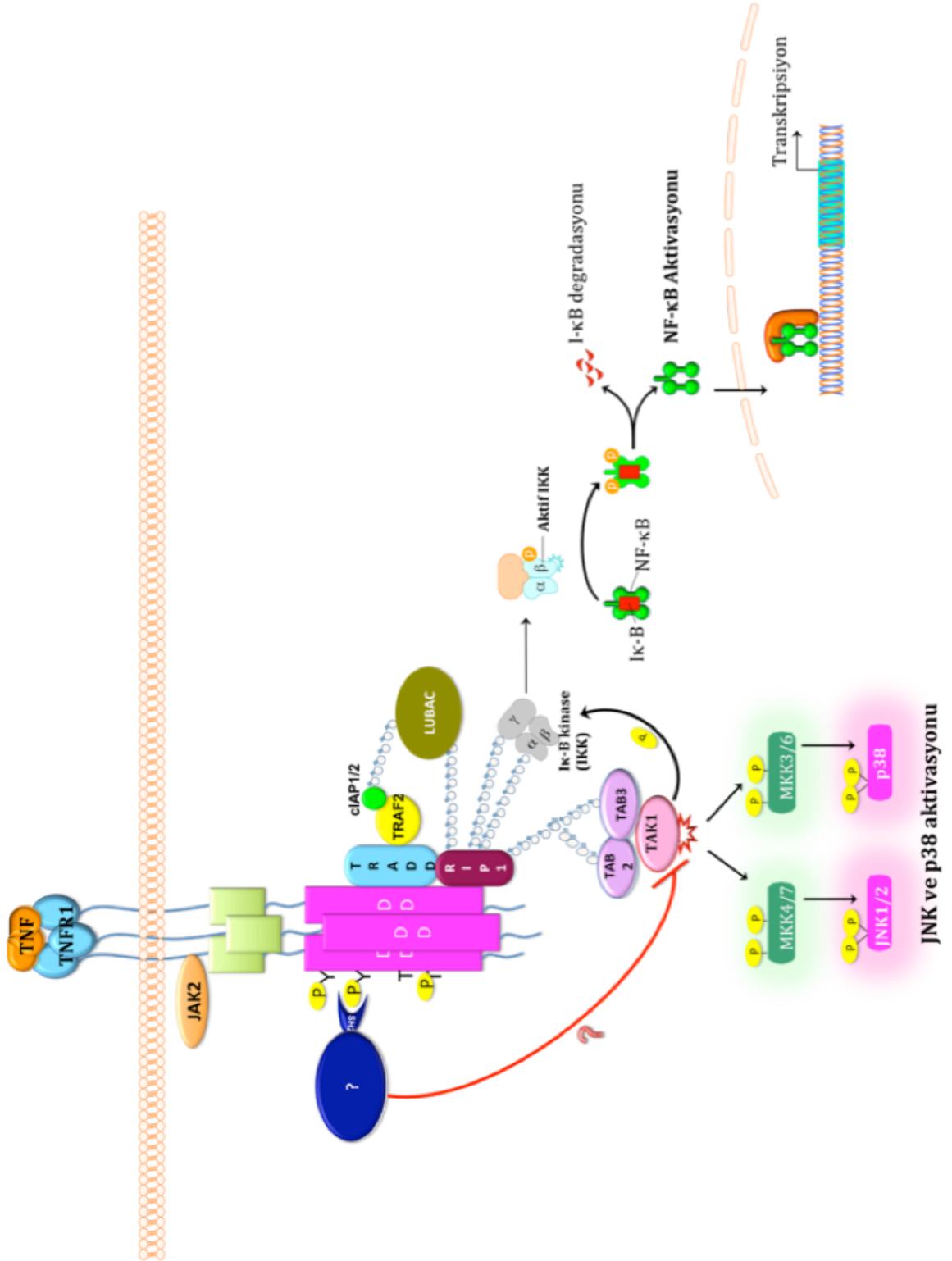
tamamen yok olmuş olduğunu gözlemledik. TNFR1 tirozin fosforilasyonu, IRS-1 tirozin fosforilasyonunu negatif yönde etkiliyor görünmektedir. Y401A mutantında artmış gördüğümüz IRS-1 tirozin fosforilasyonu, 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada bahsedilen fakat verisi gösterilmemiş olan Y401F mutasyonuna uğratılmış TNFR1'in, yabancı tip TNFR1'e göre azalmış SOCS-3 bağlama kapasitesi ile uyumludur (Guan ve ark., 2011). Nitekim SOCS-3'ün, IRS-1 tirozin fosforilasyonunu engellemek yönündeki fonksiyonu bilinmektedir (Shi ve ark., 2004). TNFR1 PKA mutantlarını incelediğimizde ise, T411D ve T417D mutantlarında azalmış, T417A mutantında bazal koşullarda artmış, T411A/T417A mutantında ise TNF- α muamelesi sonrasında artmış IRS-1 tirozin fosforilasyonu gözlemledik. Her ne kadar TNFR1'in T417D mutanı TNFR1 tirozin fosforilasyonunu negatif, T417A mutanı ise pozitif yönde etkiliyor olsa da, T417D mutantında azalmış, T417A mutantında ise artmış IRS-1 tirozin fosforilasyonu gözlemliyoruz. Öte yandan, T417A mutantında azalmış, T417D mutantında ise artmış gözlediğimiz p38 fosforilasyonu, bu mutantların IRS-1 tirozin fosforilasyonu üzerindeki etkilerini açıklayabilir. Öte yandan, Y360A mutantında p38, Akt, JNK ve ERK yolları bazal koşullarda yabancı tip TNFR1'e nazaran daha aktif olduğu halde, Y360A mutantının IRS-1 tirozin fosforilasyonunu engellemek yönünde bir etkisi olduğunu gözlemlemedik. Bu beklediğimiz bir sonuç olmasa da (Lee ve ark., 2003; Ozes ve ark., 2001), Y360A mutantının transfekte edildiği hücrelerde, TNF- α muamelesinin p38 ve Akt aktivasyonundan ziyade, bazal koşullara nazaran baskılanması, IRS-1 tirozin fosforilasyonunda baskılanma görmememizi açıklayabilir.

TNFR1'in en önemli sinyal iletim yollarından biri olan NF- κ B indüksiyonu, bazal koşullarda TNFR1 aşırı ekspresyonundan pozitif etkilenmekte, TNF- α muamelesi sonucunda ise boş plazmidle transfekte edilmiş ve TNFR1 vektörü ile transfekte edilmiş 293T hücrelerindeki NF- κ B aktivasyon seviyeleri arasındaki fark kaybolmaktadır. Öte yandan TNFR1 aşırı ekspresyonu, kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonuna sebep olmakta, hücre sağkalımında düşüşe yol açmakta (MTT sonucu) ve TNF- α muamelesi sonucu hücre sağ kalımı daha da düşmektedir. Dolayısıyla, 10ng/ml TNF- α muamelesi sonucunda indüklenen NF- κ B miktarının hücredeki TNFR1 miktarından bağımsız olduğu, TNFR1 aşırı ekspresyonu yapan hücrelerin TNF- α aracılı ölüme daha duyarlı olduğu görülmektedir. Literatürde mevcut çalışmalarda, TNFR1 aracılı Kompleks-2a

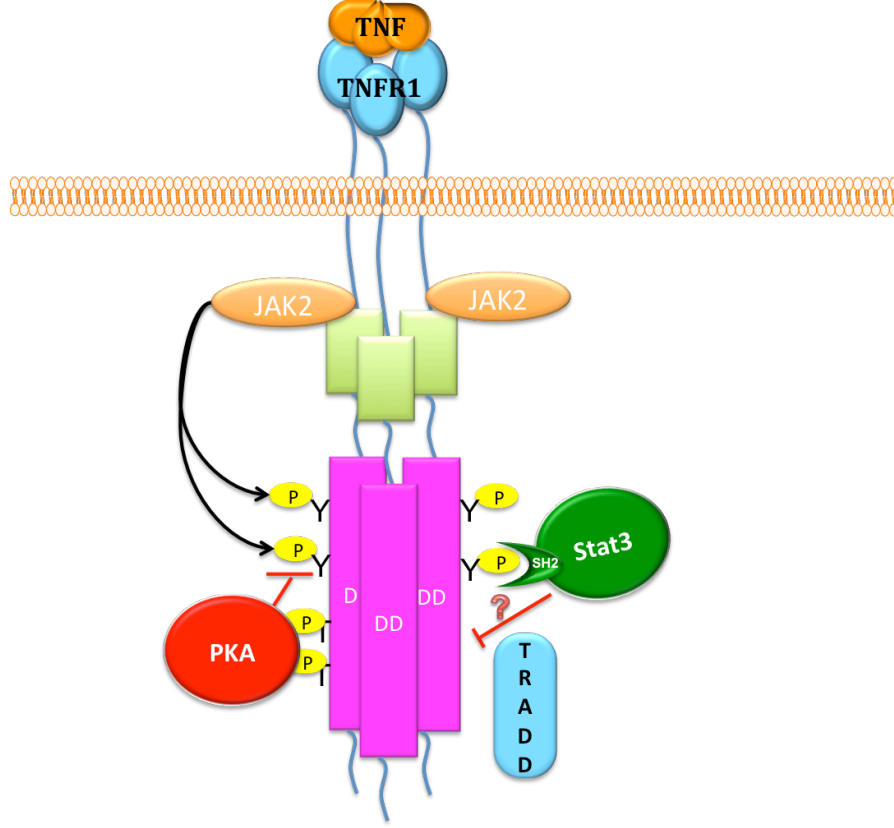
oluşumunun indüklenmesi için aktinomisin D ya da sikloheksimid gibi ajanlar veya RIP1 deplesyonu; TNFR1 aracılı Kompleks-2b oluşumunun indüklenmesi için cIAP1/2'yi ortadan kaldıran SMAC mimetikleri, ya da TAK1 inhibisyonu; nekroptozun indüklenmesi içinse Kompleks-2b oluşumunu sağlayan koşulların yanı sıra pan-kaspaz inhibitörleri kullanılmıştır (Conrad ve ark., 2016). Bizse çalışmamızda TNFR1 post-translasyonel modifikasyonlarının etkisini incelerken fizyolojik koşulları etkilememeye gayret sarf ettiğimiz için, kaspaz aktivasyon deneylerimizde ya da hücre proliferasyon deneylerinde TNF- α haricinde herhangi bir ajan kullanmadık. Bu nedenle, 24 saat 10ng/ml TNF- α muamelesi ile çok dramatik bir kaspaz aktivasyonu gözlemedik. Yabanıl tip ya da mutant TNFR1 aşırı ekspresyonu gerçekleştirilmeyen 293T hücrelerinde, TNF- α 'nın oluşturduğu kaspaz aktivasyonununsa, muhtemelen yine TNF- α aracılığıyla aktivasyonu gerçekleştirilen proliferatif yollarla dengelenerek, hücre sağkalımında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığını belirledik.

TNFR1 aracılı NF- κ B aktivasyonunu, promotorunda NF- κ B bağlanma bölgesi bulunan lusiferaz reporter plazmidler aracılığıyla değerlendirdik. Transfeksiyonu gerçekleştirilen plazmidlerle beraber transfekte ettiğimiz NF-luc plazmidi sayesinde, hücreler, NF- κ B aktivasyon seviyesi ile doğru orantılı lusiferaz aktivitesi kazanırlar. NF- κ B aktivasyonunun I κ B degradasyonu gibi başlangıç aşamalarından ziyade, final aşamasını, yani gen indüklenme kapasitesini incelememizin amaçlarımıza daha uygun olduğunu düşündük. TNFR1 tirozin mutantlarının NF- κ B'yi aktive etme potansiyellerini değerlendirdiğimizde, Y401A dışındaki bütün mutantların bazal NF- κ B aktivitesini kaybettiğini, Y401A'daki bazal NF- κ B aktivasyonunun ise yabanıl tip TNFR1'den düşük, fakat boş plazmidle transfekte edilmiş hücrelerden yüksek olduğunu belirledik. TNF- α indüklü NF- κ B aktivitesi, Y360A, Y360A/Y401A, Y360D ve Y401D mutantlarında yabanıl tip TNFR1'e göre istatistiksel anlamlılık derecesinde düşük bulundu. Özellikle Y360D ve Y401D mutantlarında TNF- α indüklü NF- κ B aktivitesi yarı yarıya düşmüştü. Y401A mutantında TNF- α indüklü NF- κ B aktivitesi yabanıl tip TNFR1'e göre yüksek görünse de, bu sonuç anlamlı bulunmadı. Kaspaz aktivasyonu ise, Y360D mutantında bazal durumda yabanıl tip TNFR1 ile benzerlik gösterse de, bütün mutantların TNF- α -indüklü kaspaz 8 ve kaspaz 3 aktivasyon seviyeleri yabanıl tip TNFR1'e göre düşük bulunmuştur. Hücre sağ kalımı ise, dışarıdan TNF- α

verilmediğinde Y401A mutantında yabancı tipe göre farklılık göstermezken, Y401D mutantında anlamlı şekilde azalmıştı. Y360A, Y360A/Y401A, Y360D ve Y360D/Y401D mutantlarında ise, TNF- α muamelesi yapılmadan gözlenen hücre sağkalımı, yabancı tip TNFR1'den yüksek gözlenmiştir. 24 saat TNF- α muamelesinin sonrasında, Y360A ve Y401A eksprese eden hücrelerin sağ kalımı yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerle benzer seviyede; Y401D eksprese eden hücrelerin sağ kalımı yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücrelerden düşük; Y360A/Y401A, Y360D ve Y360D/Y401D transfekte hücrelerin sağ kalımı ise yabancı tip TNFR1 ile transfekte edilmiş hücrelerden yüksek bulunmuştur. Hücre sağ kalımını hem TNF- α muamelesi sonucunda hem de TNF- α muamelesi yapılmaksızın ciddi bir şekilde azaltan Y401D mutantının, kaspaz aktivasyonunu, NF- κ B aktivasyonunu ve JNK fosforilasyonunu en düşük gösteren reseptör formu olması bu mutantın TNFR1 kompleksine TAK1'in katılmasını ya da TAK1 aktivasyonunu engelliyor olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 5.4a). TAK1 aktivasyonunun engellenmesi durumunda TNF- α 'nın nekroptozu indüklemesinden dolayı, TAK1 aktivasyonunun engelleniyor olması durumu, bu mutantta Akt ve ERK yolları yabancı tip TNFR1'e göre daha aktif olduğu ve kaspaz aktivasyonu düşük olduğu halde hücre sağ kalımının azalmış olmasını da açıklayabilir. Y401D mutantı, aynı zamanda Stat3'e de en kuvvetli bağlanan mutanttı. Stat protein ailesinin bir diğer üyesi Stat1'in, TNFR1 sinyal iletim kompleksinde TNFR1 ve TRADD'a bağlanıp, TRADD'ın RIP1 ve FADD ile etkileşimini engellediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2000). Stat3'ün de TNFR1 sinyal iletim kompleksinde Stat1 ile benzer fonksiyon görmesi, Y401D mutantında gördüğümüz durumu açıklayabilir. Y401D mutantına kuvvetli bir şekilde bağlanan Stat3, TRADD-RIP1 bağlantısını engelleyerek Kompleks 1'in, TRADD-FADD bağlantısını engelleyerek Kompleks 2a'nın kurulmasını önüyor; bu sayede de azalmış kaspaz aktivasyonu ve azalmış NF- κ B indüksiyonu gözleniyor olabilir (Şekil 5.5).



Şekil 5.4: TNFR1 tirozin fosforilasyonu, TAK1 aktivasyonunu engelliyor olabilir.



Şekil 5.5: TNFR1 kompleksine Stat3'ün bağlanması, TRADD bağlanmasını engelliyor olabilir.

PKA bölge mutantlarına baktığımızda, bazal koşullarda T411A/T417A ve T411D mutantlarının NF- κ B indüksiyon kapasitesi yabancı tip TNFR1'den farklı değilken; T411A mutantında artmış; T417A, T417D ve T411D/T417D mutantlarında azalmış olduğunu gözlemliyoruz. TNF- α muamelesinden sonra ise, T417A ve T417D mutantlarının NF- κ B indüksiyon seviyesi yabancı tipten düşükken, T411A mutantının NF- κ B indüksiyon seviyesinin yabancı tipe göre artmış olduğunu görüyoruz. Kaspaz3 ve Kaspaz8 aktivasyon seviyeleri, T411A/T417A, T411D, T417D ve T411D/T417D mutantlarında azalmışken; hücre sağkalımı T411D/T417D mutantı haricindeki bütün PKA bölge mutantlarında yabancı tip TNFR1'e göre yüksek bulunmuştur. 24 saat TNF- α muamelesinden sonra ise, hücre sağkalımı T411A/T417A, T411D ve T417D transfekte hücrelerde yabancı tip TNFR1 ile transfekte hücelere nazaran daha yüksek gözlenmiştir.

TNFR1'in tirozin fosforilasyonu ve PKA tarafından fosforilasyonunun TNFR1 sinyal kompleksine etkilerini incelerken, His-probe antikoru ya da TNFR1 antikoru ile indirdiğimiz örneklerde TRADD ve RIP1 işaretlemesi de gerçekleştirdik; fakat

değerlendirilebilecek bir bantlama paterni gözlemedik. Daha önce HEK293 hücrelerinde, TNFR1 ile beraber TRADD ve RIP1 transfeksiyonu yapılmadığı takdirde TNFR1-RIP ve TNFR1-TRADD bağlantısı gösterilememiş, her üç protein birden transfekte edildiğinde gösterilebilmiştir (Hsu ve ark., 1996a). Bu çalışmanın dışında da, RIP1 ve TRADD'ın ektopik ekspresyonu sağlatılmadan HEK293 ve 293T hücrelerinde TNFR1-TRADD ya da TNFR1-RIP bağlantısını gösterebilen herhangi bir yayın yoktur. Biz de, hücre lizatında hatırı sayılır miktarda RIP1 ve TRADD gözlemlediğimiz halde, TNFR1 proteinlerine bağlanmayı yeterince etkin bulmadık. Bunun nedeni, TRADD, RIP1 ve TNFR1'i içeren Kompleks 1'in TritonX-100-insoluble lipid raflarda oluşması (Legler ve ark., 2003) olabilir. TNFR1'in TRADD ve RIP1 ile bağlantısı lipid-raftlarla kısıtlı olmakla beraber, plazma membranındaki TNFR1 tamamen farklı bir kompleks kuruyor gibi görünmektedir. Bu tez çalışması sonucunda, plazma membran sinyal kompleksinde JAK2, PKA, Stat3, p85 ve Grb2'nin bulunduğunu belirlemiş olduk.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- TNFR1, JAK2 ile TNF- α olmayan ortamda da bağlanabilmekte, TNF- α muamelesi sonrasında iki protein arasında kuvvetlenen fiziksel etkileşim, TNFR1'in tirozin fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır
- TNFR1, TNF- α bağımlı bir şekilde PKA ile fiziksel etkileşime girmekte ve bu durum TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyonuna neden olmaktadır.
- TNFR1'in PKA tarafından fosforilasyonu, TNFR1'in tirozin fosforilasyonunu baskılamaktadır.
- TNFR1 Y360 ve Y401 aminoasitlerindeki değişiklikler, TNFR1 degradasyonuna yol açmaktadır.
- TNFR1'in Y401'den tirozin fosforilasyonu Grb2 bağlantısını ve ERK aktivasyonunu kuvvetlendirmekte, Y360'dan fosforilasyonu ise tam tersi etki yapmaktadır. TNFR1'in T417'den fosforilasyonu, ERK aktivasyonunu hafif bir şekilde baskılamaktadır.
- TNFR1'in Y360 ve Y401'den fosforilasyonu p85 bağlantısı ve Akt aktivasyonunu arttırmaktadır. TNFR1'in T417'den fosforilasyonu p85 bağlanması ve Akt aktivasyonunu etkilemese de; T417 fosforilasyonunun engellenmesi Akt aktivasyonunda artışa yol açmaktadır.
- TNFR1'in Y360A, Y360D/Y401D, T417D ve T411D/T417D mutantlarında TNF- α muamelesi olmayan ortamda artmış gözlenen p38 aktivasyonu; TNF- α muamelesi ile normal seviyelere çekilmiştir.
- JNK aktivasyonu, Y360A ve T417D mutantlarında yüksek gözlenmiştir.
- Stat3 tirozin fosforilasyonu, T401A mutantında TNF- α muamelesi yapılan; Y401D mutantında ise TNF- α muamelesi yapılmayan koşullarda yüksek gözlenmiştir. Y401D mutantında TNF- α muamelesi, Stat3 tirozin defosforilasyonuna yol açmış görünmektedir. Bu gözlem, Stat3'ün Y401D mutantına TNF- α muamelesi yapılmayan ortamda kuvvetli bir şekilde bağlanması, TNF- α muamelesi yapıldığında ise ayrılması ile uyumludur. TNF- α bağılı olmayan reseptörün Y401'den fosforilasyonu Stat3 bağlanması için bir zemin oluştururken, ligandın reseptöre bağlanması ile değişen konformasyon, bu

bölgeye SH2 bölgesi içeren bir fosfatazın bağlanması için zemin oluşturuyor olabilir.

- IRS-1 tirozin fosforilasyonu, TNFR1 tirozin fosforilasyonundan da, PKA fosforilasyonundan da negatif etkilenmektedir.
- TNFR1'in PKA fosforilasyonunun CREB aktivasyonu ve IRS-1 tirozin fosforilasyonu üzerine olan etkileri, PKA fosforilasyonunun tek fonksiyonunun tirozin fosforilasyonunu baskılamak olmadığını düşündürmektedir.
- TNF- α muamelesi olmayan bazal koşullarda NF- κ B indüksiyonu, bütün tirozin mutantlarında baskılanmıştır. Sadece Y401A mutantında mock transfekte 293T hücrelerinden yüksek bazal NF- κ B indüksiyonu görüyor olmamız, TNFR1 vektörlerinin bu modifikasyonlar sonucunda degradasyonu ile paralel olabilir. Benzer bir şekilde, bütün tirozin mutantları kaspaz aktivasyon kapasitlerinde azalma göstermiştir.
- Hücre sağkalımı, Y401D mutantını eksprese eden hücrelerde bariz bir şekilde azalmış, T411D ve T417D mutantlarını eksprese eden hücrelerde ise artmıştır. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 aktivasyonu, T411D ve T417D mutantlarında azalmıştır.
- TNFR1'in hücre dışına salınımı, TNFR1'in PKA fosforilasyon mutantlarında azalmakta, Y401D mutantında ise artmaktadır.
- TNFR1 fosforilasyonlarının TNF- α aracılı sinyal iletiminde oluşturduğu farklı etkilerden dolayı, TNFR1 sinyal kompleksinin içerisindeki fosfatazların araştırılması TNF- α sinyal iletiminin tam olarak aydınlatılmasında fayda sağlayacaktır.
- TNFR1 modifikasyonlarının lipid raft'larda yerleşik TNFR1 kompleksini nasıl etkilediğinin araştırılması, TNFR1 aracılı NF- κ B aktivasyonu, apoptosis ve nekroptosis sinyalleşmesinin TNFR1 fosforilasyonlarından etkilenip etkilenmediğinin anlaşılmasında fayda sağlayabilir.

KAYNAKLAR

Adam, D., Ruff, A., Strelow, A., Wiegmann, K., Kronke, M. Induction of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases by the p55 tumour necrosis factor receptor does not require sphingomyelinases. *The Biochemical journal*. 1998; 333 (Pt 2), 343-350.

Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A., Kronke, M. A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271, 14617-14622.

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., Kronke, M. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*. 1996; 86, 937-947.

Adam-Klages, S., Schwandner, R., Adam, D., Kreder, D., Bernardo, K., Kronke, M. Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *Journal of leukocyte biology*. 1998; 63, 678-682.

Adrain, C., Creagh, E.M., Martin, S.J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO journal*. 2001; 20, 6627-6636.

Aggarwal, B.B., Eessalu, T.E., Hass, P.E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*. 1985a; 318, 665-667.

Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E., Moffat, B., Spencer, S.A., Henzel, W.J., Bringman, T.S., Nedwin, G.E., Goeddel, D.V., Harkins, R.N. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry*. 1985b; 260, 2345-2354.

Aggarwal, B.B., Moffat, B., Harkins, R.N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *The Journal of biological chemistry*. 1984; 259, 686-691.

Aggarwal, B.B., Traquina, P.R., Eessalu, T.E. Modulation of receptors and cytotoxic response of tumor necrosis factor-alpha by various lectins. *The Journal of biological chemistry*. 1986; 261, 13652-13656.

Aizawa, S., Nakano, H., Ishida, T., Horie, R., Nagai, M., Ito, K., Yagita, H., Okumura, K., Inoue, J., Watanabe, T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 2042-2045.

Alasbahi, R.H., Melzig, M.F. Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Die Pharmazie*. 2012; 67, 5-13.

Algire, G.H., Legallais, F.Y., Anderson, B.F. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. V. The role of hypotension in the action of a bacterial polysaccharide on tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1952; 12, 1279-1295.

Aluvila, S., Mandal, T., Hustedt, E., Fajer, P., Choe, J.Y., Oh, K.J. Organization of the mitochondrial apoptotic BAK pore: oligomerization of the BAK homodimers. *The Journal of biological chemistry*. 2014; 289, 2537-2551.

Alvarez, S.E., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Allegood, J., Strub, G.M., Kim, E.Y., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*. 2010; 465, 1084-1088.

Amar, S., Van Dyke, T.E., Eugster, H.P., Schultze, N., Koebel, P., Bluethmann, H. Tumor necrosis factor (TNF)-induced cutaneous necrosis is mediated by TNF receptor 1. *Journal of inflammation*. 1995; 47, 180-189.

Aoki, T., Fukuda, M., Nishimura, M., Nozaki, K., Narumiya, S. Critical role of TNF- α -TNFR1 signaling in intracranial aneurysm formation. *Acta neuropathologica communications*. 2014; 2, 34.

Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., Ting, J.P. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature neuroscience*. 2001; 4, 1116-1122.

Badiola, N., Malagelada, C., Llecha, N., Hidalgo, J., Comella, J.X., Sabria, J., Rodriguez-Alvarez, J. Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. *Neurobiology of disease*. 2009; 35, 438-447.

Baglioni, C., McCandless, S., Tavernier, J., Fiers, W. Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptors on HeLa and lymphoblastoid cells sensitive to growth inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 1985; 260, 13395-13397.

Baker, E., Chen, L.Z., Smith, C.A., Callen, D.F., Goodwin, R., Sutherland, G.R. Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes. *Cytogenetics and cell genetics*. 1991; 57, 117-118.

Barnhart, B.C., Peter, M.E. The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell*. 2003; 114, 148-150.

Beinke, S., Robinson, M.J., Hugunin, M., Ley, S.C. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Molecular and cellular biology*. 2004; 24, 9658-9667.

Belka, C., Wiegmann, K., Adam, D., Holland, R., Neuloh, M., Herrmann, F., Kronke, M., Brach, M.A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha activates c-raf-1 kinase via the p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelinase. *The EMBO journal*. 1995; 14, 1156-1165.

Bertrand, M.J., Milutinovic, S., Dickson, K.M., Ho, W.C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J.W., Jaquith, J.B., Morris, S.J., Barker, P.A. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular cell*. 2008; 30, 689-700.

Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C.E., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*. 1985; 316, 552-554.

Beyaert, R., Kidd, V.J., Cornelis, S., Van de Craen, M., Denecker, G., Lahti, J.M., Gururajan, R., Vandenabeele, P., Fiers, W. Cleavage of PITSLRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 11694-11697.

Bhattacharjee, R., Xiang, W., Wang, Y., Zhang, X., Billiar, T.R. cAMP prevents TNF-induced apoptosis through inhibiting DISC complex formation in rat hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012; 423, 85-90.

Bieler, G., Hasmim, M., Monnier, Y., Imaizumi, N., Ameyar, M., Bamat, J., Ponsonnet, L., Chouaib, S., Grell, M., Goodman, S.L., Lejeune, F., Ruegg, C. Distinctive role of integrin-mediated adhesion in TNF-induced PKB/Akt and NF-kappaB activation and endothelial cell survival. *Oncogene*. 2007; 26, 5722-5732.

Bjornberg, F., Lantz, M., Olsson, I., Gullberg, U. Mechanisms involved in the processing of the p55 and the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptors to soluble receptor forms. *Lymphokine and cytokine research*. 1994; 13, 203-211.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997; 385, 729-733.

Bogoyevitch, M.A., Court, N.W. Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cellular signalling*. 2004; 16, 1345-1354.

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85, 803-815.

Bonizzi, G., Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*. 2004; 25, 280-288.

Boone, E., Vandevoorde, V., De Wilde, G., Haegeman, G. Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and p38 MAPK by tumor necrosis factor (TNF) is mediated through the death domain of the 55-kDa TNF receptor. *FEBS letters*. 1998; 441, 275-280.

Boutaffala, L., Bertrand, M.J., Remouchamps, C., Seleznik, G., Reisinger, F., Janas, M., Benezech, C., Fernandes, M.T., Marchetti, S., Mair, F., Ganef, C., Hupalowska, A., Ricci, J.E., Becher, B., Piette, J., Knolle, P., Caamano, J., Vandenabeele, P., Heikenwalder, M., Dejardin, E. NIK promotes tissue destruction independently of the alternative NF-kappaB pathway through TNFR1/RIP1-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2015; 22, 2020-2033.

Brockhaus, M., Schoenfeld, H.J., Schlaeger, E.J., Hunziker, W., Lesslauer, W., Loetscher, H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87, 3127-3131.

Bruns, P. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitr. Klin. Chir.* . 1868; 3, 4.

Burow, M.E., Weldon, C.B., Melnik, L.I., Duong, B.N., Collins-Burow, B.M., Beckman, B.S., McLachlan, J.A. PI3-K/AKT regulation of NF-kappaB signaling events in suppression of TNF-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000; 271, 342-345.

Cabal-Hierro, L., Artime, N., Iglesias, J., Prado, M.A., Ugarte-Gil, L., Casado, P., Fernandez-Garcia, B., Darnay, B.G., Lazo, P.S. A TRAF2 binding independent region of TNFR2 is responsible for TRAF2 depletion and enhancement of cytotoxicity driven by TNFR1. *Oncotarget*. 2014; 5, 224-236.

Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.G., Liu, Z.G. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature cell biology*. 2014; 16, 55-65.

Campbell, J.S., Prichard, L., Schaper, F., Schmitz, J., Stephenson-Famy, A., Rosenfeld, M.E., Argast, G.M., Heinrich, P.C., Fausto, N. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 107, 1285-1292.

Cargnello, M., Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2011; 75, 50-83.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975; 72, 3666-3670.

Chadee, D.N., Kyriakis, J.M. MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation. *Nature cell biology*. 2004; 6, 770-776.

Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000; 288, 2351-2354.

Chen, C., Edelstein, L.C., Gelinas, C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Molecular and cellular biology*. 2000; 20, 2687-2695.

Chen, P.C., DuBois, G.C., Chen, M.J. Mapping the domain(s) critical for the binding of human tumor necrosis factor-alpha to its two receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1995; 270, 2874-2878.

Chen, W., Zhou, Z., Li, L., Zhong, C.Q., Zheng, X., Wu, X., Zhang, Y., Ma, H., Huang, D., Li, W., Xia, Z., Han, J. Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288, 16247-16261.

Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.T., Song, Y., Yang, C., Li, W., Zheng, X., Chen, P., Han, J. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell research*. 2014; 24, 105-121.

Chhibber-Goel, J., Coleman-Vaughan, C., Agrawal, V., Sawhney, N., Hickey, E., Powell, J.C., McCarthy, J.V. gamma-Secretase Activity Is Required for Regulated Intramembrane Proteolysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1 and TNF-mediated Pro-apoptotic Signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2016; 291, 5971-5985.

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., Chan, F.K. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137, 1112-1123.

Coley, W.B. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of surgery*. 1891; 14, 199-220.

Coley, W.B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1910; 3, 1-48.

Conrad, M., Angeli, J.P., Vandenabeele, P., Stockwell, B.R. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*. 2016; 15, 348-366.

Cottin, V., Van Linden, A., Riches, D.W. Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) by p42(mapk/erk2) induces changes in its subcellular localization. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274, 32975-32987.

Cottin, V., Van Linden, A.A., Riches, D.W. Phosphorylation of the tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) recruits Bcl-2 and protects against apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276, 17252-17260.

Crisafulli, C., Galuppo, M., Cuzzocrea, S. Effects of genetic and pharmacological inhibition of TNF-alpha in the regulation of inflammation in macrophages. *Pharmacological research*. 2009; 60, 332-340.

Cuenda, A., Dorow, D.S. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *The Biochemical journal*. 1998; 333 (Pt 1), 11-15.

Cuenda, A., Rousseau, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1773, 1358-1375.

Das, S., Cho, J., Lambertz, I., Kelliher, M.A., Eliopoulos, A.G., Du, K., Tschlis, P.N. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280, 23748-23757.

Delghandi, M.P., Johannessen, M., Moens, U. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cellular signalling*. 2005; 17, 1343-1351.

Depuydt, B., van Loo, G., Vandenamee, P., Declercq, W. Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *Journal of cell science*. 2005; 118, 497-504.

Domonkos, A., Udvardy, A., Laszlo, L., Nagy, T., Duda, E. Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF. *European cytokine network*. 2001; 12, 411-419.

Dondelinger, Y., Aguilera, M.A., Goossens, V., Dubuisson, C., Grootjans, S., Dejardin, E., Vandenamee, P., Bertrand, M.J. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell death and differentiation*. 2013; 20, 1381-1392.

Dondelinger, Y., Jouan-Lanhouet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, P.J., Giansanti, P., Heck, A.J., Dejardin, E., Vandenamee, P., Bertrand, M.J. NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Molecular cell*. 2015; 60, 63-76.

Dopp, J.M., Sarafian, T.A., Spinella, F.M., Kahn, M.A., Shau, H., de Vellis, J. Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochemical research*. 2002; 27, 1535-1542.

Duh, E.J., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S., Rabson, A.B. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86, 5974-5978.

Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., Chen, Z.J. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell*. 2006; 22, 245-257.

Eck, M.J., Sprang, S.R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *The Journal of biological chemistry*. 1989; 264, 17595-17605.

Ehltling, C., Lai, W.S., Schaper, F., Brenndorfer, E.D., Matthes, R.J., Heinrich, P.C., Ludwig, S., Blackshear, P.J., Gaestel, M., Haussinger, D., Bode, J.G. Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *Journal of immunology*. 2007; 178, 2813-2826.

Eissner, G., Kirchner, S., Lindner, H., Kolch, W., Janosch, P., Grell, M., Scheurich, P., Andreesen, R., Holler, E. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *Journal of immunology*. 2000; 164, 6193-6198.

El-Ani, D., Philipchik, I., Stav, H., Levi, M., Zerbib, J., Shainberg, A. Tumor necrosis factor alpha protects heart cultures against hypoxic damage via activation of PKA and phospholamban to prevent calcium overload. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2014; 92, 917-925.

Eliopoulos, A.G., Das, S., Tsihchlis, P.N. The tyrosine kinase Syk regulates TPL2 activation signals. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281, 1371-1380.

Endres, R., Hacker, G., Brosch, I., Pfeffer, K. Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of the silencer of death domains. *Molecular and cellular biology*. 2003; 23, 6609-6617.

Fan, Y., Yu, Y., Shi, Y., Sun, W., Xie, M., Ge, N., Mao, R., Chang, A., Xu, G., Schneider, M.D., Zhang, H., Fu, S., Qin, J., Yang, J. Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285, 5347-5360.

Farias, R., Rousseau, S. The TAK1-->IKKbeta-->TPL2-->MKK1/MKK2 Signaling Cascade Regulates IL-33 Expression in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells Following Infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2015; 3, 87.

Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M.Z., Lunenfeld, B., Karasik, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *The Journal of biological chemistry*. 1993; 268, 26055-26058.

Feng, S., Yang, Y., Mei, Y., Ma, L., Zhu, D.E., Hoti, N., Castanares, M., Wu, M. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular signalling*. 2007; 19, 2056-2067.

Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G., Leverkus, M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular cell*. 2011; 43, 449-463.

Fleming, Y., Armstrong, C.G., Morrice, N., Paterson, A., Goedert, M., Cohen, P. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *The Biochemical journal*. 2000; 352 Pt 1, 145-154.

Fuchs, P., Strehl, S., Dworzak, M., Himmeler, A., Ambros, P.F. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]. *Genomics*. 1992; 13, 219-224.

Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., Ichijo, H. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Molecular and cellular biology*. 2007; 27, 8152-8163.

Fujita, M., Ikegame, S., Harada, E., Ouchi, H., Inoshima, I., Watanabe, K., Yoshida, S., Nakanishi, Y. TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to *Legionella pneumophila*-induced mortality in mice. *Cytokine*. 2008; 44, 298-303.

Garlet, G.P., Cardoso, C.R., Campanelli, A.P., Ferreira, B.R., Avila-Campos, M.J., Cunha, F.Q., Silva, J.S. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clinical and experimental immunology*. 2007; 147, 128-138.

Geering, B., Gurzeler, U., Federzoni, E., Kaufmann, T., Simon, H.U. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood*. 2011; 117, 5953-5962.

Grandjean-Laquerriere, A., Le Naour, R., Gangloff, S.C., Guenounou, M. Differential regulation of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in UVB-irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Cytokine*. 2003; 23, 138-149.

Gray, P.W., Barrett, K., Chantry, D., Turner, M., Feldmann, M. Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990; 87, 7380-7384.

Grech, A.P., Gardam, S., Chan, T., Quinn, R., Gonzales, R., Basten, A., Brink, R. Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280, 31572-31581.

Grell, M., Becke, F.M., Wajant, H., Mannel, D.N., Scheurich, P. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *European journal of immunology*. 1998a; 28, 257-263.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995; 83, 793-802.

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., Scheurich, P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998b; 95, 570-575.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274, 1156-1163.

Guan, Y.J., Zhang, Z., Yu, C., Ma, L., Hu, W., Xu, L., Gao, J.S., Chung, C.S., Wang, L., Yang, Z.F., Fast, L.D., Chung, A.S., Kim, M., Ayala, A., Zhuang, S., Zheng, S., Chin, Y.E. Phospho-SXXE/D motif mediated TNF receptor 1-TRADD death domain complex formation for T cell activation and migration. *Journal of immunology*. 2011; 187, 1289-1297.

Guevara Patino, J.A., Ivanov, V.N., Lacy, E., Elkon, K.B., Marino, M.W., Nikolic-Zugic, J. TNF-alpha is the critical mediator of the cyclic AMP-induced apoptosis of CD8+4+ double-positive thymocytes. *Journal of immunology*. 2000; 164, 1689-1694.

Guo, D., Dunbar, J.D., Yang, C.H., Pfeffer, L.M., Donner, D.B. Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. *Journal of immunology*. 1998a; 160, 2742-2750.

Guo, Y.L., Baysal, K., Kang, B., Yang, L.J., Williamson, J.R. Correlation between sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998b; 273, 4027-4034.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., Davis, R.J. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal*. 1996; 15, 2760-2770.

Gustin, J.A., Pincheira, R., Mayo, L.D., Ozes, O.N., Kessler, K.M., Baerwald, M.R., Korgaonkar, C.K., Donner, D.B. Tumor necrosis factor activates CRE-binding protein through a p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2004; 286, C547-555.

Hazan-Halevy, I., Harris, D., Liu, Z., Liu, J., Li, P., Chen, X., Shanker, S., Ferrajoli, A., Keating, M.J., Estrov, Z. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood*. 2010; 115, 2852-2863.

He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*. 2009; 137, 1100-1111.

Hildt, E., Oess, S. Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I. *The Journal of experimental medicine*. 1999; 189, 1707-1714.

Hirai, S., Katoh, M., Terada, M., Kyriakis, J.M., Zon, L.I., Rana, A., Avruch, J., Ohno, S. MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 15167-15173.

Hohmann, H.P., Remy, R., Brockhaus, M., van Loon, A.P. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *The Journal of biological chemistry*. 1989; 264, 14927-14934.

Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*. 2000; 1, 489-495.

Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., Skrzypek, E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research*. 2015; 43, D512-520.

Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996; 271, 665-668.

Hreniuk, D., Garay, M., Gaarde, W., Monia, B.P., McKay, R.A., Cioffi, C.L. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. *Molecular pharmacology*. 2001; 59, 867-874.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., Goeddel, D.V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996a; 4, 387-396.

Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., Goeddel, D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996b; 84, 299-308.

Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M., Boyle, W.J. ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 13471-13474.

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995; 81, 495-504.

Hu, S., Vincenz, C., Buller, M., Dixit, V.M. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1997a; 272, 9621-9624.

Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., Dixit, V.M. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1997b; 272, 17255-17257.

Hu, W.H., Johnson, H., Shu, H.B. Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275, 10838-10844.

Huai, J., Vogtle, F.N., Jockel, L., Li, Y., Kiefer, T., Ricci, J.E., Borner, C. TNFalpha-induced lysosomal membrane permeability is downstream of MOMP and triggered by caspase-mediated NDUFS1 cleavage and ROS formation. *Journal of cell science*. 2013; 126, 4015-4025.

Huang, D., Zheng, X., Wang, Z.A., Chen, X., He, W.T., Zhang, Y., Xu, J.G., Zhao, H., Shi, W., Wang, X., Zhu, Y., Han, J. MLKL channel in necroptosis is octamer formed by tetramers in a dyadic process. *Molecular and cellular biology*. 2016.

Huang, H., Joazeiro, C.A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J.D., Hunter, T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275, 26661-26664.

Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skanland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A.,

Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J.P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., Dikic, I. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. *Nature*. 2011; 471, 637-641.

Irwin, M.W., Mak, S., Mann, D.L., Qu, R., Penninger, J.M., Yan, A., Dawood, F., Wen, W.H., Shou, Z., Liu, P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999; 99, 1492-1498.

Ishida, T.K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., Inoue, J. TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93, 9437-9442.

Islam, A., Jones, H., Hiroi, T., Lam, J., Zhang, J., Moss, J., Vaughan, M., Levine, S.J. cAMP-dependent protein kinase A (PKA) signaling induces TNFR1 exosome-like vesicle release via anchoring of PKA regulatory subunit RIIbeta to BIG2. *The Journal of biological chemistry*. 2008; 283, 25364-25371.

Itai, T., Tanaka, M., Nagata, S. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001; 268, 2074-2082.

Jacobsen, A.V., Lowes, K.N., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Hildebrand, J.M., Petrie, E.J., van Delft, M.F., Liu, Z., Conos, S.A., Zhang, J.G., Huang, D.C., Silke, J., Lessene, G., Murphy, J.M. HSP90 activity is required for MLKL oligomerisation and membrane translocation and the induction of necroptotic cell death. *Cell death & disease*. 2016; 7, e2051.

Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B., Brasier, A.R. TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cellular signalling*. 2007; 19, 1419-1433.

James, L.P., Kurten, R.C., Lamps, L.W., McCullough, S., Hinson, J.A. Tumour necrosis factor receptor 1 and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity: a kinetic study of proliferating cell nuclear antigen and cytokine expression. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2005; 97, 8-14.

Jiang, X., Wang, X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275, 31199-31203.

Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., Goeddel, D.V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*. 1999; 283, 543-546.

Jin, Z., El-Deiry, W.S. Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26, 8136-8148.

Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L., Chen, Z.J. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell*. 2004; 15, 535-548.

Kant, S., Swat, W., Zhang, S., Zhang, Z.Y., Neel, B.G., Flavell, R.A., Davis, R.J. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes & development*. 2011; 25, 2069-2078.

Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F., Chao, M.V. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and cellular biology*. 2001; 21, 893-901.

Kim, E.K., Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2010; 1802, 396-405.

Kim, J.J., Lee, S.B., Park, J.K., Yoo, Y.D. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell death and differentiation*. 2010; 17, 1420-1434.

Kim, J.Y., Morgan, M., Kim, D.G., Lee, J.Y., Bai, L., Lin, Y., Liu, Z.G., Kim, Y.S. TNFalpha induced noncanonical NF-kappaB activation is attenuated by RIP1 through stabilization of TRAF2. *Journal of cell science*. 2011; 124, 647-656.

Kim, Y.S., Morgan, M.J., Choksi, S., Liu, Z.G. TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Molecular cell*. 2007; 26, 675-687.

Kimura, A., Naka, T., Nagata, S., Kawase, I., Kishimoto, T. SOCS-1 suppresses TNF-alpha-induced apoptosis through the regulation of Jak activation. *International immunology*. 2004; 16, 991-999.

Kirchner, S., Boldt, S., Kolch, W., Haffner, S., Kazak, S., Janosch, P., Holler, E., Andreesen, R., Eissner, G. LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway. *Journal of leukocyte biology*. 2004; 75, 324-331.

Kisiswa, L., Osorio, C., Erice, C., Vizard, T., Wyatt, S., Davies, A.M. TNFalpha reverse signaling promotes sympathetic axon growth and target innervation. *Nature neuroscience*. 2013; 16, 865-873.

Kitamura, K., Nakamoto, Y., Akiyama, M., Fujii, C., Kondo, T., Kobayashi, K., Kaneko, S., Mukaida, N. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002; 82, 571-583.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., Wajant, H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Molecular and cellular biology*. 2001; 21, 3964-3973.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu, S.D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 1988; 53, 45-53.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zivnotovsky, B., Melino, G., Nomenclature Committee on Cell, D. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009; 16, 3-11.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., Kirchhoff, S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276, 20633-20640.

Kull, F.C., Jr. The TNF receptor in TNF-mediated cytotoxicity. *Natural immunity and cell growth regulation*. 1988; 7, 254-265.

Kumar, S., van Raam, B.J., Salvesen, G.S., Cieplak, P. Caspase cleavage sites in the human proteome: CaspDB, a database of predicted substrates. *PloS one*. 2014; 9, e110539.

Kurada, B.R., Li, L.C., Mulherkar, N., Subramanian, M., Prasad, K.V., Prabhakar, B.S. MADD, a splice variant of IG20, is indispensable for MAPK activation and protection against apoptosis upon tumor necrosis factor-alpha treatment. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284, 13533-13541.

Lang, V., Symons, A., Watton, S.J., Janzen, J., Soneji, Y., Beinke, S., Howell, S., Ley, S.C. ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF-kappa B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Molecular and cellular biology*. 2004; 24, 5235-5248.

Le Hir, M., Bluethmann, H., Kosco-Vilbois, M.H., Muller, M., di Padova, F., Moore, M., Ryffel, B., Eugster, H.P. Tumor necrosis factor receptor-1 signaling is required for differentiation of follicular dendritic cells, germinal center formation, and full antibody responses. *Journal of inflammation*. 1995; 47, 76-80.

Lee, Y.H., Giraud, J., Davis, R.J., White, M.F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278, 2896-2902.

Legler, D.F., Micheau, O., Doucey, M.A., Tschopp, J., Bron, C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*. 2003; 18, 655-664.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998; 94, 491-501.

Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F.K., Wu, H. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*. 2012; 150, 339-350.

Li, P., Jayarama, S., Ganesh, L., Mordi, D., Carr, R., Kanteti, P., Hay, N., Prabhakar, B.S. Akt-phosphorylated mitogen-activated kinase-activating death domain protein (MADD) inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking Fas-associated death domain (FADD) association with death receptor 4. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285, 22713-22722.

Li, R., Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Yue, X., Hampel, H., Zhang, D., Shen, Y. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004; 24, 1760-1771.

Liang, H., Yin, B., Zhang, H., Zhang, S., Zeng, Q., Wang, J., Jiang, X., Yuan, L., Wang, C.Y., Li, Z. Blockade of tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1-mediated TNF-alpha signaling protected Wistar rats from diet-induced obesity and insulin resistance. *Endocrinology*. 2008; 149, 2943-2951.

Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z.G. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development*. 1999; 13, 2514-2526.

Ling, L., Cao, Z., Goeddel, D.V. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95, 3792-3797.

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Kyriakis, J.M. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Molecular and cellular biology*. 2000a; 20, 2198-2208.

Liu, J., Li, X.D., Ora, A., Heikkila, P., Vaheri, A., Voutilainen, R. cAMP-dependent protein kinase activation inhibits proliferation and enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-alpha in NCI-H295R adrenocortical cells. *Journal of molecular endocrinology*. 2004; 33, 511-522.

Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C., Fesik, S.W. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*. 2000b; 408, 1004-1008.

Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 1996; 87, 565-576.

Lombardi, L., Ciana, P., Cappellini, C., Trecca, D., Guerrini, L., Migliazza, A., Maiolo, A.T., Neri, A. Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. *Nucleic acids research*. 1995; 23, 2328-2336.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998; 94, 481-490.

Luschen, S., Adam, D., Ussat, S., Kreder, D., Schneider-Brachert, W., Kronke, M., Adam-Klages, S. Activation of ERK1/2 and cPLA(2) by the p55 TNF receptor occurs independently of FAN. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000; 274, 506-512.

MacEwan, D.J. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *British journal of pharmacology*. 2002; 135, 855-875.

Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Mrad, R.L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T.W., Lacasse, E.C., Waring, J., Korneluk, R.G. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105, 11778-11783.

Mazzon, E., Cuzzocrea, S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respiratory research*. 2007; 8, 75.

Mazzon, E., Esposito, E., Di Paola, R., Muia, C., Crisafulli, C., Genovese, T., Caminiti, R., Meli, R., Bramanti, P., Cuzzocrea, S. Effect of tumour necrosis factor-alpha receptor 1 genetic deletion on carrageenan-induced acute inflammation: a comparison with etanercept. *Clinical and experimental immunology*. 2008; 153, 136-149.

McCoy, M.K., Tansey, M.G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*. 2008; 5, 45.

McFarlane, S.M., Jupp, O.J., Cobban, H.J., Hunter, I., Anderson, H.M., Vandenabeele, P., Nixon, G.F., MacEwan, D.J. Stimulation of stress-activated but not mitogen-activated protein kinases by tumour necrosis factor receptor subtypes in airway smooth muscle. *Biochemical pharmacology*. 2001; 61, 749-759.

Mendelson, K.G., Contois, L.R., Tevosian, S.G., Davis, R.J., Paulson, K.E. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93, 12908-12913.

Merlos-Suarez, A., Fernandez-Larrea, J., Reddy, P., Baselga, J., Arribas, J. Pro-tumor necrosis factor-alpha processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273, 24955-24962.

Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., Tschopp, J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and cellular biology*. 2001; 21, 5299-5305.

Micheau, O., Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003; 114, 181-190.

Minogue, A.M., Barrett, J.P., Lynch, M.A. LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1beta in a JAK2-dependent manner. *Journal of neuroinflammation*. 2012; 9, 126.

Miscia, S., Marchisio, M., Grilli, A., Di Valerio, V., Centurione, L., Sabatino, G., Garaci, F., Zauli, G., Bonvini, E., Di Baldassarre, A. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2002; 13, 13-18.

Moquin, D.M., McQuade, T., Chan, F.K. CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNFalpha-induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis. *PloS one*. 2013; 8, e76841.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65, 55-63.

Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A.I., Young, S.N., Varghese, L.N., Tannahill, G.M., Hatchell, E.C., Majewski, I.J., Okamoto, T., Dobson, R.C., Hilton, D.J., Babon, J.J., Nicola, N.A., Strasser, A., Silke, J., Alexander, W.S. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*. 2013; 39, 443-453.

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273, 2926-2930.

Nadeau, S., Filali, M., Zhang, J., Kerr, B.J., Rivest, S., Soulet, D., Iwakura, Y., de Rivero Vaccari, J.P., Keane, R.W., Lacroix, S. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNF: implications for neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011; 31, 12533-12542.

Naismith, J.H., Sprang, S.R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends in biochemical sciences*. 1998; 23, 74-79.

Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C.F., Yagita, H., Okumura, K. TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271, 14661-14664.

Nedwin, G.E., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D.V., Gray, P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic acids research*. 1985; 13, 6361-6373.

Nelson, D.E., Ihekwaba, A.E., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.A., Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.A., Spiller, D.G., Edwards, S.W., McDowell, H.P., Unitt, J.F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D.B., White, M.R. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*. 2004; 306, 704-708.

Niitsu, Y., Watanabe, N., Sone, H., Neda, H., Yamauchi, N., Urushizaki, I. Mechanism of the cytotoxic effect of tumor necrosis factor. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1985; 76, 1193-1197.

Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., Ichijo, H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Molecular cell*. 1998; 2, 389-395.

Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J., Ichijo, H. Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280, 37033-37040.

O'Malley, W.E., Achinstein, B., Shear, M.J. Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated With *Serratia Marcescens* Polysaccharide, and Induced Tolerance. *Journal of the National Cancer Institute*. 1962; 29, 1169-1175.

Ono, H., Ichiki, T., Fukuyama, K., Iino, N., Masuda, S., Egashira, K., Takeshita, A. cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor-alpha-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004; 24, 1634-1639.

Ono, H., Ichiki, T., Ohtsubo, H., Fukuyama, K., Imayama, I., Iino, N., Masuda, S., Hashiguchi, Y., Takeshita, A., Sunagawa, K. cAMP-response element-binding protein mediates tumor necrosis factor-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2006; 29, 39-47.

Orozco, S., Yatim, N., Werner, M.R., Tran, H., Gunja, S.Y., Tait, S.W., Albert, M.L., Green, D.R., Oberst, A. RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell death and differentiation*. 2014; 21, 1511-1521.

Orton, R.J., Sturm, O.E., Vyshemirsky, V., Calder, M., Gilbert, D.R., Kolch, W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *The Biochemical journal*. 2005; 392, 249-261.

- Otsuka, K. [Oriental medicine. (1)]. *Kangogaku zasshi*. 1975; 39, 187-190.
- Ozes, O.N., Akca, H., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Maehama, T., Dixon, J.E., Donner, D.B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98, 4640-4645.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., Donner, D.B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*. 1999; 401, 82-85.
- Pajak, B., Orzechowski, A. IFN-alpha competes with TNF-alpha for STAT-1alpha; molecular basis for immune escape of human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Oncology reports*. 2007; 18, 1039-1045.
- Pandita, R., Pocsik, E., Aggarwal, B.B. Interferon-gamma induces cell surface expression for both types of tumor necrosis factor receptors. *FEBS letters*. 1992; 312, 87-90.
- Park, S.M., Yoon, J.B., Lee, T.H. Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro. *FEBS letters*. 2004; 566, 151-156.
- Pattison, M.J., Mitchell, O., Flynn, H.R., Chen, C.S., Yang, H.T., Ben-Addi, H., Boeing, S., Snijders, A.P., Ley, S.C. TLR and TNF-R1 activation of the MKK3/MKK6-p38alpha axis in macrophages is mediated by TPL-2 kinase. *The Biochemical journal*. 2016; 473, 2845-2861.
- Pincheira, R., Castro, A.F., Ozes, O.N., Idumalla, P.S., Donner, D.B. Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *Journal of immunology*. 2008; 181, 1288-1298.
- Pollock, J., McFarlane, S.M., Connell, M.C., Zehavi, U., Vandenabeele, P., MacEwan, D.J., Scott, R.H. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology*. 2002; 42, 93-106.
- Qi, M., Elion, E.A. MAP kinase pathways. *Journal of cell science*. 2005; 118, 3569-3572.
- Quarato, G., Guy, C.S., Grace, C.R., Llambi, F., Nourse, A., Rodriguez, D.A., Wakefield, R., Frase, S., Moldoveanu, T., Green, D.R. Sequential Engagement of Distinct MLKL Phosphatidylinositol-Binding Sites Executes Necroptosis. *Molecular cell*. 2016; 61, 589-601.

Raveney, B.J., Copland, D.A., Dick, A.D., Nicholson, L.B. TNFR1-dependent regulation of myeloid cell function in experimental autoimmune uveoretinitis. *Journal of immunology*. 2009; 183, 2321-2329.

Razani, B., Zarnegar, B., Ytterberg, A.J., Shiba, T., Dempsey, P.W., Ware, C.F., Loo, J.A., Cheng, G. Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Science signaling*. 2010; 3, ra41.

Rebe, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prevotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., Fontenay, M., Solary, E. Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood*. 2007; 109, 1442-1450.

Remy, G., Risco, A.M., Inesta-Vaquera, F.A., Gonzalez-Teran, B., Sabio, G., Davis, R.J., Cuenda, A. Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cellular signalling*. 2010; 22, 660-667.

Riebe, C., Pries, R., Schroeder, K.N., Wollenberg, B. Phosphorylation of STAT3 in head and neck cancer requires p38 MAPKinase, whereas phosphorylation of STAT1 occurs via a different signaling pathway. *Anticancer research*. 2011; 31, 3819-3825.

Rodriguez, M., Cabal-Hierro, L., Carcedo, M.T., Iglesias, J.M., Artime, N., Darnay, B.G., Lazo, P.S. NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286, 22814-22824.

Roget, K., Ben-Addi, A., Mambole-Dema, A., Gantke, T., Yang, H.T., Janzen, J., Morrice, N., Abbott, D., Ley, S.C. IkappaB kinase 2 regulates TPL-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by direct phosphorylation of TPL-2 serine 400. *Molecular and cellular biology*. 2012; 32, 4684-4690.

Rohde, K., Kleinesudeik, L., Roesler, S., Lowe, O., Heidler, J., Schroder, K., Wittig, I., Droese, S., Fulda, S. A Bak-dependent mitochondrial amplification step contributes to Smac mimetic/glucocorticoid-induced necroptosis. *Cell death and differentiation*. 2016.

Romanatto, T., Roman, E.A., Arruda, A.P., Denis, R.G., Solon, C., Milanski, M., Moraes, J.C., Bonfleur, M.L., Degasperis, G.R., Picardi, P.K., Hirabara, S., Boscherio, A.C., Curi, R., Velloso, L.A. Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284, 36213-36222.

Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., Bluethmann, H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 1993; 364, 798-802.

Rothe, J., Mackay, F., Bluethmann, H., Zinkernagel, R., Lesslauer, W. Phenotypic analysis of TNFR1-deficient mice and characterization of TNFR1-deficient fibroblasts in vitro. *Circulatory shock*. 1994; 44, 51-56.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO journal*. 1997; 16, 6914-6925.

Ryden, M., Dicker, A., van Harmelen, V., Hauner, H., Brunnberg, M., Perbeck, L., Lonnqvist, F., Arner, P. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277, 1085-1091.

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO journal*. 1998; 17, 2596-2606.

Sakaguchi, M., Oka, M., Iwasaki, T., Fukami, Y., Nishigori, C. Role and regulation of STAT3 phosphorylation at Ser727 in melanocytes and melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2012; 132, 1877-1885.

Sandra, F., Matsuki, N.A., Takeuchi, H., Ikebe, T., Kanematsu, T., Ohishi, M., Hirata, M. TNF inhibited the apoptosis by activation of Akt serine/threonine kinase in the human head and neck squamous cell carcinoma. *Cellular signalling*. 2002; 14, 771-778.

Schenk, B., Fulda, S. Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNF α -induced necroptotic signaling and cell death. *Oncogene*. 2015; 34, 5796-5806.

Schievella, A.R., Chen, J.H., Graham, J.R., Lin, L.L. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 12069-12075.

Schlatter, R., Schmich, K., Lutz, A., Trefzger, J., Sawodny, O., Ederer, M., Merfort, I. Modeling the TNF α -induced apoptosis pathway in hepatocytes. *PloS one*. 2011; 6, e18646.

Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., Fiers, W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *The Journal of biological chemistry*. 1992; 267, 5317-5323.

Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., Kronke, M. TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell*. 1992; 71, 765-776.

Segui, B., Cuvillier, O., Adam-Klages, S., Garcia, V., Malagarie-Cazenave, S., Leveque, S., Caspar-Bauguil, S., Coudert, J., Salvayre, R., Kronke, M., Levade, T. Involvement

of FAN in TNF-induced apoptosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 108, 143-151.

Shames, B.D., McIntyre, R.C., Jr., Bensard, D.D., Pulido, E.J., Selzman, C.H., Reznikov, L.L., Harken, A.H., Meng, X. Suppression of tumor necrosis factor alpha production by cAMP in human monocytes: dissociation with mRNA level and independent of interleukin-10. *The Journal of surgical research*. 2001; 99, 187-193.

Shear, M.J., Turner, F.C., Perrault, A., Shovelton, T. Chemical Treatment of Tumors. V. Isolation of the Hemorrhage-Producing Fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) Culture Filtrate. *Journal of the National Cancer Institute*. 1943; 4, 81-97.

Shi, C.S., Kehrl, J.H. Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, but not NF-kappaB, by the tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 through a TNF receptor-associated factor 2- and germinal center kinase related-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 32102-32107.

Shi, H., Tzameli, I., Bjorbaek, C., Flier, J.S. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279, 34733-34740.

Shu, H.B., Takeuchi, M., Goeddel, D.V. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93, 13973-13978.

Sippy, B.D., Hofman, F.M., Wright, A.D., Wang, J.L., Gopalakrishna, R., Gundimeda, U., He, S., Ryan, S.J., Hinton, D.R. Induction of intercellular adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha through the 55-kDa receptor is dependent on protein kinase C in human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1996; 37, 597-606.

Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276, 7320-7326.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*. 1999; 144, 281-292.

Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*. 1994; 76, 959-962.

Smith, R.A., Baglioni, C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *The Journal of biological chemistry*. 1987; 262, 6951-6954.

Solomon, K.A., Pesti, N., Wu, G., Newton, R.C. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *Journal of immunology*. 1999; 163, 4105-4108.

Sondarva, G., Kundu, C.N., Mehrotra, S., Mishra, R., Rangasamy, V., Sathyanarayana, P., Ray, R.S., Rana, B., Rana, A. TRAF2-MLK3 interaction is essential for TNF-alpha-induced MLK3 activation. *Cell research*. 2010; 20, 89-98.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C., Alnemri, E.S. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1997; 272, 18542-18545.

Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Green, D.R., Reed, J.C., Froelich, C.J., Salvesen, G.S. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273, 27084-27090.

Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., Wang, X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012; 148, 213-227.

Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W., Greene, W.C. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*. 1993; 259, 1912-1915.

Takada, H., Chen, N.J., Mirtsos, C., Suzuki, S., Suzuki, N., Wakeham, A., Mak, T.W., Yeh, W.C. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Molecular and cellular biology*. 2003; 23, 4026-4033.

Takada, Y., Aggarwal, B.B. TNF activates Syk protein tyrosine kinase leading to TNF-induced MAPK activation, NF-kappaB activation, and apoptosis. *Journal of immunology*. 2004; 173, 1066-1077.

Takahashi, R., Sonoda, Y., Ichikawa, D., Yoshida, N., Eriko, A.Y., Tadashi, K. Focal adhesion kinase determines the fate of death or survival of cells in response to TNFalpha in the presence of actinomycin D. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1770, 518-526.

Tang, D., Lahti, J.M., Kidd, V.J. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275, 9303-9307.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993a; 74, 845-853.

Tartaglia, L.A., Pennica, D., Goeddel, D.V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1993b; 268, 18542-18548.

Tartaglia, L.A., Weber, R.F., Figari, I.S., Reynolds, C., Palladino, M.A., Jr., Goeddel, D.V. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88, 9292-9296.

Tay, S., Hughey, J.J., Lee, T.K., Lipniacki, T., Quake, S.R., Covert, M.W. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature*. 2010; 466, 267-271.

Tcherkasowa, A.E., Adam-Klages, S., Kruse, M.L., Wiegmann, K., Mathieu, S., Kolanus, W., Kronke, M., Adam, D. Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *Journal of immunology*. 2002; 169, 5161-5170.

Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K., Meier, P. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Molecular cell*. 2011; 43, 432-448.

Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., Gutkind, J.S. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271, 27225-27228.

Thoma, B., Grell, M., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *The Journal of experimental medicine*. 1990; 172, 1019-1023.

Tian, B., Nowak, D.E., Brasier, A.R. A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. *BMC genomics*. 2005; 6, 137.

Tibbles, L.A., Ing, Y.L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J.R., Lassam, N.J. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *The EMBO journal*. 1996; 15, 7026-7035.

Timofeeva, O.A., Chasovskikh, S., Lonskaya, I., Tarasova, N.I., Khavrutskii, L., Tarasov, S.G., Zhang, X., Korostyshevskiy, V.R., Cheema, A., Zhang, L., Dakshanamurthy, S., Brown, M.L., Dritschilo, A. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287, 14192-14200.

Tobiome, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports*. 2001; 2, 222-228.

Tokunaga, F., Iwai, K. LUBAC, a novel ubiquitin ligase for linear ubiquitination, is crucial for inflammation and immune responses. *Microbes and infection*. 2012; 14, 563-572.

Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., Nureki, O. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF-kappaB regulation. *The EMBO journal*. 2012; 31, 3856-3870.

Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A., Davis, R.J. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes & development*. 2001; 15, 1419-1426.

Trefzer, U., Brockhaus, M., Lotscher, H., Parlow, F., Budnik, A., Grewe, M., Christoph, H., Kapp, A., Schopf, E., Luger, T.A., et al. The 55-kD tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor-alpha and by ultraviolet B radiation. *The Journal of clinical investigation*. 1993; 92, 462-470.

Tsou, H.K., Chen, H.T., Chang, C.H., Yang, W.Y., Tang, C.H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is mediated in TNF-alpha-induced CCL2 expression in human synovial fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2012; 113, 3509-3519.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Ponten, F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347, 1260419.

UniProt, C. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*. 2015; 43, D204-212.

Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.H., Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A., Bergsagel, P.L., Karin, M. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nature immunology*. 2008; 9, 1364-1370.

Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., Verma, I.M. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*. 1996; 274, 787-789.

Vandenabeele, P., Declercq, W., Vanhaesebroeck, B., Grooten, J., Fiers, W. Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *Journal of immunology*. 1995; 154, 2904-2913.

Ventura, J.J., Cogswell, P., Flavell, R.A., Baldwin, A.S., Jr., Davis, R.J. JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes & development*. 2004; 18, 2905-2915.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000; 102, 43-53.

Verhelst, K., Carpentier, I., Kreike, M., Meloni, L., Verstrepen, L., Kensche, T., Dikic, I., Beyaert, R. A20 inhibits LUBAC-mediated NF-kappaB activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7. *The EMBO journal*. 2012; 31, 3845-3855.

Viemann, D., Goebeler, M., Schmid, S., Klimmek, K., Sorg, C., Ludwig, S., Roth, J. Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells. *Blood*. 2004; 103, 3365-3373.

Vig, E., Green, M., Liu, Y., Donner, D.B., Mukaida, N., Goebel, M.G., Harrington, M.A. Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF-kappaB activity by mPLK/IRAK. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274, 13077-13084.

von Bulow, V., Dubben, S., Engelhardt, G., Hebel, S., Plumakers, B., Heine, H., Rink, L., Haase, H. Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. *Journal of immunology*. 2007; 179, 4180-4186.

Wakahara, R., Kunimoto, H., Tanino, K., Kojima, H., Inoue, A., Shintaku, H., Nakajima, K. Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2012; 17, 132-145.

Wallenius, V., Wallenius, K., Hisaoka, M., Sandstedt, J., Ohlsson, C., Kopf, M., Jansson, J.O. Retarded liver growth in interleukin-6-deficient and tumor necrosis factor receptor-1-deficient mice. *Endocrinology*. 2001; 142, 2953-2960.

Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Luthi, A.U., Gerner, C., Martin, S.J. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105, 12815-12819.

Wang, A.M., Creasey, A.A., Ladner, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yamamoto, R., Mark, D.F. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science*. 1985; 228, 149-154.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., Chen, Z.J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001; 412, 346-351.

Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin, A.S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998; 281, 1680-1683.

Wang, H., Wang, H.S., Zhou, B.H., Li, C.L., Zhang, F., Wang, X.F., Zhang, G., Bu, X.Z., Cai, S.H., Du, J. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PloS one*. 2013; 8, e56664.

Wang, L., Du, F., Wang, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 2008; 133, 693-703.

Wang, Y., Wu, T.R., Cai, S., Welte, T., Chin, Y.E. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Molecular and cellular biology*. 2000; 20, 4505-4512.

Ware, C.F., Crowe, P.D., Vanarsdale, T.L., Andrews, J.L., Grayson, M.H., Jerzy, R., Smith, C.A., Goodwin, R.G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *Journal of immunology*. 1991; 147, 4229-4238.

Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001; 292, 727-730.

Weiterer, S., Schulte, D., Muller, S., Kohlen, T., Uhle, F., Weigand, M.A., Henrich, M. Tumor necrosis factor alpha induces a serotonin dependent early increase in ciliary beat frequency and epithelial transport velocity in murine tracheae. *PloS one*. 2014; 9, e91705.

Wen, Z., Darnell, J.E., Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic acids research*. 1997; 25, 2062-2067.

Wesemann, D.R., Benveniste, E.N. STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex. *Journal of immunology*. 2003; 171, 5313-5319.

Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B., Daniel, P.T. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*. 2001; 97, 1378-1387.

Winzen, R., Wallach, D., Kemper, O., Resch, K., Holtmann, H. Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1. *Journal of immunology*. 1993; 150, 4346-4353.

Won, M., Park, K.A., Byun, H.S., Sohn, K.C., Kim, Y.R., Jeon, J., Hong, J.H., Park, J., Seok, J.H., Kim, J.M., Yoon, W.H., Jang, I.S., Shen, H.M., Liu, Z.G., Hur, G.M. Novel anti-apoptotic mechanism of A20 through targeting ASK1 to suppress TNF-induced JNK activation. *Cell death and differentiation*. 2010; 17, 1830-1841.

Workman, L.M., Habelhah, H. TNFR1 signaling kinetics: spatiotemporal control of three phases of IKK activation by posttranslational modification. *Cellular signalling*. 2013; 25, 1654-1664.

Wu, X.N., Yang, Z.H., Wang, X.K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., Han, J. Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell death and differentiation*. 2014; 21, 1709-1720.

Xanthoulea, S., Gijbels, M.J., van der Made, I., Mujcic, H., Thelen, M., Vergouwe, M.N., Ambagts, M.H., Hofker, M.H., de Winther, M.P. P55 tumour necrosis factor receptor in bone marrow-derived cells promotes atherosclerosis development in low-density lipoprotein receptor knock-out mice. *Cardiovascular research*. 2008; 80, 309-318.

Xia, P., Wang, L., Moretti, P.A., Albanese, N., Chai, F., Pitson, S.M., D'Andrea, R.J., Gamble, J.R., Vadas, M.A. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277, 7996-8003.

Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R., Karin, M. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97, 5243-5248.

Yang, J., Liao, X., Agarwal, M.K., Barnes, L., Auron, P.E., Stark, G.R. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes & development*. 2007; 21, 1396-1408.

Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R., Shen, Y. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002; 22, 3025-3032.

Yang, Q.H., Du, C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279, 16963-16970.

Yao, F., Long, L.Y., Deng, Y.Z., Feng, Y.Y., Ying, G.Y., Bao, W.D., Li, G., Guan, D.X., Zhu, Y.Q., Li, J.J., Xie, D. RACK1 modulates NF-kappaB activation by interfering with the interaction between TRAF2 and the IKK complex. *Cell research*. 2014; 24, 359-371.

Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V., Krut, O., Pongratz, C., Schramm, M., Kleinridders, A., Wunderlich, T., Kashkar, H., Utermohlen, O., Bruning, J.C., Schutze, S., Kronke, M. Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature*. 2009; 460, 1159-1163.

Yin, X.M. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *Journal of molecular medicine*. 2000; 78, 203-211.

Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., Reeves, S.A. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current biology : CB*. 2000; 10, 47-50.

Yu, M., Zhou, X., Niu, L., Lin, G., Huang, J., Zhou, W., Gan, H., Wang, J., Jiang, X., Yin, B., Li, Z. Targeting transmembrane TNF-alpha suppresses breast cancer growth. *Cancer research*. 2013; 73, 4061-4074.

Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J.H., Kyriakis, J.M. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273, 22681-22692.

Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitso, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., Fanger, G.R., Henson, P., Johnson, G.L. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97, 7272-7277.

Zeller, C.N., Wang, Y., Markel, T.A., Weil, B., Abarbanell, A., Herrmann, J.L., Kelly, M.L., Coffey, A., Meldrum, D.R. Role of tumor necrosis factor receptor 1 in sex differences of stem cell mediated cardioprotection. *The Annals of thoracic surgery*. 2009; 87, 812-819.

Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., Han, J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009; 325, 332-336.

Zhang, H., Yan, D., Shi, X., Liang, H., Pang, Y., Qin, N., Chen, H., Wang, J., Yin, B., Jiang, X., Feng, W., Zhang, W., Zhou, M., Li, Z. Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. *Journal of leukocyte biology*. 2008; 84, 789-797.

Zhang, Y., Liu, G., Dong, Z. MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276, 42534-42542.

Zhang, Y.J., Zhao, W., Zhu, M.Y., Tang, S.S., Zhang, H. Thyroid-stimulating hormone induces the secretion of tumor necrosis factor-alpha from 3T3-L1 adipocytes via a protein kinase A-dependent pathway. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2013; 121, 488-493.

Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., Liu, Z.G. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109, 5322-5327.

Zhao, X.M., Chen, Z., Zhao, J.B., Zhang, P.P., Pu, Y.F., Jiang, S.H., Hou, J.J., Cui, Y.M., Jia, X.L., Zhang, S.Q. Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis. *Cell death & disease*. 2016; 7, e2089.

Zheng, L., Bidere, N., Staudt, D., Cubre, A., Orenstein, J., Chan, F.K., Lenardo, M. Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26, 3505-3513.

Zhou, A., Scoggin, S., Gaynor, R.B., Williams, N.S. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene*. 2003; 22, 2054-2064.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma Zehra	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Hapil	Tel no	05072366614
Doğum tarihi	08/04/1988	e-posta	fatmazehrahapil@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Bilkent Üniversitesi	2008
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2012

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araş. Gör.	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2009-1016
Stajer	Karolinska Enstitüsü, Hematoloji Bölümü, Gen ve Hücre Tedavi Grubu	Eylül 2008-Ocak 2009
Stajer	Würzburg Üniversitesi, Genetik ve Nörobiyoloji Bölümü	Ocak 2008-Mart 2008
Stajer	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	Temmuz 2006-Eylül 2006

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	96,25/100
	YDS	88,75/100

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
TNFR1 Sinyal İletim Mekanizmalarının Aydınlatılması	TUBİTAK	2013-2016
“Pankreatik Beta Hücrelerine Özgün Vazoaktif Intestinal Peptid Sentezinin Diyabetik Deney Hayvan Modelinde Beta Hücre Fonksiyonu Ve Adacık Kitle Kaybı Üzerindeki Terapötik Etkinliği”	TUBİTAK	2012-2013
Multiple Myeloma Hasta Lenfositlerinde Ölümcül Ligand Sentezinin Önemi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2010-2012

Burslar-Ödüller:

- Genç Araştırmacı Ödülü, Ulusal Hematoloji Kongresi, 2013
- En İyi Bilimsel Yayın 2.lık ödülü. (Yayın: “*Tracing of islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging*”) Türk Diyabet Derneği, 2013
- Lisans %100 Eğitim Bursu, Bilkent Vakfı

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar:

- Ertosun MG, Hapil FZ, Osman Nidai O. *E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling*. Cytokine Growth Factor Rev. 2016 Mar2.pii:S1359-6101(16)30028-4.
- Yarali A., Ehser S., Hapil F.Z., Huang J., Gerber B., *Odour-Intensity Learning in Fruitflies* Proc Biol Sci. 2009 Oct 7;276(1672):3413-20.

- Kahraman S, Dirice E, Hapil FZ, Ertosun MG, Ozturk S, Griffith TS, Sanlioglu S, Sanlioglu AD. *Tracing of xenogeneic islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging*. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2011, Sep;27(6):575-83. doi: 10.1002/dmrr.1216

Bildiriler:

1. Hapil FZ., Copuroglu FE, Ertosun MG, Ozes ON. *Tyrosine phosphorylation of tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) by Janus Kinase 2 (JAK2) influences TNFR1 signalosome* 41st FEBS Congress, 2016 **Sözlü Bildiri**
2. Hapil FZ., Ertosun MG, Copuroglu FE, Ozes ON. *cAMP activated protein kinase (PKA) plays role in regulation of TNF-induced tumor necrosis factor receptor type I (TNFR1) signaling* 41st FEBS Congress, 2016 **Sözlü Bildiri**
3. Ertosun MG, Hapil FZ., Mert U, Ozes ON. *E2F1 transcription factor is post-translationally regulated by Protein Kinase A (PKA)* 41st FEBS Congress, 2016 **Sözlü Bildiri**
4. Gorgisen G, Hapil FZ., Yilmaz O, Cetin Z, Pehlivanoglu S, Ozbudak IH, Erdogan A, Ozes ON *Role of p.S668T and p.D674H novel mutations in insulin receptor substrate 1 (IRS1) gene in developing cancer*. SANKO Innovation in Medicine Summit-2, 2016 **Sözlü Bildiri**
5. Hapil FZ. et.al. *Tumor Necrosis Factor Receptor-1 (TNFR1) signalosome is influenced by Janus Kinase 2 (JAK2)-mediated receptor tyrosine phosphorylation*. 4th Annual Meeting of International Cytokine and Interferon Society, 2016 **Poster**
6. Hapil FZ. et.al. *Role of cAMP activated Protein Kinase A (PKA) in regulation of Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 (TNFR1) Signaling*. 4th Annual Meeting of International Cytokine and Interferon Society, 2016 **Poster**
7. Ertosun MG, Hapil FZ, Ozes ON. *E2F1 Aktivitesi Protein Kinaz A (PKA) tarafından Post- Translasyonel Olarak Düzenlenmektedir* 14. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2015. **Sözlü Sunu**

8. Hapil FZ., Koksoy S, Ersoy Dursun F, Kurtoglu E, Undar L, Sanlioglu S *Low FasL and TRAIL levels on peripheral lymphocytes of multiple myeloma patients.* 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2013. **Sözlü Sunu**
9. Hapil FZ., Tasyurek H, Guzel N, Sanlioglu AD, Balci MK, Sanlioglu S. *Diabetes induction correlated with the decrease of vasoactive intestinal peptide in pancreatic islets of type II diabetic animal model.* 49. Ulusal Diyabet Kongresi, 2013. **Sözlü Bildiri**
10. Hapil FZ., Tasyurek MK, Sanlioglu AD, Balci MK, Sanlioglu S. *Pancreatic expression profiles of vasoactive intestinal peptide and its receptors in mouse model of type 2 diabetes.* 21st Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, Madrid, Spain. October 25-28, 2013 **Poster**
11. Tasyurek MK, Hapil FZ, Altunbas HA, Canatan H, Sanlioglu S. *GLP-1 and GLP-1 receptor expression profiles in pancreatic islets of Diet Induced Obese (DIO) mice.* 21st Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, Madrid, Spain. October 25-28, 2013. **Poster**
12. Hapil FZ., Tasyurek H., Guzel N., Sanlioglu AD., Balci MK., Sanlioglu S. Downregulation of vasoactive intestinal peptide expression in type II diabetes. 73rd American Diabetes Association (ADA) Congress. Chicago, IL, USA. June 21-25, 2013 **Poster**
13. Hapil FZ., Koksoy S., Ersoy Dursun F, Kurtoglu E, Undar L, Sanlioglu S. *Decreased Death Ligand Expression on T Lymphocytes of Multiple Myeloma Patients.* Poster Presentation. The EMBO Meeting 2012, Nice, France. September 2012. **Poster**
14. Hapil FZ., Guzel N., Koksoy S., Ersoy F., Kurtoglu E., Undar L, Sanlioglu S. *Decreased Death Ligand Expression on T Lymphocytes of Multiple Myeloma Patients.* Poster Presentation. Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC), Antalya, Turkey 2012 **Poster**
15. Hapil FZ., Bisgin A, Aydin C, Undar L, Sanlioglu AD, Sanlioglu S. *Outcome of TRAIL Presentation on T cells in Patients with Multiple Myeloma.* 18th Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, Milano, Italy, October 22-25, 2010. **Poster**

16. Kahraman S, Dirice E, Hapil FZ, Ertosun MG, Ozturk S, Griffith TS, Sanlioglu S, Sanlioglu AD. *In vivo fluorescence imaging of xenogeneic islet graft survival*. 18th Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, Milano, Italy, October 22-25, 2010. **Poster**
17. Hapil FZ., Bisgin A., Salim O., Undar L., Sanlioglu S. *Effects of Death Ligand Overexpression on Anti-tumor Activity of NK Cells*. Abstract. EMBO Symposia on Viral Vectors in Gene Therapy: Applications and Novel Production Methods. August 26- September 4, 2010. **Özet**
18. Kahraman S., Dirice E., Sanlioglu AD., Hapil FZ., Balci MK., Sanlioglu S. *Success of islet xenotransplantation after ex vivo eGFP transduction is followed via CCD camera*. 11. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2009. **Sözlü Bildiri**
19. Kahraman S, Hapil FZ, Ertosun MG, Dirice E, Sanlioglu AD, Sanlioglu S. *In vivo fluorescence imaging as a method to assess pancreatic islet xenograft failure*. 17th Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, Hannover, Germany, November 21-25, 2009. **Poster**
20. Kahraman S, Hapil FZ, Aydin C, Bisgin A, Dirice E, Griffith TS, Sanlioglu AD, Sanlioglu S. *Tracing of the fate of allogeneic islets via CCD camera*. 17th Annual Congress of European Society of Gene and Cell Therapy, Hannover, Germany, November 21-25, 2009. **Poster**