

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MCPIP-1'İN DİŞ ETİ BAĞIŞIKLIK YANITI ÜZERİNDE
DÜZENLEYİCİ ETKİSİ

YİĞİT FIRATLI

DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL ERHAN FIRATLI

II.DANIŞMAN
DOÇ.DR. ULVİ KAHRAMAN GÜRSOY

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
PERİODONTOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**MCPIP-1'İN DİŞ ETİ BAĞIŞIKLIK YANITI ÜZERİNDE
DÜZENLEYİCİ ETKİSİ**

YİĞİT FIRATLI

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL ERHAN FIRATLI**

**II.DANIŞMAN
DOÇ.DR. ULVİ KAHRAMAN GÜRSOY**

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
PERİODONTOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

“Eğitimime katkı sağlayanlara ve aileme ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez dönemi boyunca varlığı ve katkıları için danışmanım Prof. Dr. Erhan Fıratlı'ya ve tezimin gerek laboratuvar aşamalarında gerekse burs ve proje desteklerinin sağlanmasında sonsuz yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın tüm aşamalarında bilgilerini benimle paylaşan, rehberlik eden, Turku Üniversitesi ve Finlandiya'daki adaptasyon sürecime gösterdiği ilgi ve katkılarından ötürü II.danışmanım Doç. Dr. Ulvi Kahraman Gürsoy'a,

Tüm emeklerinden ötürü, tez izleme komitesi üyeleri Doç. Dr. Duygu Yaman ve Dr. Mustafa Yılmaz'a

Turku Üniversitesi Diş Hekimliği Enstitüsünden Prof. Dr. Eija Könönen, Prof. Dr. Vuokko Loimaranta, Doç. Dr. Mervi Gürsoy, Katja Sampalahti, Oona Hällfors ve Tatjana Peskova'ya,

Doktora eğitimim sırasında kendilerinden çok şey öğrendiğim anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Serdar Çintan, Prof. Dr. Gülden Işık, Prof. Dr. Korkud Demirel, Prof. Dr. Funda Yalçın, Prof. Dr. Ülkü Başer, Doç. Dr. Ali Çekici, Doç. Dr. Emine Çifçibaşı ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı Kocak'a,

Değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Gökhan Kasnak, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Öner, Dr. Öğr. Üyesi Birke Koca Ünsal, Dr. Burak İskefli, Dr. Yiğit Biren, Dr. Melis Soytürk, Dr. Merve Biçer, Dr. Mert Türkmen, Dt. Deniz Çağlar, Dt. Cemresu Tabar Eralp, Dr. Öğr. Üyesi Başar Karaca, Dt. Samira Elmanfi'ye

Her zaman yanımda olan, her zaman bana destek olan sevgili annem Prof. Dr. Sönmez Fıratlı ve sevgili babam Prof. Dr. Erhan Fıratlı'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma, Finnish National Agency for Education (EDUFI), University of Joint Research Grant Fund, SHS The Finnish Dental Society Apollonia ve Miverva Foundation tarafından desteklenmiştir.

Proje No: KM-20-22377

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
BEYAN.....	III
İTHAF	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
RESİMLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XI
ÖZET	XIV
ABSTRACT	XV
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gingival ve Periodontal Hastalıklar.....	3
2.1.1. Plakın Geçirdiği Değişimler ve Biyofilm Oluşumu.....	3
2.1.2. Bakterilerin Patogenezdaki Rolü.....	4
2.1.3. <i>F.nucleatum</i>	5
2.1.4. <i>P.gingivalis</i>	6
2.1.5. Konağın yanıtı.....	7
2.2. MCPIP-1.....	9
2.3. MALT-1.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. İnsan Gingival Keratinosit Hücre Kültürü.....	13
3.2. Bakteri Kültürü.....	15
3.3. <i>P. gingivalis</i> LPS ve IL-1 β Stok Solüsyonlarının Hazırlığı.....	16
3.4. Tek Katlı Keratinositlerin Bakteri, <i>P.g.</i> LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu.....	17
3.5. MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınımının Değerlendirilmesi ve İmmünoblot...18	
3.6. MCPIP-1 ve MALT-1 Gen Ekspresyonunun Tespiti.....	21
3.7. Organotipik Diş Eti Epiteli Modelinin Oluşturulması.....	21
3.8. Organotipik Diş Eti Epiteli Modelinin Bakteri, <i>P. gingivalis</i> LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu.....	23

3.9. Organotipik Diş Eti Epitel Modelinin İmmünohistokimyasal İncelemesi.....	24
3.10. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	57
ETİK KURUL KARARI	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	66
ÖZGEÇMİŞ	67



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığını 2 Saat İnkübasyon Sonrası Değerlendiren Grafik.....	29
Şekil 2: İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığını 6 Saat İnkübasyon Sonrası Değerlendiren Grafik.....	30
Şekil 3: İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığını 24 Saat İnkübasyon Sonrası Değerlendiren Grafik.....	31
Şekil 4: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	32
Şekil 5: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	33
Şekil 6: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	34
Şekil 7: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	35
Şekil 8: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	36
Şekil 9: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	37
Şekil 10: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik.....	38
Şekil 11: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik.....	39
Şekil 12: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik.....	40
Şekil 13: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik.....	41
Şekil 14: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik.....	42
Şekil 15: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik.....	43
Şekil 16: 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası β -aktin, MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınım Profillerini Gösteren Grafik.....	44

Şekil 17: 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası β -aktin, MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınım Profillerini Gösteren Grafik.....	45
Şekil 18: 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası β -aktin, MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınım Profillerini Gösteren Grafik.....	46
Şekil 19: Organotipik Oral Mukoza Modellerinin <i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu Sonrası Ki-67 Protein Salınım Seviyeleri.....	47
Şekil 20: Organotipik Oral Mukoza Modellerinin <i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu Sonrası MCPIP-1 Protein Salınım Seviyeleri.....	48
Şekil 21: Organotipik Oral Mukoza Modellerinin <i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu Sonrası MALT-1 Protein Salınım Seviyeleri.....	49

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Spektrofotometre.....	13
Resim 2. Hücre Kültürü Biyogüvenlik Kabini.....	14
Resim 3. Hücre Kültürü Yapılan Özel Şişeler.....	14
Resim 4. Bakteri Kültürü Oksijensiz Ortamı.....	15
Resim 5. Bakteri Agar Besiyeri.....	16
Resim 6. Sekonder Antikorlar.....	16
Resim 7. -70 °C Derin Dondurucu ve Bradford Testi Çözeltisi.....	17
Resim 8. Lizis Tampon Çözeltisi.....	18
Resim 9. Bio-Rad Mikroplaka Okuyucu.....	19
Resim 10. SDS-PAGE Tankı.....	20
Resim 11. ImageJ Programı.....	20
Resim 12. DMEM Ortamı, PBS Çözeltisi ve Tripsin.....	22
Resim 13. On İki Kuyucuklu Plaka.....	22
Resim 14. Hücre Kültürü İnkübatörü.....	23
Resim 15. MCPIP-1 Primer Antikoru.....	25

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

<i>P.g.:</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>F.N.:</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
LPS:	Lipopolisakkarit
IL-1 β :	Interlökin-1 β
MCP-1:	Monosit kemoatraktan protein-1
MCPIP-1:	Monosit kemoatraktan protein inhibitör proteini
MALT-1:	Lenfoid doku lenfoma translokasyon proteini
ZC3H12A:	Zinc Finger CCCH-Tip içeren 12A
PMA:	phorbol 12-myristate 13-acetate
TLR:	Toll like reseptörü
miRNA:	mikro RNA(ribonukleik asit)
NF- κ B:	Nuklear Faktör kappa B
RNase:	Ribonukleaz
IL-6:	Interlökin-6
IL-12p40:	Interlökin-12 alt birim 40
TNF α :	Tümör nekrosis faktörü- alfa
<i>P.intermedia:</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P.nigrescens:</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>T.denticola:</i>	<i>Treponema denticola</i>

<i>T.forsythia</i> :	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>C.rectus</i> :	<i>Camplobacter rectus</i>
<i>E.corrodens</i> :	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>P.micros</i> :	<i>Peptosterptococcus micros</i>
FadA:	<i>F.N. adezin-A</i>
RgpA:	Gingipain A
RgpB:	Gingipain B
Kgp:	Lysine-spesifik gingipain
IL-8:	İnterlökin-8
TIMP-1:	Matriks metallopeinazların doku inhibitörü-1
MMP-2:	Matriks metalloproteinaz 2
MMP-9:	Matriks metalloproteinaz 9
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-kinaz
sIgA:	Salgısal immunglobülin A
IgG:	Immunglobülin G
DOS:	Diş eti oluşu sıvısında
IL-1 α :	İnterlökin-1 α
IL-1Ra:	IL-1 reseptör antagonisti
RANK:	NF- $\kappa\beta$ 'nın reseptör aktivatörü
RANKL:	RANK Ligandı

OPG:	Osteoprotegerin
IL-17:	İnterlökın-17
PilT:	Twitching motility protein
Regnase-1:	Zc3h12a ve MCPIP1
Deubiquitination:	Deubikuitinasyon
PAMP:	Patojene bağlı moleküler pattern
PRR:	Özelleşmiş düzenek tanıyıcı reseptörler
CARMA1-BCL10-MALT-1 CBM kompleks	
Roquin:	Rc3h1-E3 ubikuitin ligaz
İGK:	İnsan Gingival Keratinositleri
SDS:	Sodium Dodesil Sülfat
mRNA:	Haberci RNA/Messenger RNA
cDNA:	Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
RT-qPCR:	Gerçek Zamanlı-kuantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
GAPDH:	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
DMEM:	Dulbecco modified Eagle medyasında
Ki- 67:	Hücre proliferasyonu işaretleyici proteini
MOI:	Enfeksiyon çarpanı (Multiplicity of Infection)

ÖZET

Fıratlı Y. (2022). MCPIP-1'in Diş Eti Bağışıklık Yanıtı Üzerinde Düzenleyici Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmanın hedefi, ağız bakterileri ve interlökin-1 β tarafından uyarılmış monosit kemoattraktan protein-1 tarafından uyarılmış protein 1 ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoma translokasyon proteini-1'in tek katlı insan gingival keratinositlerindeki ve organotipik oral mukozal modellerindeki mRNA ve protein salınım profillerinin değerlendirilmesidir.

Tek katlı insan diş eti keratinositleri *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β ile inkübe edildi ve ölçüldü. MCPIP-1 ve MALT-1 protein salınım seviyeleri ayrıca immünohistokimyasal olarak bir organotipik oral mukoza modelinden yararlanılarak incelendi. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Tukey düzeltmesi yöntemleri istatistiksel analizde kullanıldı. Tek katlı keratinositlerde MCPIP-1 protein salınımı *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β tarafından baskılanmıştır. Tüm deney sürelerinde yıkım *P. gingivalis*'in yıkım yarattığı görüldü ve bu yıkım bakterinin ısı ile inhibe edilmesiyle durduruldu. MCPIP-1 mRNA seviyeleri *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, ve IL-1 β tarafından yükseltildi fakat MALT-1 mRNA seviyelerinde hiçbir fark görülmedi. Diş eti keratinosit MCPIP-1'i ve MALT-1'in mRNA ve protein salınım yanıtları enfeksiyon ve enflamasyon medyatörleri tarafından düzenlenmektedir. Bu bulgular, periodontitis ile ilişkili bakterilerin MCPIP-1 ve MALT-1 yanıtlarında modifikasyonlara sebep olarak, periodontal hastalık patogenezinde rol alabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Enflamasyon, Periodontal hastalık, Patogenez, MCPIP-1, MALT-1.

Bu çalışma; Fin Milli Eğitim Bakanlığı (EDUFI), Helsinki, Finlandiya (Y.F.- Fin Hükümeti Burs Havuzu KM-20-11377), Bütünleşik Araştırma Bursu Üniversitesi, Turku, Finlandiya (Y.F.); SHS Fin Diş Hekimliği Topluluğu Apollonia, Helsinki, Finlandiya (U.K.G.), ve Minerva Kuruluşu, Helsinki, Finlandiya (U.K.G.) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Fıratlı Y. (2022). The Regulatory Role of MCP-1 on Gingival Immune Response. University of Istanbul, Faculty of Dentistry, Department of Periodontology. Doctorate Thesis, Istanbul.

The aim of this study was to evaluate oral bacteria- and interleukin (IL)-1 β induced protein and mRNA expression profiles of monocyte chemoattractant protein-1-induced protein (MCP-1) and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein (MALT-1) in human gingival keratinocyte monolayers and organotypic oral mucosal models.

Human gingival keratinocyte (HMK) monolayers were incubated with *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis* LPS and IL-1 β . The protein levels of MCP-1 and MALT-1 were examined by immunoblots and mRNA levels by qPCR. MCP-1 and MALT-1 protein expression levels were also analyzed immunohistochemically using an organotypic oral mucosal model. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's correction was used in statistical analyses. In keratinocyte monolayers, MCP-1 protein expression was suppressed by *F. nucleatum* and MALT-1 protein expression was suppressed by *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS and IL-1 β . *P. gingivalis* seemed to degrade MCP-1 and MALT-1 at all tested time points and degradation was inhibited when *P. gingivalis* was heat-killed. MCP-1 mRNA levels were increased by *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, and IL-1 β , however no changes were observed in MALT-1 mRNA levels. Gingival keratinocyte MCP-1 and MALT-1 mRNA and protein expression responses are regulated by infection and inflammatory mediators. These findings suggest periodontitis-associated bacteria induced modifications in MCP-1 and MALT-1 responses can be a part of periodontal disease pathogenesis.

Key words: Inflammation, Periodontal diseases, pathogenesis, MCP-1, MALT-1.

This study is supported by Finnish National Agency for Education (EDUFI), Helsinki, Finland (Y.F.- Finnish Government Scholarship Pool KM-20-11377), University of Joint Research Grant Fund, Turku, Finland (Y.F.), SHS The Finnish Dental Society Apollonia, Helsinki, Finland (U.K.G.), and Minerva Foundation, Helsinki, Finland (U.K.G.).

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Periodontitis, diş ve çevre dokularının enfeksiyöz karaktere sahip enflamatuvar hastalığıdır.¹ Dental biyofilm içerisindeki patojen mikroorganizmalar ile konak yanıtı arasındaki dengenin bozulması sonucunda, proenflamatuvar sitokinlerin ortamda artması ile birlikte bağ dokusu ve alveoler kemikte yıkım süreçleri başlar.² Periodontitis, tedavi edilmediği takdirde kademeli olarak ilerleyerek, dişi çevreleyen periodontal dokularının iltihaplanmasına, diş eti çekilmesine, alveoler kemik kaybına, dişlerde mobilitateye, dişlerin yer değiştirmesine ve sonuçta kaybına sebep olan kronik bir hastalıktır.

Gerekli tedavinin yapılmaması halinde bu hastalık diş kaybı ile sonuçlanmaya kadar ilerleyebilir. Periodontitis gelişen bir dokuda pek çok patolojik düzensizliğin yanı sıra, diş eti epitelinin yapısında ve bağışıklık yanıtındaki rolünde de büyük değişiklikler meydana gelir.

Epitel hücreleri ve fibroblastlar, hücre adezyon molekülleri (integrinler E-cadherin, intercellular adhesion molecule-1), İnterlökin 1 β (IL-1 β), İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α) gibi sitokinler, epidermal büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri, proteazlar (*matrix metalloproteinase* (MMP)-2,-3,-7,-8,-9,-13) ve antimikrobiyal peptidler (β -defensin, cathelicidin LL-37) gibi moleküler faktörleri salgırlarlar.³

Bakteriyel enfeksiyonlara yanıt olarak *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), IL-1 β , *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) ve Toll like receptors (TLR) agonistleri gibi çeşitli moleküllerce uyarıldıktan sonra epitel ve myeloid hücrelerde artan ZC3H12A gen ekspresyonu gözlemlenmiştir. MCP-1, monositlerin damarlardan bağ dokusuna geçişinden itibaren bağ dokusunu katederek iltihabi yanıtı düzenlemek üzere subepitelyal bölgeye göç için monosit kemotaksisini tetikleyen bir kemotaktik ajandır. *Monocyte chemoattractant protein-1-induced protein-1* (MCPIP-1), doğal bağışıklığı çok faktörlü biçimde düzenleyen ve MCP-1 etkisini baskılayarak iltihabı etkili şekilde negatif yönde düzenleyen bir protein olarak yakın zamanda tarif edilmiştir.^{3,4}

MCPIP-1, miRNA aktivitesinin baskılanmasında, biogeneze, angiogeneze, adipogeneze ve osteoklastogeneze önemli bir rol oynar.⁵ Bu protein, çekirdeğinde varsayılan nükleer lokalizasyon sinyali sekansı ve iki adet prolince zengin aktivasyon

bölgesi olduğundan ötürü ilk olarak apoptotik gen aileleri için bir transkripsiyon faktörü olarak sınıflandırılmıştır.⁵

Başka çalışmalar MCPIP-1'in ubikuitin ilişkili bölgesinin enflamasyondaki rolünü incelemiştir ve NF- κ B sinyal yolunun negatif düzenlenmesindeki rolünü ortaya koymuştur. MCPIP-1'in P1T N-terminus bölgesi RNase aktivitesi gösterir ve böylelikle enflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β , ve IL-12p40) mRNA'larını hedef alır.⁶

Son çalışmalar, MCPIP-1'in ayrıca lenfositlerde ve makrofajlarda MALT-1'in hedefi olduğunu göstermektedir. MALT-1'in MCPIP-1 aktivitesini baskıladığı belirtilmiştir. MALT-1 proteaz aktivitesinin MI-2 (bir MALT-1'in bildirilen kovalent inhibitörü) ile farmakolojik inhibisyonu, makrofajlarda MCPIP1 ekspresyonunu seçici olarak artırabilir ve LPS ile indüklenen sistemik enflamasyonu tersine çevirebilir. MALT-1 inhibitörlerinin endotel aktivasyonu üzerindeki etkisi NF- κ B sinyal yolu ile değil, MCPIP-1'in artan ekspresyonu ile gerçekleşir.⁷

MCPIP-1'in ve MALT-1'in periodontal hastalık patogenezdeki düzenleyici rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; MCPIP-1 ve MALT-1'in gen ve protein salınımının, *P. gingivalis*, *P. gingivalis* LPS, *F. nucleatum* ve IL-1 β tarafından hem tek katlı keratinositlerde hem de organotipik mukozal modellerde etkilendiğini göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gingival ve Periodontal Hastalıklar

Gingivitis, dişleri çevreleyen diş eti dokularında görülen ve doku yıkımına sebep olan iltihabi bir hastalıktır. Diş eti hastalıklarının başında gelen plağa bağlı gingivitis, diş yüzeyinde kolonize olan bakterilere karşı oluşan konak yanıtı ile başlar.²

Sağlıklı bireylerde bu mücadele kontrol altında iken, dengenin bozulması ile hasarın büyümesi ve çevre periodontal dokuların (alveoler kemik, sement, bağ dokusu ataşmanları ve diş eti) zarar görmesi durumunda periodontitise dönüşür. Apikal yönde doku kaybı görüldükçe periodontitis şiddetlenir ve ileri durumlarda diş kaybı ile sonuçlanır.⁸ Periodontitis, lokal ve sistemik faktörlerin patojen mikroorganizmalar ile konak yanıtı arasındaki dengeyi etkilediği enfeksiyöz karaktere sahip enflamatuvar bir hastalıktır. Periodontitisle ilişkili olan mikroorganizmalar antijenleri ve virulans faktörleri ile hastalığı başlatır ve yönlendirir. İltihabın ilerlemesi ile birlikte bağ dokusu ve alveolar kemik kaybı görülür.⁹ Diş yüzeyindeki biyofilm periodontal hastalık etyolojisinde çok önemli bir role sahiptir. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar hastalığın etyolojisinde çok önemli bir role sahiptir. Bazı patojenler biyofilmin patojenitesini artırır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar, epitel hücreleri arasında yayılacak değişik metabolitler salgırlar ve konak hücrelerinin davranışını değiştirirler.¹ Bakteriler ve ürünleri ile etkileşim içerisinde olan konak hücreleri ve molekülleri konak yanıtını düzenlerler.¹⁰

2.1.1. Plağın Geçirdiği Değişimler ve Biyofilm Oluşumu

Katı ve nemli bir yüzeyde hücrelerin sıklaşması ve tutunması sonucu oluşturdukları tabakaya mikrobiyal dental biyofilm adı verilir. Mikrobiyal dental biyofilm oluşumu pelikülün oluşmasıyla başlar. Ağızdaki sert ve yumuşak dokuların yüzeyi, temizlenmelerini izleyerek temel olarak glikoprotein yapısında bir tabaka ile kaplanmaya başlar. Yumuşak doku yüzeylerinde keratinizasyon nedeni ile yoğun bir bakteri kolonizasyonu gözlemlenmezken sert doku yüzeylerinde pelikül mikrobiyal dental plağın oluşması için uygun bir ortam hazırlar. İzleyen süreçte öncelikle gram pozitif

fakültatif bakteriler pelikula tutunmaya ve yerleşmeye başlarlar. Pelikül artık mikroorganizmaları da içeren mikrobiyal dental plağa dönüşmeye başlar. Başlangıçta gram pozitif aerob mikroorganizmalar egemenken, zaman içerisinde bu mikroorganizmaların üzerine tutunan gram negatif anaeroblar ile birlikte mikrobiyal dental biyofilmin yapısı değişmeye başlar. Pelikül üzerine tutunamayan ama sekonder olarak koagregasyon ile ortama yerleşen bu bakteriler arasında *Fusobacterium nucleatum* (Fn) ve *Poryphoromonas gingivalis* (Pg) öne çıkar.¹¹

Dental biyofilm, minenin insizal ve orta 1/3'lük kısmında dil hareketleri ve beslenmenin mekanik kuvvetleri ile ortadan kaldırılırken; minenin apikal 1/3'lük kısmında ve diş eti oluşunda daha rahat tutunur ve besin artıklarından zengin bu kısımlar bakteriler için ideal koloni bölgelerini oluştururlar.¹²

2.1.2. Bakterilerin Patogenezdaki Rolü

Oral kavitede bulunan bakteri türleri, planktonik formda dokularda barınamamaktadırlar ve ancak bir yüzeye tutunup koloni oluşturarak varlıklarını sürdürebilirler. Bakteriler arasındaki mücadele ve her bireyin sahip olduğu farklı bağışıklık yanıtının sonucu olarak bireyden bireye patolojik içeriği farklı olsa da biyofilm yapısı benzerlik gösterir.

Periodontitis etyolojisinde mikrobiyolojik olarak rol oynayan en önemli bakteriler gram negatif, fakültatif ve zorunlu anaerobik bakterilerdir (*P.gingivalis*, *F.nucleatum*, *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *T.denticola*, *T.forsythia*, *C.rectus*, *E.corrodens*, *P.micros*).¹³⁻

15

Mikroorganizmaların etkisi ön planda olmasına rağmen periodontal hastalıkların patogenezi ve bu süreçte mikroorganizmaların rolü hala tüm yönleri ile anlaşılamamıştır.¹⁶ Bağışıklık sistemini kontrol eden genetik etkiler sonucu yetersiz konak yanıtı, çevresel ve sistemik risk faktörlerinin, periodontopatojen mikroorganizmaların ortamda egemenlik kazanması sağlıklı bir diş etine sahipken, önce gingivitisin başlaması ardından bir grup kişide gingivitisin periodontitise dönüşmesi mikrobiyal dental biyofilmi etkileyen epigenetik değişimler sonucudur.^{17,18}

2.1.3. *F.nucleatum*

F. nucleatum Gram-negatif, spor yapmayan, hareketsiz anaerobik bir patojendir.¹⁹ Adeziv özelliği ile ön plana çıkan *F.nucleatum*, periodontal hastalığın şiddetlenmesine sebep olan süreçte *P.gingivalis* kolonizasyonuna yol açarak köprü görevi görür. *F. nucleatum* aynı zamanda insan vücudundaki epitel ve endotelyal hücreler, monositler, eritrositler, fibroblastlar, konak molekülleri (tükürük makromolekülleri, ekstrasellüler matriks proteinleri vs.) dahil olmak üzere çeşitli hücrelere bağlanır.²⁰

Diş eti oluşunun yumuşak doku duvarını örten epitel hücreleri ile subgingival bölgede bulunan çok sayıdaki kommensal (örneğin *F.n.*) ve patojenik (örneğin *P.g.*) mikroorganizma spektrumu geniş ve çok değişken bir ilişkiler ağına sahiptir. Konak hücrelerini enfekte eden bakteriler, konak hücrelerinde bir yanıt oluştururken, bakterilerde konak hücrelerinin yanıtını manipüle etmeye çalışırlar.²¹

P.g. ve *F.n.* bir arada simbiyotik bir etkileşime sahiptir.²² *F.n.* aside duyarlı bir mikroorganizma olan *P.g.* için gereken koruma kalkanını oluşturur.²²⁻²⁴ Ayrıca *P.g.* 'nin gelişmesi için gereken kapnofilik ortamı oluşturmamasının yanı sıra ortamdaki oksijen ve hidrojen peroksidi de metabolize ederek ve karbondioksit salımını artırarak uygun mikro çevreyi hazırlar.^{22,25}

F.n. içerdiği FadA adezini ile hücre bağlantı molekülü olan kadherinlere tutunur ve vücuttaki pek çok dokuyu enfekte eder. Bu bağlanma hücre-hücre bağlantılarının hücreler arası kısımlarında gerçekleşir ve endotelyal seviyede geçirgenliği artırır. Böylelikle FadA hem doğrudan konak hücrelerin istilasına hem de hücre çevresi bağlantıların gevşemesi sonucu hücre çevresi enfeksiyona sebep olur.¹⁹ *F.n.* yüzeyinde bulunan adhesinler ile pek çok mikroorganizmanın koagregasyonu için uygun ortamı hazırlar.^{26,27} Böylece sınırlı adhesine sahip diğer oral bakterilerin biyofilme ve oral dokulara tutunma kapasitelerini artırır.²⁸ *P.g.* yüzeyindeki galaktosid parçacıkları *F.n.* yüzeyindeki lektin ile tutunarak koagregasyonda görev alırlar.^{22,29} *F.n.* daha düşük yıkıcılık düzeyinde bir yanıt oluştururken buna karşılık *P.g.* daha yıkıcı bir yanıt geliştirir³⁰.

2.1.4. *P.gingivalis*

Gram-negatif bir anaerob olan *P.gingivalis*, sağlıklı bireylerde konağa adapte olmuş bir patojen gibi diş eti oluşunda bulunabildiği³¹ gibi, kronik ve şiddetli düzeyde periodontal hastalıklarda sıkça görülür³². *P. gingivalis* subgingival bölgede kendisine uygun bir ortam hazırlar ve diş eti oluşunun yumuşak doku duvarını oluşturan konak epitel hücreleri karmaşık bir moleküler diyalog gerçekleştirir.³³ *P.gingivalis*, biyofilmi disbiyotik yönde değiştirir. Hem *P. gingivalis* hem de diş eti epitel hücrelerinin birlikte yaşama adaptasyonu genom çapında bir ölçekte gerçekleşir.³³⁻³⁵ *P. gingivalis*'in eksprese edilen proteomunun yaklaşık %40'ı epitel hücreleri içinde içselleştirme ile modüle edilir.³⁶ Diş eti epitel hücrelerinde, birkaç bin gen, *P. gingivalis* ile enfeksiyonun ardından farklı şekilde eksprese edilir; bu durum *P. gingivalis*'e uyarlanmış bir yanıttır ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, veya *Streptococcus gordonii* bu özelliğe sahip değildir.^{33,35}

Hastalığa yatkın bireylerde bu değişim periodontal dokuların yıkımına sebep olur ve hastalığın şiddetlendiği, konak yanıtının kontrolden çıktığı ve doku kaybının ivme kazandığı bir yıkım görülür^{37,38}. *P.gingivalis*'in başlıca mekanizmaları gingipainleri ve protein sisteazlarıdır (RgpA, RgpB, and Kgp). Bu moleküllerin yardımı ile konak yanıtını devre dışı bırakır.³⁹

P.g. kapsülü *F.n.* ile birlikte oluşan enfeksiyonda özgün bir virülans faktörü olarak görev yapar. Kapsüle bağlı koagregasyon *P.g.* invazyonunun artmasına neden olarak karma enfeksiyonda önemli bir rol üstlenir.²² *P.g*'nin ürettiği lökotosin ile nötrofillerin kemotaksis yanıtını baskılar.⁴⁰ *P.g*'nin sentezlediği tripsin benzeri bir proteaz olan olan gingipain konak proteinlerini proteolitik etkileri ile denatüre ederek bağışıklık yanıtını zayıflatır.^{41,42} Oral epitel hücrelerinin *P.g* ile karşılaşmaları sonucunda IL-6 sentezlenmesini izleyerek periferik kandan ortama gelen mononükleer hücreler monosit kemotatraktan protein-1 (MCP-1) ve interlökin-8 (IL-8) salgılar. Gingipainler, aynı zamanda endotel hücrelerinden salgılanan MCP-1 ve IL-8'in yıkımına yol açar.⁴¹ *P.g.* ve diğer patojenlere karşı konak savunma mekanizması gelişirken bir yandan da doku yıkımı gelişir. Patojenlere karşı makrofajlarımız ve nötrofillerimiz başta olmak üzere savunma sistemi hücrelerimiz ortama IL-1 salınımını artırır. IL-1 aynı zamanda kollagenaz

yapımını tetikler. Bakteri kökenli kollajenazın yanısıra konak kökenli kollajenaz birlikte hareket ederek bağ dokusu yıkımını başlatırlar.⁴³

P.g proteinazlarının periodontal bağ dokusunun majör komponentlerinden tip I ve tip IV kollajenini, ayrıca ekstraselüler matriks proteinlerini yıktığı gösterilmiştir. *P.g* konak hücrelerinden fibroblastlar tarafından salgılanmakta olan kollajen, fibronektin ve laminini yıkma yeteneğine sahip olan pek çok matriks metalloproteinaz (MMP)'ın ortaya çıkışını sağlar.⁴⁴ MMP'ler gelişen periodontal cep içine bakteri girişine yanıt olarak üretilirler. Artan bakteri sayısı ve bunların metabolik son ürünlerine karşı kontrol dışı bir doku yanıtı gelişir ve enflamasyon artar. *P.g*'nin periodontitis gelişim aşamasında TIMP-1'i etkisiz hale getirdiği ve tip I kollajenin yıkımında rol aldığı gösterilmiştir.⁴⁴ *P.gingivalis* ayrıca MMP-2 ve MMP-9 üretimini de indükler.⁴⁰ *P.gingivalis* fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolağını aktive ederek diş eti epitel hücrelerinde apoptozu baskılayarak, bir subkutan ortam modelinde kendisinin ve kendisiyle birlikte *F.nucleatum*'un hücre içinde canlılığını korumasını sağlar.^{43,45}

2.1.5. Konağın yanıtı

Periodontal hastalıklarda patojen mikroorganizmalara karşı ilk savunma tükürükte bulunan salgısal immunglobülin A (sIgA) ve lizozomal enzimler tarafından gerçekleştirilir. Ardından diş eti oluğu sıvısında bulunan nötrofiller ve immunglobülin G (IgG) mikroorganizmalara karşı devreye girer. Periodonsiyumun doğal konak savunmasında epitel ve bağ dokusu bariyer görevi üstlenir. Epitel hücreleri bir yandan bariyer görevi görürken bir yandan da örttükleri bağ dokusuna konak bağışıklık yanıtı için gereken sinyalleri gönderir. Ayrıca epitel hücreleri arasında yer alan dentritik hücreler bağışıklık sistemi hücreleri için antikor sunan hücre fonksiyonu görürler. Epitel hücreleri tarafından bağ dokusuna doğru salgılanan sinyal molekülleri içerisinde IL-8 önemli bir rol oynar.⁴⁶

Vücudumuzun bu patojenlere karşı ilk savunma yanıtı epitel hücreleri ve nötrofiller tarafından oluşturulur. Diş eti epitel keratinositleri ve altındaki bağ dokusu tabakasının fibroblastları salgıladıkları moleküller ve bu moleküllerin oluşturdukları sinyal kaskadları ile (IL-1, IL-8, TNF-a, matriks metalloproteinazlar, tümör nekroz

faktörleri, çekirdek faktörü kappa-B, patojen ve hasar ilişkili moleküler paternler, patern tanıma reseptörleri, MCP-1, MCP-1, MALT-1) bireyin verdiği konak yanıtını oluşturur.

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) bağışıklık yanıtının oluşması ve devamında önemli bir rol oynar.^{47,48} MCP-1 periodontal enflamasyonun en önemli belirteçlerinden birisidir.^{49,50}

Periodontitis, patojen mikroorganizmalar ve konak yanıtı arasındaki dengenin lokal ve sistemik faktörler tarafından etkilendiği enfeksiyöz karaktere sahip enflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın ilerlemesi ve şiddetlenmesinde önemli rol oynayan faktörlerden birisi olan konak bağışıklık yanıtı, hastalığı başlatan birincil etken olan mikrobiyal dental plaktaki mikroorganizmalara karşı oluşur. Bağ dokusu ve alveol kemiği yıkımı ile sonuçlanan süreç, mikrobiyal dental plak- biyofilm ve konak bağışıklık sistemi arasındaki dengenin bozulması, proenflamatuvar sitokinlerin salınımının artması ile başlar.¹

Periodontal yıkımda baskın rolü olduğu düşünülen sitokinlerden birisi IL-1 β 'dir. IL-1 salınımı lipopolisakkarit, endotoksin gibi mikrobiyal ürünler tarafında stimüle edilir. Aynı zamanda IL-1'in kendisi de makrofajlardan IL-1 salınımını indükler. IL-1'in kemoatraktan özelliğinden etkilenen lökositler, T ve B lenfositleri ve antijen sunucu hücrelerini direkt veya dolaylı olarak uyarabilir. Diş eti oluşu sıvısında (DOS) incelendiğinde artmış IL-1 seviyesi ile gingivitis oluşumu ve şiddetli periodontitis arasında ilişkili bulunmuştur.^{2,51}

IL-1 β bağ dokusu ve kemik dokusunun yıkımında önemli bir rol üstlenir.⁵² Diş eti oluşu sıvısında artmış IL-1 α ve IL-1 β düzeyleri periodontal hastalık aktivitesi ile ilişkilidir^{53,54}. IL-1Ra (IL-1 reseptör antagonisti) gibi antienflamatuvar sitokinler ile dokulardaki kontrolsüz yıkım ve proenflamatuvar sitokinlerin biyolojik aktiviteleri baskılanmaktadır.⁵⁵

Kronik enflamatuvar süreçler sonucunda konağın oluşturduğu bağışıklık yanıtı, periodontitislerin seyrindeki kritik aşama olan bağ dokusu ve alveolar kemiğin yıkımıdır. Yıkım mekanizmalarının anlaşılması, periodontal hastalıkların tedavisinde, terapötik ve koruyucu yaklaşımların geliştirilmesinde büyük önem taşır. Konvansiyonel tedavi

mekanizmalarına ek olarak konak savunma mekanizmasını modifiye eden tedavi arayışları artmaktadır.⁵⁶

Konak yanıtının periodontal yıkımdaki rolü oldukça karmaşıktır ve hala tam olarak aydınlanmamış birçok mekanizmanın olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda “osteoimmünoloji” olarak ifade edilen ve immün sistem ile kemik metabolizması arasındaki ilişkiyi inceleyen bir kavram ya da araştırma alanı üzerinde yoğunlaşmıştır. Osteoimmünolojinin anlaşılmasının; kemik rezorpsiyonu ile ilgili immunopatolojik mekanizmaların ortaya çıkarılmasına ve tanı ve tedaviye yönelik yeni bakış açılarına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.⁵⁷ Bu kavramdan hareketle, özellikle osteoklast fonksiyonu ile ilişkili, periodontitisin de dahil olduğu çeşitli kemik hastalıklarının kontrolünde 3 önemli molekülün keşfi dönüm noktası olmuş, kemik metabolizması ve kemik yıkımı ile ilgili araştırmalar yeni bir boyut kazanmıştır. Bu moleküller: Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ailesinin üyelerinden olan, NF- κ B’nin reseptör aktivatörü RANK, onun ligandı RANKL ve RANKL’ı inhibe eden OPG’dir. Aynı zamanda, konağın immün-enflamatuvar yanıtı sonucu ortaya çıkan proenflamatuvar sitokinlerin de periodontal kemik yıkımından sorumlu oldukları düşünülmektedir.⁵⁸ IL-6, osteoklastik aktiviteyi, osteoblastik ve osteoklastik etkileşimleri artırır. Yüksek orandaki IL-6 oranları kemik rezorpsiyonunu artırırken, fizyolojik miktarlar diğer sitokinlerle etkileşim içinde olmadığı sürece bu işlevi görmezler.⁵⁹ IL-6’nın artmış oranları, RANKL oranlarını da artırmaktadır.

IL-17, RANKL salınımını artırır ve beraberinde OPG salınımını da azaltır. Bu durumda osteoklast formasyonunu artırarak, kemik yıkımına sebep olur.⁶⁰

Günümüzde periodontitislerin patogenezinin anlaşılması için kemik yıkımında yer alan mediatörler ve sitokinlerin araştırılması devam etmektedir.

2.2. MCP-1

Diş eti keratinositlerinin salgıladığı moleküllerden bir tanesi de monosit kemotaktik protein-1 ile indüklenen protein-1’dir (MCP-1). Bu RNase molekülü hücre içinde bulunan mRNA miktarını dengeler. MCP-1’e diş eti keratinositleri dışında

kardiyak miyositlerinde, primer hepatositlerde, kemik iliği hücrelerinde, romatoid artrit hastalarının fibroblastları gibi dokularda da rastlanılabilir.

Monosit kemoatraktan proteini ile indüklenen protein-1 (MCPIP-1), patojenlere karşı enflamatuvar yanıtı inhibe eden ve makrofaj enflamasyonunun, bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonunun ve ayrıca endotelial aktivasyonun ana kontrolörü olarak görev yapan bir konakçı enflamatuvar yanıt sitokin RNase'dır.^{6,61-63}

MCPIP-1'in ilk tanımı bakteriyel endotoksin sinyalleşmesinin negatif regülatörü olduğu yönündedir ve interlökin 1 beta (IL-1 β) and IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinlerle bağlantılıdır.^{4,7,10,64}

Başka çalışmalar MCPIP-1 proteininin çinko bazlı bir ucu olduğunu (CCCH) ve P1T N-terminal nükleaz bölgesi olduğunu göstermiştir.⁶⁵

Regnase-1 olarak da adlandırılan MCPIP-1, ubiquitin bağlayıcı ve RNase benzeri PIN alanlarından oluşan çok alanlı bir proteindir. Her iki alan da MCPIP-1'in anti-enflamatuvar fonksiyonunun çok önemli belirleyicileridir. Deubikuitinasyon işlemine katılımı, LPS ve IL-1 aile indüklenen NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonunu sağlarken Ayrıca MCPIP-1, hücre farklılaşması, osteoklastogenez, anjiyogenez, adipogenez ve hücre ölümü süreçlerinde rol oynuyor gibi görünmektedir.⁶⁶

Çinko ucu MCPIP-1'e nükleik asitlerle bağlanma özelliği katarken, PIN bölgesi de sitokin kodlayan transkriptlerin sürekliliğinden ve RNase aktivitesinden sorumludur. (IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-12p40)^{50,65-69}

MCPIP-1 aynı zamanda deubikuitinaz aktivitesi ile proteinlerden ubiquitin moleküllerini ayırabilir ve JNK ile NF- κ B sinyal yollarını sekteye uğratabilir.⁷⁰

Bu fonksiyonlar MCPIP-1'in anti enflamatuvar özelliklerini gösterirken enfekte dokuların homeostazında önemli bir rol oynadığını da vurgular.

2.3. Lenfoid doku lenfoma translokasyon proteini (MALT)-1

Diş eti, mikroorganizmalar tarafından penetre edildiğinde ve konak yanıtı oluşmaya başladığında konağın hücreleri bakterileri tanıyan patojen tanıyıcı moleküler *düzenekler* (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)), ve özelleşmiş düzenek tanıyıcı *reseptörler* (*specialized pattern recognition receptors* (PRRs)) sayesinde ilk yanıtı oluşturmaya başlar.⁶

Enflamasyonun kontrol altına alınması için diş eti dokularında PRR sinyalinin düzenlenmesi gerekmektedir fakat bu dokular oral kavitede devamlı bakteriye maruz kalmaktadırlar.

Düzenleyici görevi diş eti keratinositleri üstlenirler ve iltihabi durumdan fırsat bilen periodontal patojenlerin çoğalmasını sınırlandırır.⁸

PR diş eti keratinositlerinin salgıladığı moleküllerden bir tanesi de monosit kemoattractant protein-1 ile indüklenen protein-1'dir ((MCPIP)-1). Bu RNase molekülü hücre içinde bulunan mRNA miktarını dengeler.⁶⁶ Bu molekülün faaliyeti *Zc3h12a* geninin ürünü olarak ve MCP-1 tarafından indüklenen bir faktör olarak tanımlanmıştır. Monositleri ve makrofajları bölgeye çağıran bir kemoatraktandır ve kronik enflamatuvar durumlarda görülür.^{65,66}

MALT-1 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) bağışıklık sistemi hücrelerinde sinyal iletimi için kritik olan bir CARMA1-BCL10-MALT-1 signalosomunun bir bileşenidir. Son çalışmalar, MALT-1'in ayrıca, enflamatuvar sinyalleme için negatif düzenleyicilerini parçalayarak bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna katkıda bulunduğu, arginin-spesifik bir proteaz olarak da hareket ettiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra, MCPIP-1'in ayrıca lenfositlerde ve makrofajlarda MALT-1 proteazının bir hedefi olduğunu göstermektedir. MALT1 proteaz aktivitesinin MI-2 (MALT-1'in bildirilen bir kovalent inhibitörü) ile farmakolojik inhibisyonu, makrofajlarda MCPIP1 ekspresyonunu seçici olarak artırabilir ve LPS ile indüklenen sistemik enflamasyonu tersine çevirebilir.^{63,71}

Regnase-1 ve Roquin'in MALT-1 tarafından proteolitik inaktivasyonu, sitokinleri ve diğer aktivasyon mediatörlerini kodlayan mRNA'ların stabilizasyonuna yol açar. MALT-

1'in proteaz aktivitesinin bağışıklık tepkisi için biyolojik önemi, MALT-1'in katalitik olarak inaktif bir formunu eksprese eden fareler ile yapılan son çalışmalarla adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinde önemli eksiklikler olduğu vurgulanmıştır.⁷²

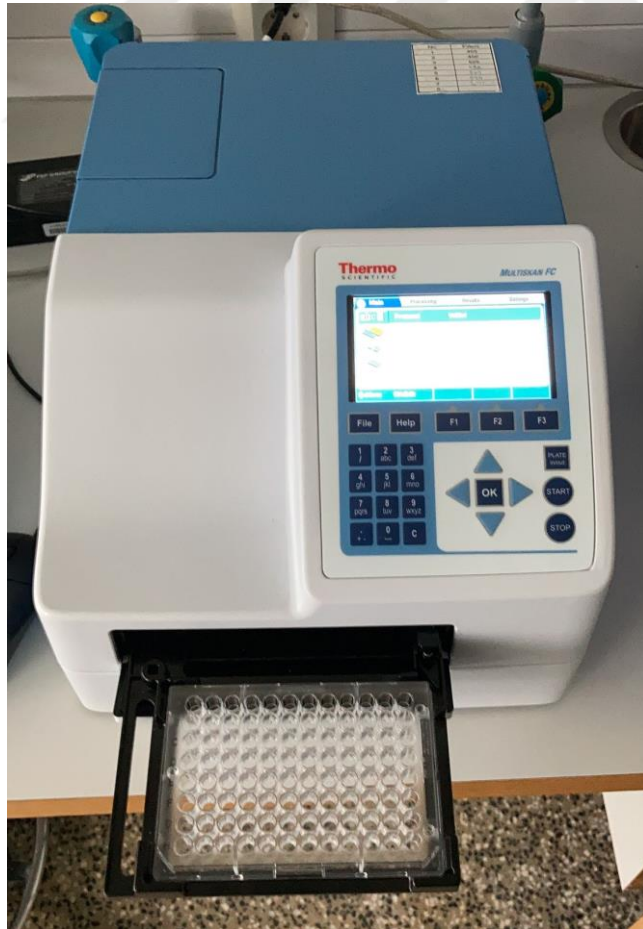


3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İnsan Gingival Keratinosit Hücre Kültürü

Finlandiya Helsinki Üniversitesi'nden Dr. M. Mäkelä tarafından sağlanan, sağlıklı insan diş eti epitel dokusundan biyopsi yöntemi ile elde edilmiş olan insan gingival keratinositleri (İGK) ile hücre kültürü yapıldı.⁷³

İnsan gingival keratinosit hücre serisi keratinosit serumu içermeyen fakat rekombine insan epidermal büyüme faktörü ve sığır hipofiz özü ve antibiyotik (100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin) (Kat. no. 15140-122; Gibco, Bethesda, MD, ABD) içeren medya ile 37°C sıcaklıkta ve 5% CO₂ yoğunluğunda 75 cm² lik hücre kültürü şişelerinin içinde inkübatörde büyütüldü (Resim 2 & Resim 3).



Resim 1. Spektrofotometre



Resim 2. Hücre Kültürü Biyogüvenlik Kabini



Resim 3. Hücre Kültürü Yapılan Özel Şişeler

Keratinosit kültür medyası haftada üçer sefer taze medya ile değiştirildi ve İGK hücreleri %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında haftalık pasajları gerçekleştirildi.

3.2. Bakteri Kùltürü

Bütün deneylerde eski adıyla Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü olan Fin Sağlık ve Refah Enstitüsünün Anaerob Referans Laboratuvarından temin edilmiş *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) ve *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), bekletildiği -70°C sùt tozu stoklarından alınıp, 5 mg L⁻¹ hemin ve 10 mg L⁻¹ K1 vitamini içeren Brucella kan agarı plakalarına ekildi (Resim 5). Brucella agar plakaları anaerobik odacıkta (Whitley A35 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific Ltd., West Yorkshire, UK) %10 H₂, %5 CO₂ ve %85 N₂ gazları içeren ortamda 37 °C atmosferde 72 saat büyütüldü (Resim 4). Saf kùltür elde edilebilmesi için her 3-4 günlük büyüme döngüsünde belirgin bakteri kolonileri yeni agar plakalarına taşındı ve aynı inkübasyon koşulları korunarak devamlılık sağlandı. Tüm deneylerde bakterilerin fosfat tampon solüsyonlarında bekletildikleri süspansiyon solüsyonlar oluşturuldu ve solüsyon yoğunlukları 0.6 optik densiteye ayarlandı (*P. gingivalis* için 670 nm’de 3x10⁸ CFU/mL ve *F. nucleatum* için 620 nm’de 6x10⁸ CFU/mL.).



Resim 4. Bakteri Kùltürü Oksijensiz Ortamı

3.3. *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β Stok Solüsyonlarının Hazırlığı

P. gingivalis LPS ultra-saf stok solüsyonu (1 mg/mL), 1 mg ultra-pure *P. gingivalis* LPS'in (Cat #tlrl-pgglps Invivogen, San Diego, ABD) 1 mL endotoksinsiz suda çözündürülmesi ile oluşturuldu. IL-1 β stok solüsyonu (100 μ g/mL), 100 μ g IL-1 β 'nın (Recombinant Human IL-1 β cat # RH-P0168 Genemed Sytnthesis Inc., San Antonio, Texas, ABD) 1 mL endotoksinsiz suda çözündürülmesi ile oluşturuldu.



Resim 5. Bakteri Agar Besiyeri



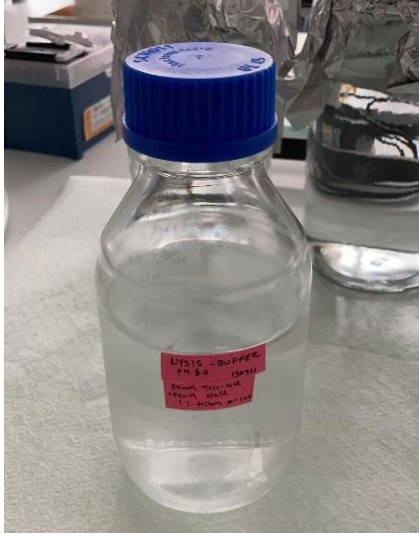
Resim 6. Sekonder Antikorlar

3.4. Tek Katlı Keratinositlerin Bakteri, *P.g.* LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu

Diş eti epitel hücreleri (her kuyucukta 3×10^5) 12 kuyucuklu plakalarda (Corning Inc., Corning, NY, ABD) inkübe edildiler (Resim 13). Hücreler kuyucuk yüzeyine yüzde 80-90 oranında yayıldıklarında üçer kere fosfat tamponlu solüsyon ile yıkandılar ve taze DMEM medya eklenmesini takiben *P. gingivalis* (1×10^7 CFU/ml), *F. nucleatum* (1×10^7 CFU/ml) Pg LPS (1 μ l/ml, InvivoGen, San Diego, CA, USA) veya IL-1 β ilave edildi, böylelikle her hücrenin sayıca 50'şer ve 100'er katı kadar bakteri ile deneylere başlandı (Resim 12). Ayrıca İGK hücreleri ısı ile öldürülmüş (95 derece sıcaklıkta 5 dakika) *P. gingivalis* (MOI 1:100) ve serin ve sistein proteaz içeren (7 mL'de 50 mg) *P. gingivalis* solüsyonları ile inkübe edildiler. Kontrol grubu hücrelerine sadece taze hücre medyası konuldu. 2,6 ve 24 saat (10% H₂, 5% CO₂, and 85% N₂ ortamı) inkübasyon sürelerinin ardından, her kuyucuktaki medya toplandı ve hücreler üçer kere FTS ile yıkanıp 200 μ L lik lizat tamponu (Tris-HCl pH 7.4) ilave edildi, dakikada 250 tur dönen karıştırıcıda 10 dakika boyunca bekletildiler (Resim 8). Hücreler kazınarak hareketli hale getirildi ve lizatlar eppendorf tüplerine toplanıp ultrasondan geçirildi. İmmünoblot analiz aşamalarında kullanılmak üzere -70 °C'lik derin dondurucuda saklandılar (Resim 7). Bir başka hücre grubuna kazıma işleminden sonra Trizol (1 mL, Invitrogen.Cat. No 15596-018 CA, ABD) eklendi ve lizatlar eppendorf tüplerine konarak mRNA izolasyonunda kullanılmak üzere -70 °C'lik derin dondurucuda saklandılar.



Resim 7. -70 °C Derin Dondurucu ve Bradford Testi Çözeltisi



Resim 8. Lizis Tampon Çözeltisi

Bu deneylere paralel olarak *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 'nın hücre canlılığına etkisinin kontrolü için benzer bir grup hücre kültürü yetiştirildi ve canlılık kiti (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, WI, ABD) eklendi.

3.5. MCP-1 ve MALT-1 Protein Salınımının Değerlendirilmesi ve İmmünoanalizleri

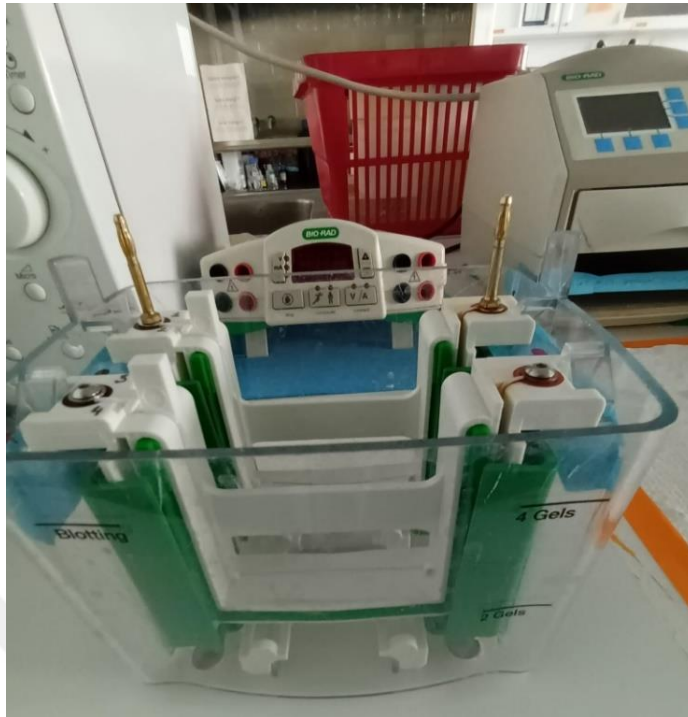
Her örneğin protein seviyesi Bradford methodu (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) ve SkanIt™ Mikroplaka Okuyucu Yazılımı (Katalog numarası: 5187139 Thermo Scientific™, Danimarka) yardımı ile tespit edildi (Resim 9).

Toplanmış olan hücre lizatlarındaki MCP-1 ve MALT-1 protein seviyesi analizi için Western blot yöntemi kullanıldı. Laemmli tampon solüsyonu (Katalog, #1610747, Bio-Rad, ABD) ve merkapttoethanol (Lot #17H1247 Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Almanya) sırasıyla 9'a 1 oranında karıştırıldı ve her örnekten eşit miktarda protein eklendi. Sonrasında bu örnek karışımları 95°C'de 5'er dakika boyunca ısıtılarak protein yapısı bozuldu. Örnekleri birbirlerinden ayırmada Sodium Dodesil Sülfat (SDS) – ve yoğunluğu %15 olan Sodyum poliakrilamid jeller kullanıldı (Resim 10). Elektroforez

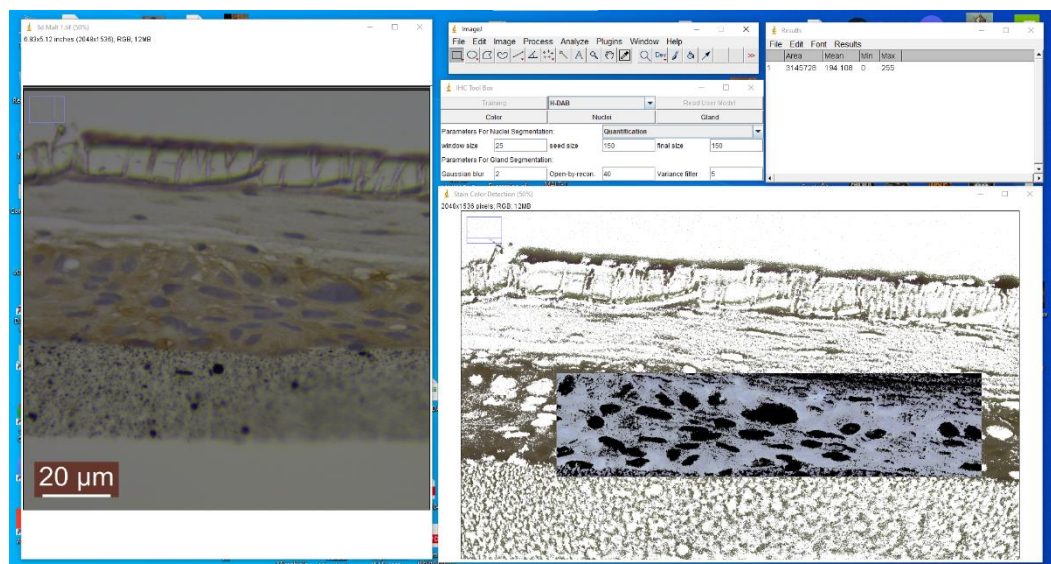
aşamasında sonra proteinler membranlara (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi, Bio-Rad, CA, ABD) taşındı ve 1 saatlik blotun ardından gece boyunca +4 derecede MCP-1 ve MALT-1 primer antikor'ları ile inkübe edildiler (MCP-1; 1:750 seyreltme, # PA5-24458; Thermo Fisher, ABD ve MALT-1; 1:1000 seyreltme, # PA5-79622; Thermofisher, Çin Halk Cumhuriyeti). Sekonder Antikor aşaması için membranlar seyrekliği 1:10.000 olan goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Katalog no. # 31460; Thermo Fisher, ABD) antikor ve StrepTaktin-Horse radish peroksidaz (HRP) eşleniği (1:10000 seyreltme # 1610381; Institut für Bioanalytik GmbH, Almanya) ile de 1'er saat inkübe edildiler (Resim 6 & Resim 15). HRP tespiti Novex® ECL Chemiluminesant Substrat Reagent Kiti ile (Invitrogen, CA, ABD) yapıldı ve bantlar ChemiDoc™ MP Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, CA, ABD) yardımıyla tarandı. Protein yüklemesinin eşitliğinden emin olmak için blotlar anti- β -aktin antikor ile de boyandı (1:10000, # PA1 16889, Thermo Fisher, ABD). Yoğunluk analizi için ticari ImageJ yazılımı (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, ABD) kullanıldı ve bütün çalışmalar üçer kere üçerli olarak tekrarlandı (Resim 11).



Resim 9. Bio-Rad Mikroplaka Okuyucu



Resim 10. SDS-PAGE Tankı



Resim-11. ImageJ Programı

3.6. MCPIP-1 ve MALT-1 Gen Ekspresyonunun Tespiti

Trizol (Invitrogen) yardımı ile bütün RNA, hücre lizatlarından çıkarıldı, bu çıkarılan RNA'nın saflığı ve konsantrasyonun tespiti için Nano Drop Lite Spektrofotometre (Resim 1) (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandiya) kullanıldı.

İlk cDNA ipliği, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. no. 04379012001; Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak 500 ng'lık RNA'dan sentezlendi. RT-qPCR reaksiyonları, 2 µL'lik şablon cDNA, 1 µL'lik gen spesifik primer-prob karışımı (MCPIP-1: Hs00962356, MALT-1: Hs01120060, Thermo Fisher, USA) ve 10 µL FastStart Essential DNA Probes master karışımı (Roche, Mannheim, Germany) ile 20-µL hacimde yapıldı. Kontrol gen olarak GAPDH kullanıldı.

Reaksiyonlar Light Cycler 96 (Roche) içinde, başlangıç denatürasyonü 95 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 30 saniye ve 60 °C'de 30 saniye olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirildi. Bütün reaksiyonlar üçer kez tekrarlandı ve ekspresyon seviyeleri delta Ct methodu ile analiz edildi.

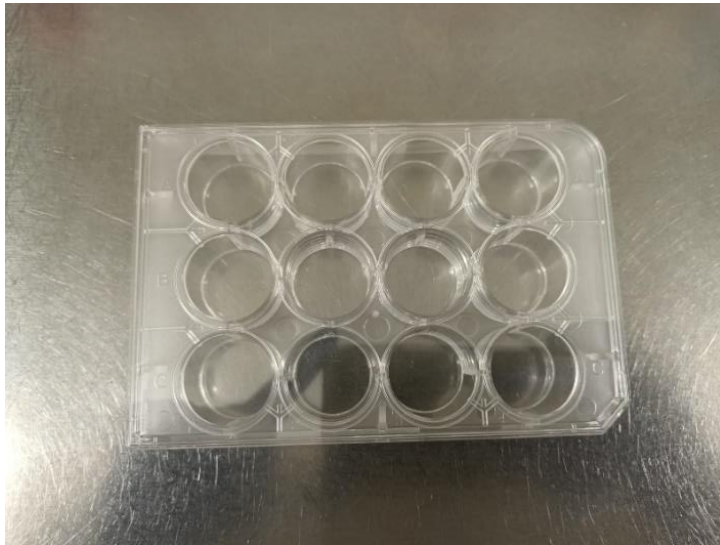
3.7. Organotipik Diş Eti Epiteli Modelinin Oluşturulması

Diş etini temsil eden üç boyutlu oral mukoza modeli geçmiş literatürde tanımlanana yöntemle göre oluşturuldu.⁷⁴⁻⁷⁶ Kısaca, sağlıklı insan biyopsi örneklerinden elde edilen diş eti keratinositleri ve fibroblastları (Keratinositler⁷³ ve fibroblastlar⁷⁶ %10 cenin buzağı serumu, %1 temel amino asit ve antibiyotik içeren Dulbecco modified Eagle medyasında (DMEM) 37°C'de %5'lik CO₂ 'li ortamda yetiştirildi.



Resim 12. DMEM Ortamı, PBS Çözeltisi ve Tripsin

Çok katlı kültür modelinin oluşturulabilmesi için insan diş eti fibroblastları $3 \times 10^5/\text{mL}$ yoğunluğunda kolajen solüsyonlarının içinde (Vitrogen, Cohesion technologies, CA, ABD) askıda bekletildi ve daha sonra 10 mm'lik kültür insertlerine (ThinCert, Greiner Bio-One, LA, ABD) kondu. On iki kuyucuklu plakalara taşındı ve katılaşması için 24 saat beklendi.



Resim 13. On İki Kuyucuklu Plaka



Resim 14. Hücre Kültürü İnkübatörü

Kültürü yapılan insan diş eti keratinosit hücreleri kollajen-fibroblast jellerin üzerine ekildi. Hücrelerin yaygınlaşmasının ardından kültürler sıvı-hava geçiş seviyesine kadar yükseltildi ve yedi ila on dört gün boyunca büyütüldü. Diş eti keratinositleri kolajen-fibroblast jellerin üzerine yoğunlukları $8 \times 10^5/\text{mL}$ olacak şekilde serpildi ve hücreler çoğalarak kalabalıklaştıklarında insertler metal ızgaraların üzerine yerleştirildiler, böylelikle hava-sıvı arayüzü sağlanmış oldu. Modelin bu halinin de 14 gün büyümesi beklendi. Kültürler 37°C nemli bir atmosferde (95% hava ve 5% CO_2) deneylerden önce 7 gün inkübe edildiler.

3.8. Organotipik Diş Eti Epiteli Modelinin Bakteri, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu

Organotipik oral mukoza modeli nitrosellülöz filtreden (MF-Millipore™, Katalog no # HABP02500, Tullagreen Carrigtwohill Co. Cork, İrlanda) damlatılan *P.gingivalis* (3×10^6 CFU), *F. nucleatum* (3×10^6 CFU), *P. gingivalis* LPS

(10 ng) ve IL-1 β (150 pg) ile uyarıldı. 39⁷⁷ Sadece membran içeren bir grup model kontrol grubu olarak hazırlandı. İki saatlik inkübasyondan sonra modeller %10 formalin içeren fosfat tampon solüsyonuna sabitlendi ve -20°C'de gece boyunca bekletildikten sonra parafinin içine gömüldü.

3.9. Organotipik Diş Eti Epitel Modelinin İmmünohistokimyasal İncelemesi

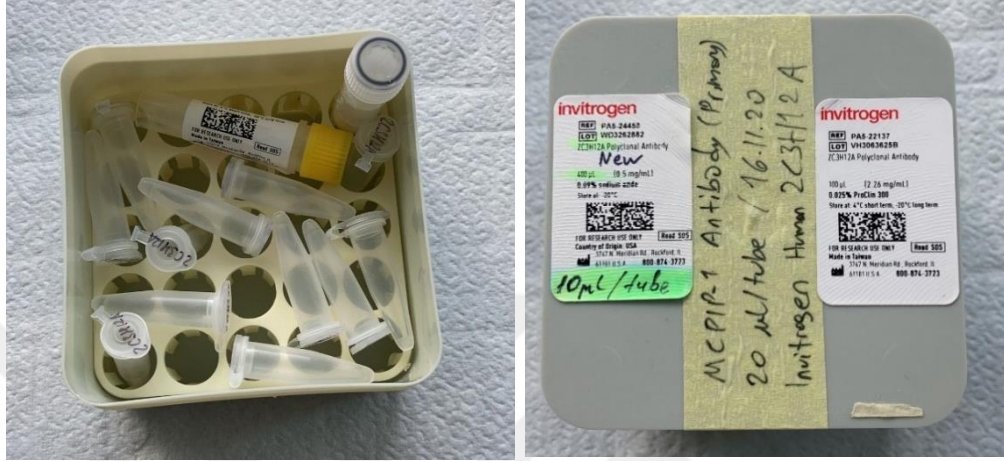
Parafin bloklarda bulunan örnekler 5 μ m'lik kalın kesitler oluşturacak biçimde kesildikten sonra immünohistokimyasal prosedürlerden geçmek üzere lamellere yerleştirildiler.

İmmünohistokimyasal boyamalar hematoksin ve eosin (H&E), thymidine blue ve Ki- 67, MCPIP-1 ve MALT-1 için olan boyamalar otomatik immün boyayıcı kullanılarak (The Lab Vision Autostainer automated immunostaining system, Lab Vision Corporation europe) ve rutin prosedürlere bağlı kalınarak gerçekleştirildi, iki kere beşer dakika boyunca in 1 mmol/L citrate buffer (pH 6.0) içinde mikrodalga verildi ve bu aşamayı takiben 3%'lük H₂O₂ ile endojen peroksidaz blokajı gerçekleştirildi.

Primer antikorlar (MCPIP-1 Antikoru [(1:200 seyreltme) ve MALT-1(1:100 seyreltme)] ve biotinlenmiş ikinci antikor ile tespit edildi. Membranlar 1 saat boyunca seyrekliği 1:10.000 olan goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Katalog no. # 31460; Thermo Fisher, ABD) Antikoru ile inkübe edildiler ve görselleştirilmeleri horseradish peroxidase tamponu içindeki 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride ile yapıldı. MALT-1 için insan akciğer dokusu ve MCPIP-1 için insan böbrek dokusu pozitif boyama kontrollerini oluşturdular. Birincil antikor içermeyen fazla setler de negatif kontrol olarak boyandı.

İmmünohistokimyasal boyamalar Leica ışık mikroskopunun altında (Leica DMLB, Leica, Wetzlar, Almanya) değerlendirildi ve yüksek çözünürlüklü görüntüler sinyal yoğunluklarının analizi için fotoğraflandı (Leica DC 300 V 2.0 Leica, Wetzlar, Germany). Fotoğrafların ImageJ programı (version 1.46c; Rasband WS, National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) ile taranmasının ardından immünohistokimyasal görüntü analiz programı Toolbox Plugin Version2 (National

Institutes of Health, Bethesda MD, ABD) kullanıldı. Boyamaların yoğunlukları hem epitelden hem de bağ dokusundan seçilen bölgelerde incelendi.



Resim 15. MCPIP-1 Primer Antikoru

3.10. İstatistiksel Analiz

Bütün analizlerde IBM SPSS Statistics (version 26, IBM, NY, ABD) programı kullanıldı. Tüm görsellerde çubuklar ortalama değerleri ve standart sapmaları temsil etmektedir. Tek yönlü varyans analizini (ANOVA) takiben post-hoc Tukey testi de seviye farklarının analizinde kullanıldı. < 0.05 p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 'nın İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığına Etkisi

İnsan diş eti keratinositlerinin 2, 6 ve 24 saatlik *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonları sonrasındaki canlılığı Şekil-1'de verilmiştir. 2 saatlik *F. nucleatum* (MOI 1:50&1:100) inkübasyonu sonrasında İDK proliferasyonunun arttığı (p=0.005 and p=0.003 sırasıyla) görüldü. *P. gingivalis* İDK proliferasyonlarını 6 ve 24 saatlerde baskıladı (p<0.001). *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonlarının İDK hücrelerinin proliferasyonlarına etki etmediği gözlemlendi (Şekil-2,3).

4.2. *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 'nın Tek Katlı İnsan Diş Eti Keratinositlerinin MCP-1 Protein Salınımına Etkisi

İnsan diş eti keratinositlerinin 2,6 ve 24 saatlik *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonları sonrasındaki MCP-1 protein salınımları Şekil-4,5,6'da verilmiştir. *P. gingivalis* tüm inkübasyon sürelerinde MCP-1'i yıkmış gibi görüldü. MCP-1 protein salınımı *F. nucleatum* tarafından (MOI 1:100) 2 saatlik inkübasyonun sonunda baskılandı (p=0.003). 24 saatlik inkübasyonun sonunda MCP-1 protein salınımları *F. nucleatum* (MOI 1:50) (p<0.001), *F. nucleatum* (MOI 1:100) (p<0.001), *P. gingivalis* LPS (p<0.001) ve IL-1 β (p=0.003) tarafından baskılandı. *F. nucleatum* (MOI 1:50), *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β ile 2 ve 6 saatlik inkübasyonlardan sonra MCP-1 protein seviyelerinde fark gözlemlenmedi.

4.3. *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 'nın Tek Katlı İnsan Diş Eti Keratinositlerinin MALT-1 Protein Salınımına Etkisi

İnsan diş eti keratinositlerinin 2,6 ve 24 saatlik *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonları sonrasındaki MALT-1 protein salınımları Şekil-7,8,9'da verilmiştir. MALT-1 protein salınımı *F.*

nucleatum (MOI 1:50) ($p=0.011$), *F. nucleatum* (MOI 1:100) ($p<0.001$), *P. gingivalis* LPS ($p=0.016$) ve IL-1 β ($p=0.022$) tarafından 2 saatlik inkübasyonun sonunda baskılandı (Şekil-7). *P. gingivalis* tüm inkübasyon sürelerinde MALT-1'i yıkmış gibi görüldü. 6 ve 24 saatlik inkübasyonlarda MALT-1 seviyelerinde fark gözlemlenmedi (Şekil-8,9).

4.4. *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 'nın Tek Katlı İnsan Diş Eti Keratinositlerinin MCP-1 ve MALT-1 mRNA Salınımına Etkisi

İnsan diş eti keratinositlerinin 2, 6 ve 24 saatlik *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonları sonrasındaki MCP-1 ve MALT-1 mRNA salınımları Şekil-10,11,12,13,14,15'te verilmiştir. MCP-1 mRNA sentezi *F. nucleatum* [MOI 1:50 ($p=0.007$) & 1:100 ($p=0.005$)] tarafından 2 saatlik inkübasyon sonunda artırılmıştır (Şekil 10).

6 saatlik inkübasyonun ardından MCP-1 mRNA sentezi *P. gingivalis* (MOI 1:100) ($p=0.01$), *F. nucleatum* [MOI 1:50 ($p=0.046$) & 1:100 ($p=0.013$) ve IL-1 β ($p=0.022$) tarafından artırılmıştır. 24 saatin sonunda ise MCP-1 mRNA sentezi *F. nucleatum* [MOI 1:50 ($p=0.02$) & 1:100 ($p=0.010$)] tarafından artırıldı (Şekil-15). 2, 6 ve 24 saatlik *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonlarının sonundaki MALT-1 mRNA salınım seviyeleri Şekil-11,12,13,14,15'tedir. Herhangi bir zamanda MALT-1 mRNA seviyelerinde belirgin bir fark tespit edilmemiştir.

4.5. Tek Katlı İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Isı ile Öldürülmüş *P. gingivalis* ve/veya Proteaz İnhibitörü İçeren *P. gingivalis* ile İnkübasyonu Sonucu MCP-1 ve MALT-1 Salınımları

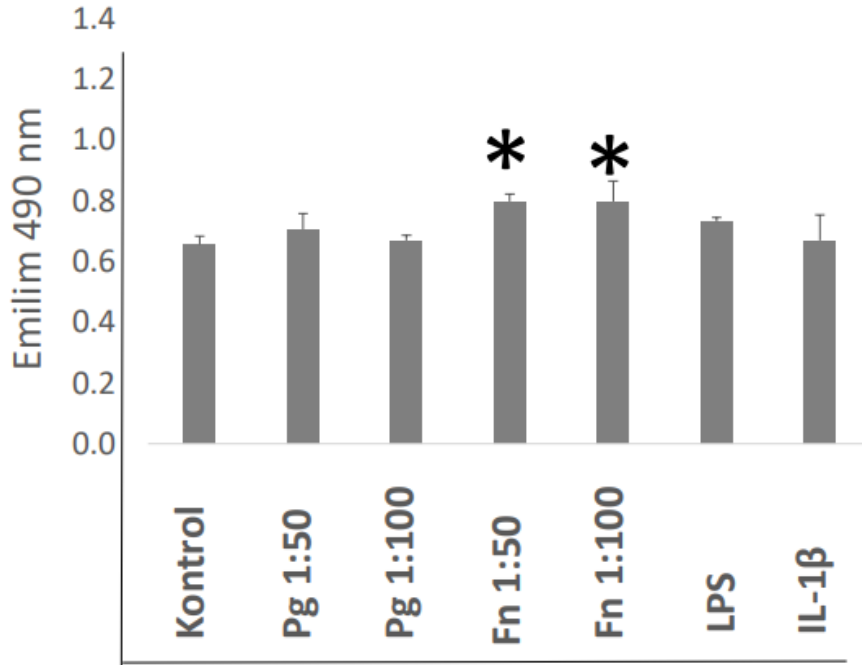
İnsan diş eti keratinositlerinin 2, 6 ve 24 saatlik *P. gingivalis* (ATCC 33277), proteaz inhibitörü (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) ve ısı ile öldürülmüş *P. gingivalis* (MOI 1:100) inkübasyonları sonrasındaki MCP-1 ve MALT-1 salınım seviyeleri analiz edilip Şekil-16,17 ve 18'de verilmiştir.

MCPIP-1 ve MALT-1 proteinleri *P. gingivalis* ısı ile öldürüldüğü zaman tüm zamanlarda saptandı. Proteaz inhibitörü tek başına MCPIP-1 veya MALT-1 yıkımına engel olamadı (Şekil-16,17,18).

4.6. *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 'nın Organotipik Mucosa Mukoza Modelinde Protein Salınımına Etkisi

İki saatlik *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β inkübasyonunun ardından organotipik oral mukoza modelinin MCPIP-1 ve MALT-1 protein salınımları Şekil-19,20 ve 21'de verildi. Test gruplarında MCPIP-1 ve MALT-1 protein salınım seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

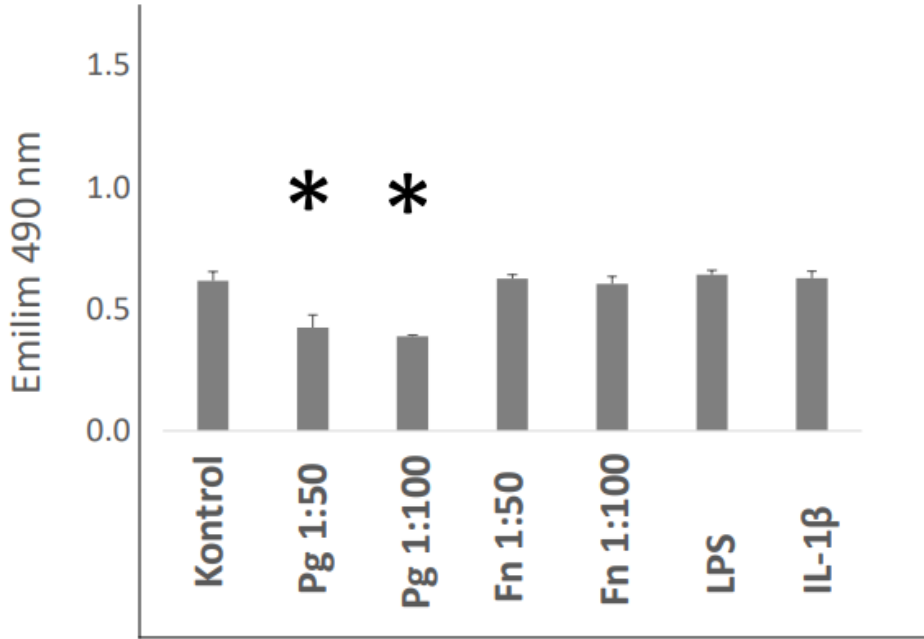
İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Proliferasyonu (2 saat)



Şekil 1. İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığını 2 Saat İnkübasyon Sonrası Değerlendiren Grafik

Keratinosit canlılığı *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda düşükken, *F.nucleatum* ile inkübe edilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (Şekil 1).

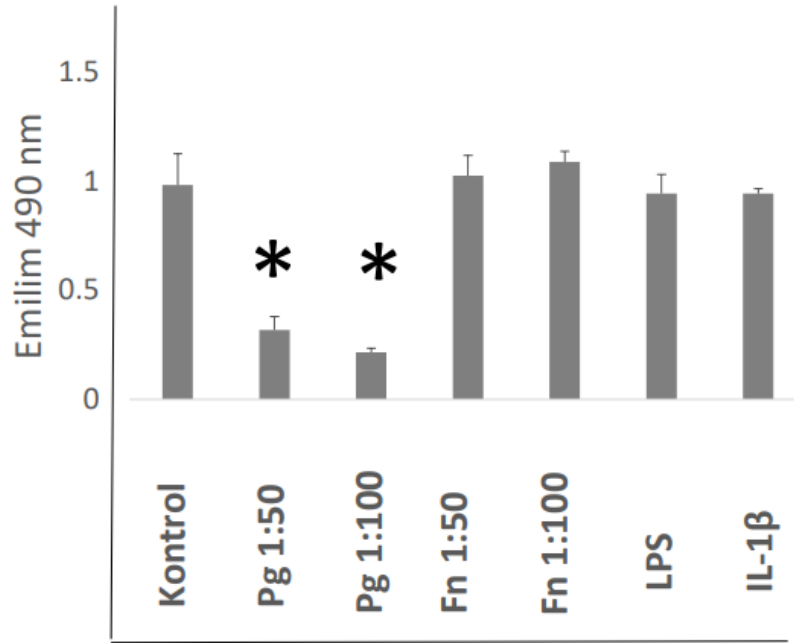
İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Proliferasyonu (6 saat)



Şekil 2. İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığını 6 Saat İnkübasyon Sonrası Değerlendiren Grafik

P. gingivalis ile inkübe edilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı baskılanma gözlemlenmiştir (Şekil 2).

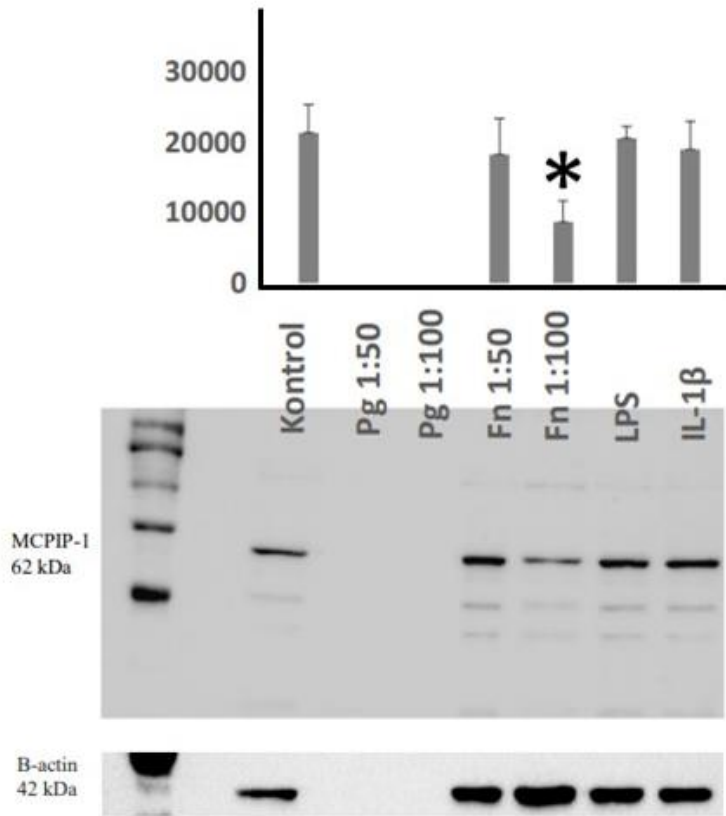
İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Proliferasyonu (24 saat)



Şekil 3. İnsan Diş Eti Keratinositlerinin Canlılığını 24 Saat İnkübasyon Sonrası Değerlendiren Grafik

P. gingivalis ile inkübe edilen gruplarda istatistiksel olarak anlamlı baskılanma gözlemlenmiştir.

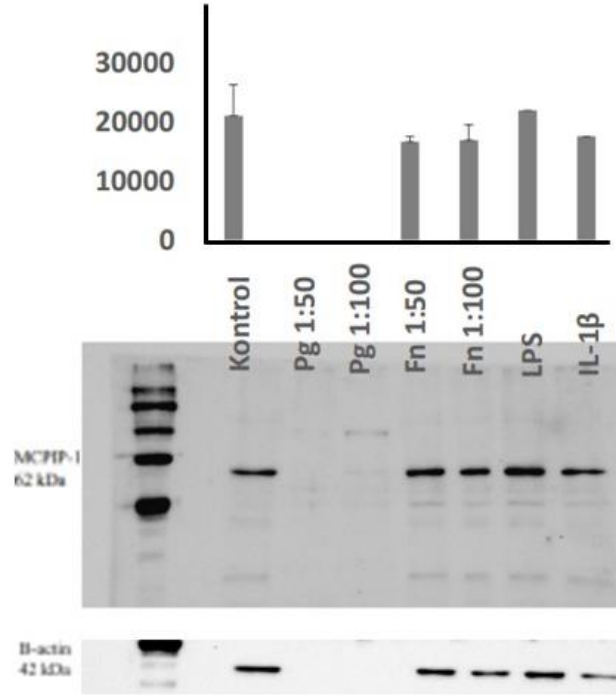
MCPIP-1 protein salınımı (2 Saat)



Şekil 4. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 Miktarını Gösteren Grafik

F. nucleatum 1:100 grubunda istatistiksel olarak anlamlı baskılanma görülmüştür. *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda yıkım sonucu sinyal görülmemiştir.

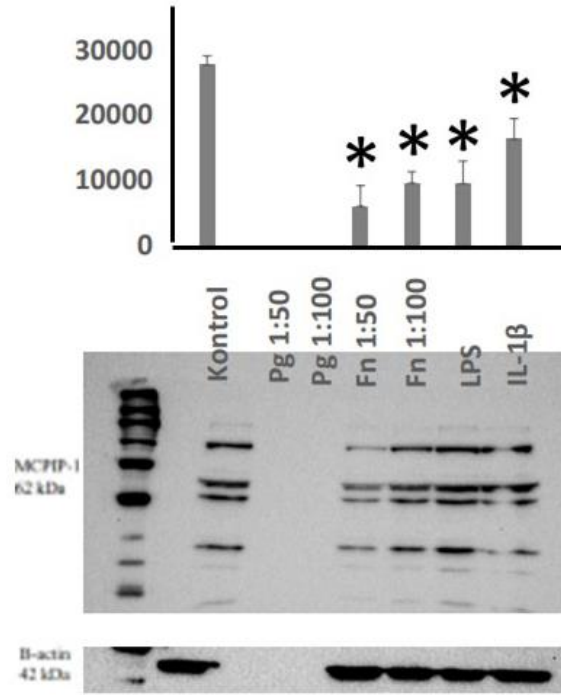
MCPIP-1 protein salınımı (6 Saat)



Şekil 5. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 Miktarını Gösteren Grafik

Anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda yıkım sonucu sinyal görülmemiştir.

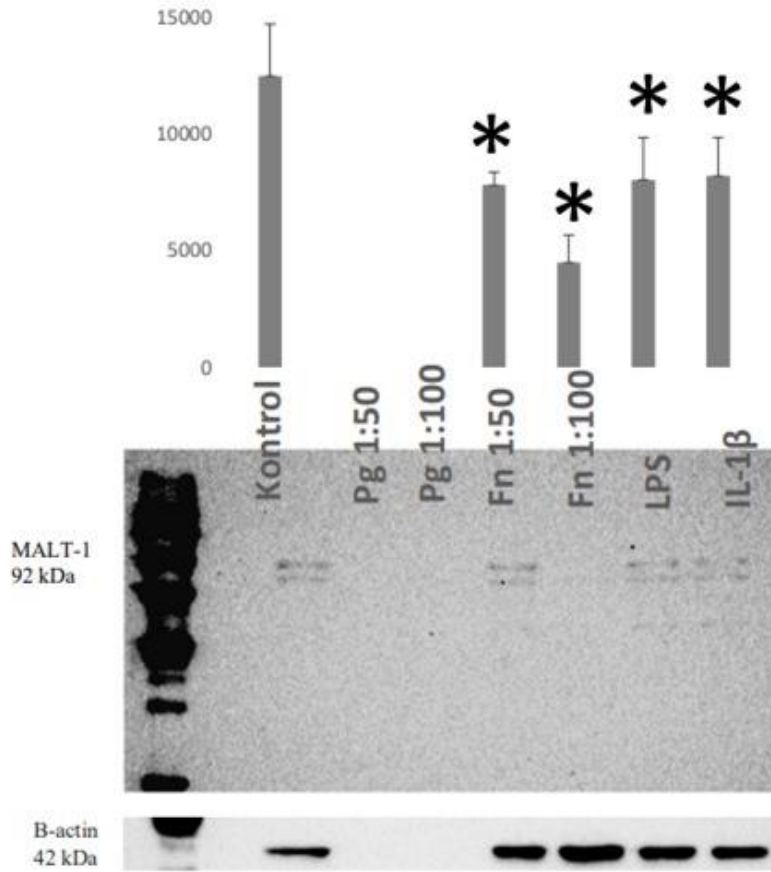
MCPIP-1 protein salınımı (24 Saat)



Şekil 6: İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 Miktarını Gösteren Grafik

Bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı baskılanma gözlemlenmiştir. *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda yıkım sonucu sinyal görülmemiştir.

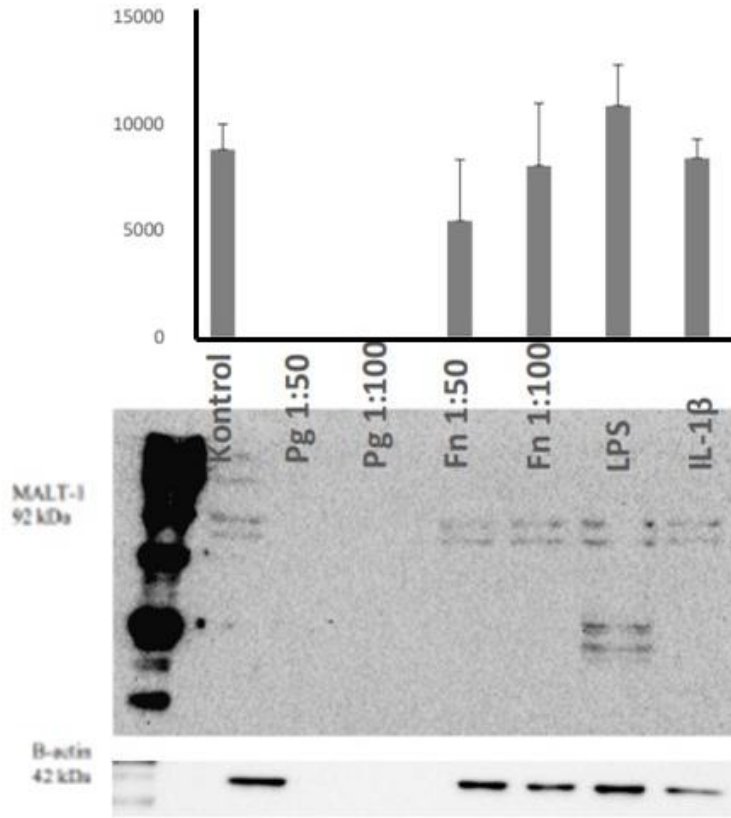
MALT-1 protein salınımı (2 Saat)



Şekil 7. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik

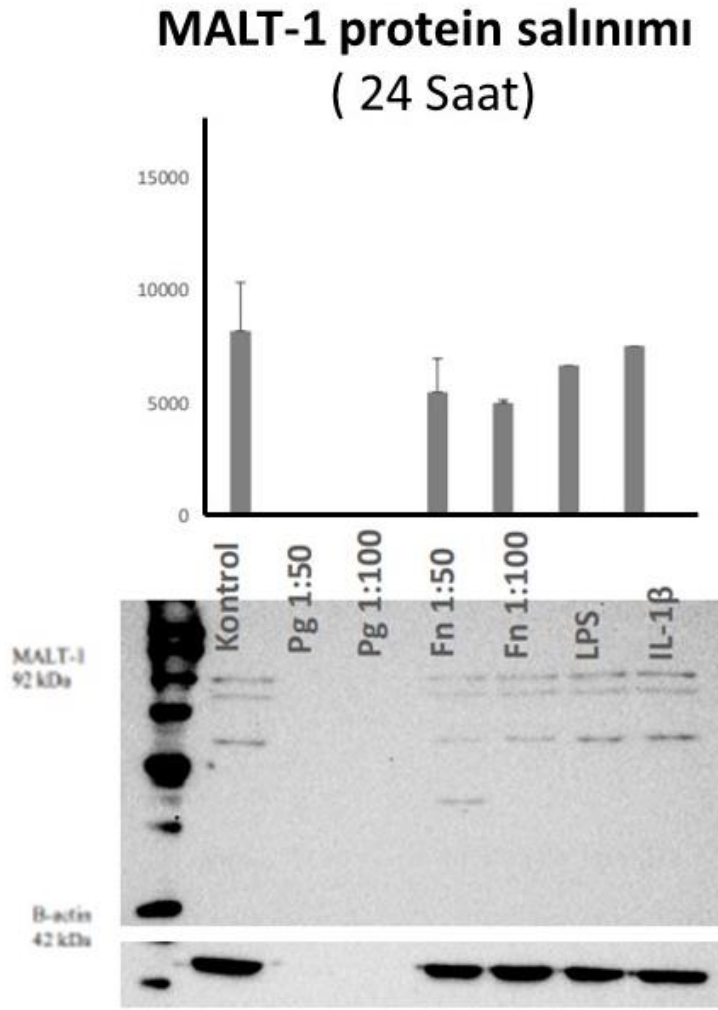
Bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı baskılanma gözlemlenmiştir. *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda yıkım sonucu sinyal görülmemiştir.

MALT-1 protein salınımı (6 Saat)



Şekil 8. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik

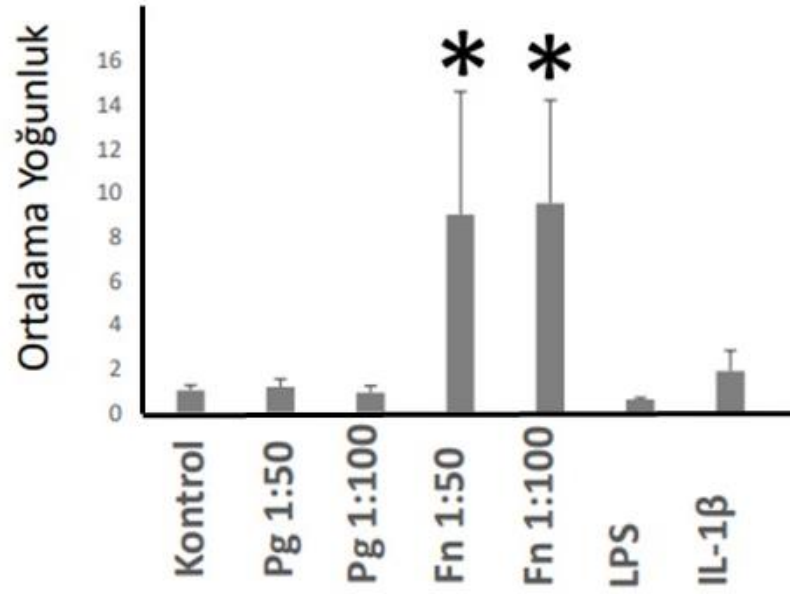
İstatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda yıkım sonucu sinyal görülmemiştir.



Şekil 9. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik

İstatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. *P. gingivalis* ile inkübe edilen gruplarda yıkım sonucu sinyal görülmemiştir.

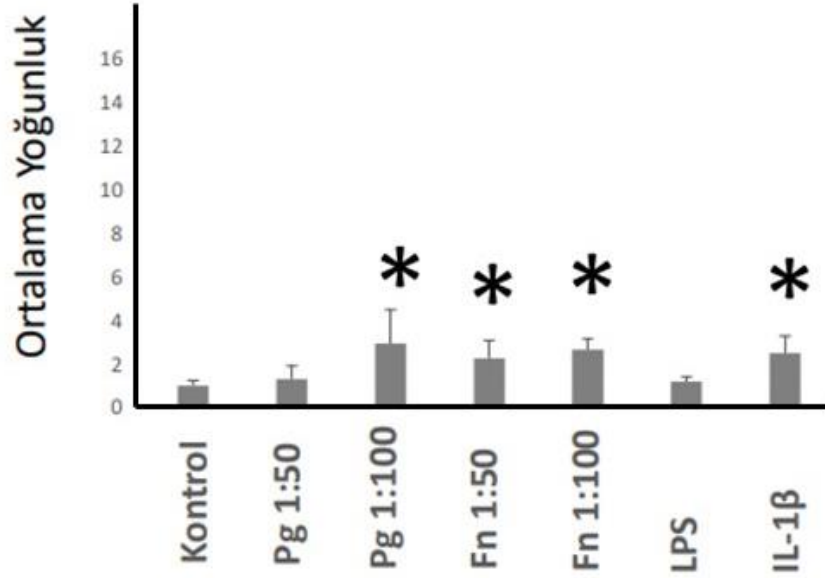
MCPIP-1 mRNA Salınımı (2 saat)



Şekil 10. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik

MCPIP-1 mRNA salınımı *F. nucleatum* gruplarında anlamlı fark oluşturacak şekilde artmıştır.

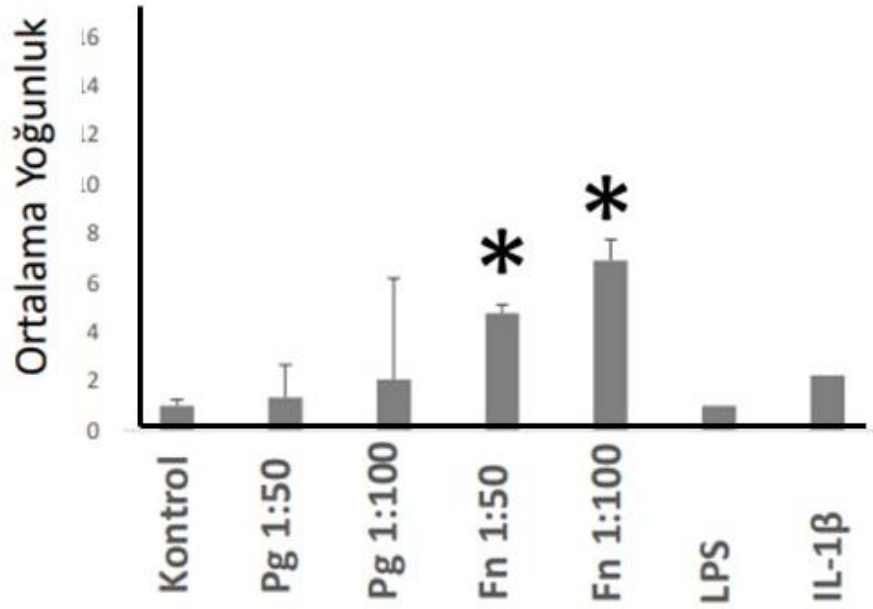
MCPIP-1 mRNA Salınımı (6 saat)



Şekil 11. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik

MCPIP-1 mRNA salınımı *P.gingivalis* 1:100 grubunda, *F. nucleatum* gruplarında ve IL-1β grubunda istatistiksel fark yaratacak boyutta artmıştır.

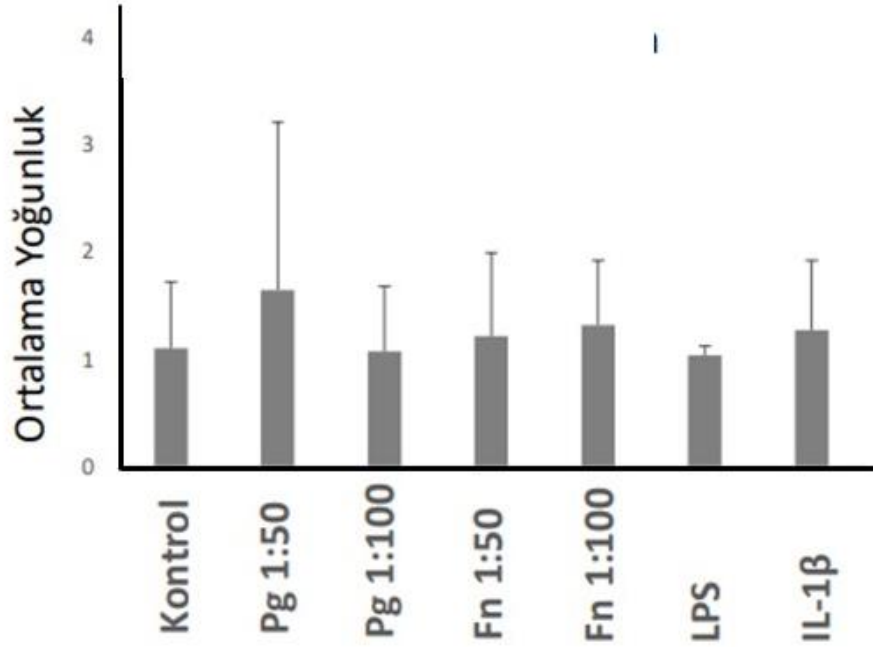
MCPIP-1 mRNA Salınımı (24 saat)



Şekil 12. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MCPIP-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik

F. nucleatum ile inkübe edilen gruplarda MCPIP-1 mRNA miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir.

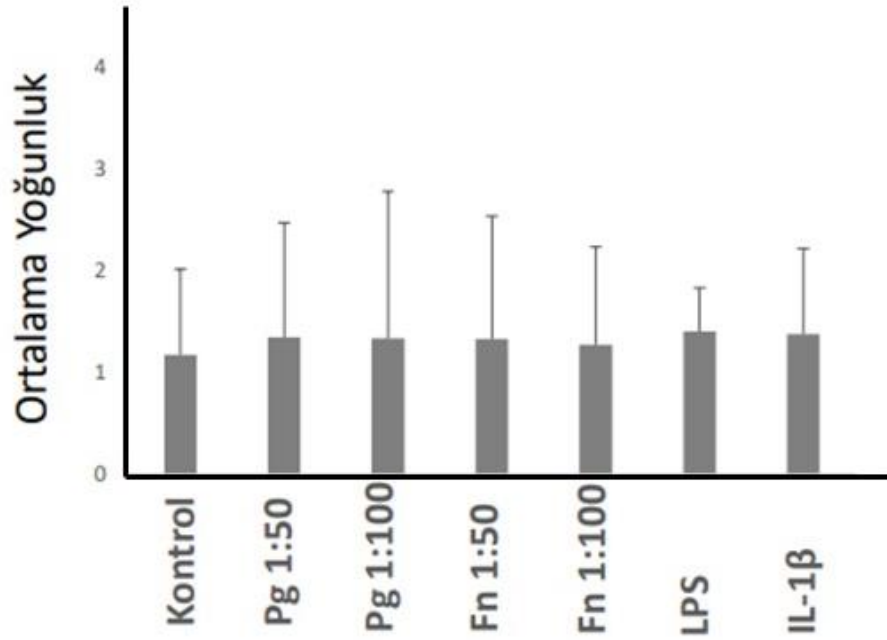
MALT-1 mRNA Salınımı (2 saat)



Şekil 13. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 Miktarını Gösteren Grafik

İstatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

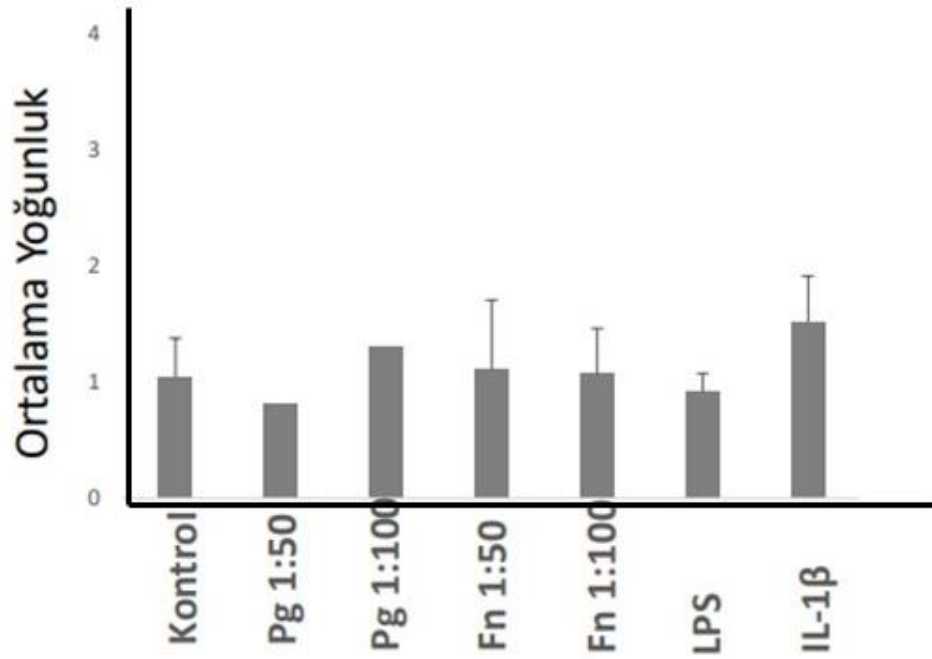
MALT-1 mRNA Salınımı (6 saat)



Şekil 14. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik

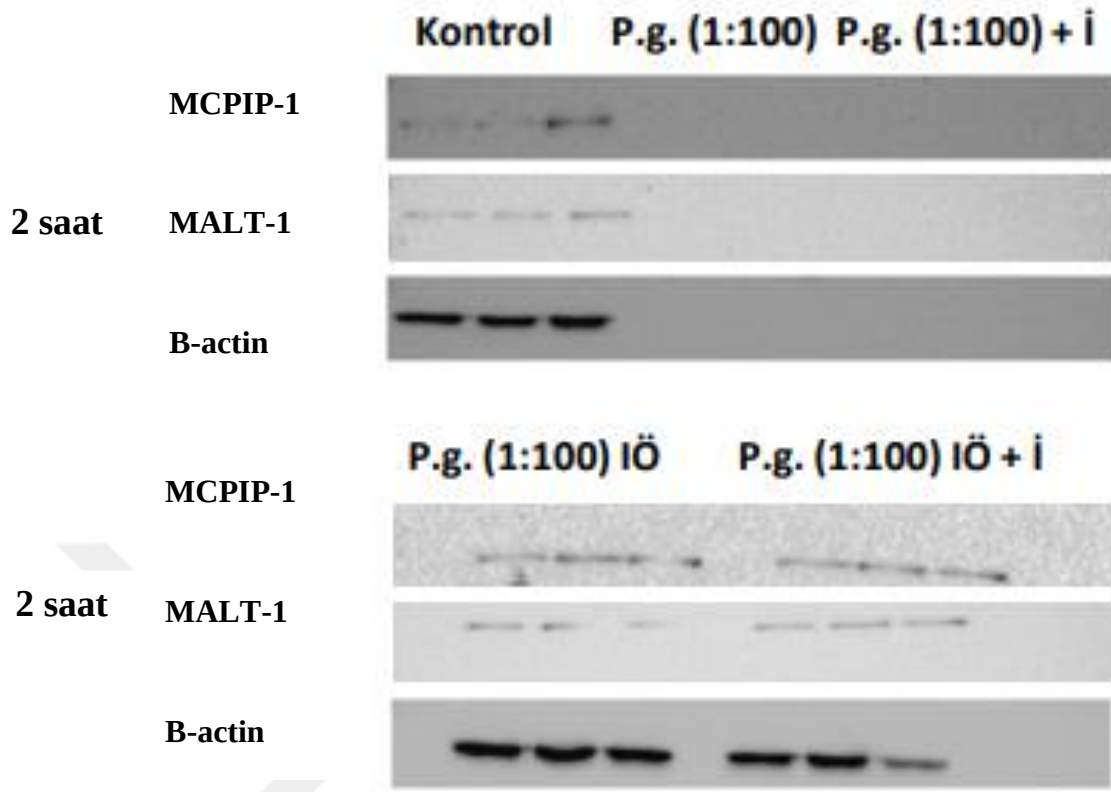
İstatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

MALT-1 mRNA Salınımı (24 Saat)



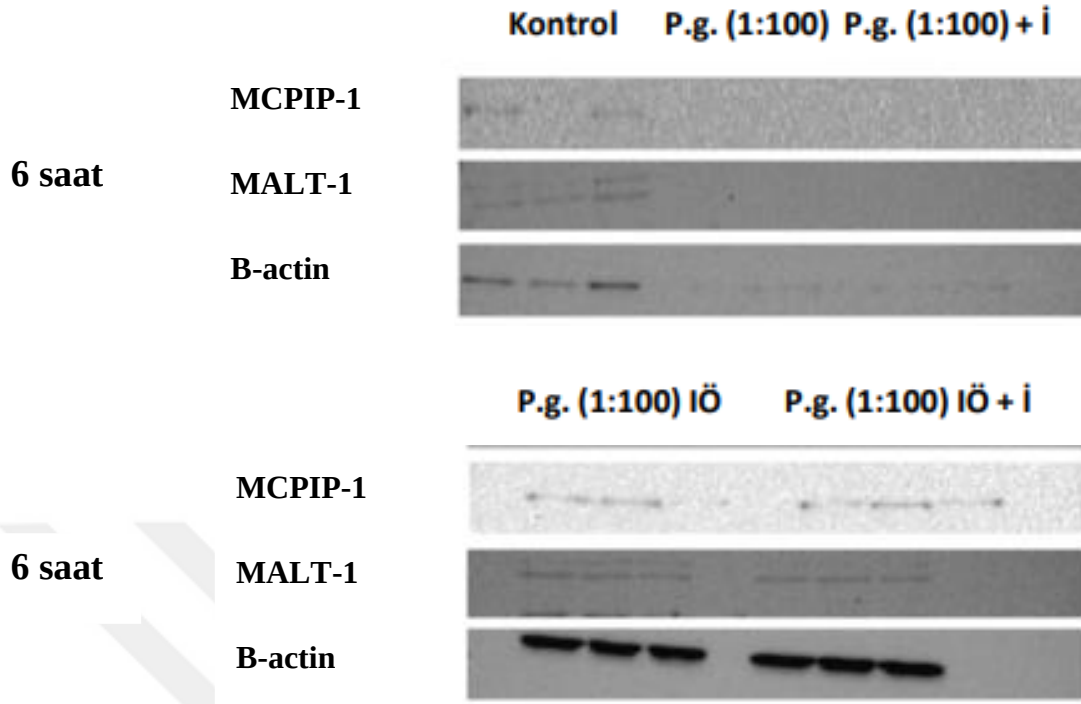
Şekil 15. İnsan Diş Eti Keratinositlerinde 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası Açığa Çıkan MALT-1 mRNA Miktarını Gösteren Grafik

İstatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.



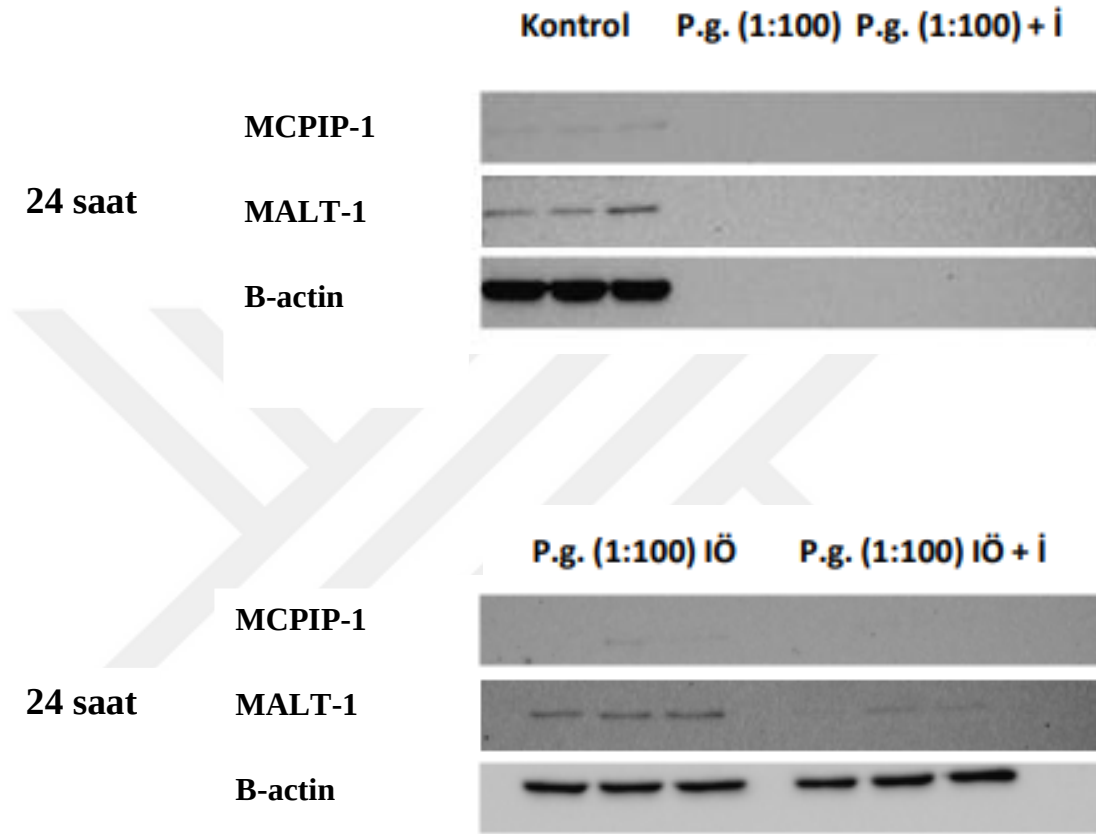
Şekil 16. 2 Saatlik İnkübasyon Sonrası β -aktin, MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınım Profillerini Gösteren Grafik

P. gingivalis grubu ve inhibitörlü *P. gingivalis* grubunda keratinositlerin yıkımı görülmüştür. Isı ile öldürülen *P. gingivalis* ve ısı ile öldürülüp inhibitör ilave edilen *P. gingivalis* gruplarında MCPIP-1, MALT-1 ve β -aktin proteinlerine rastlanmıştır.



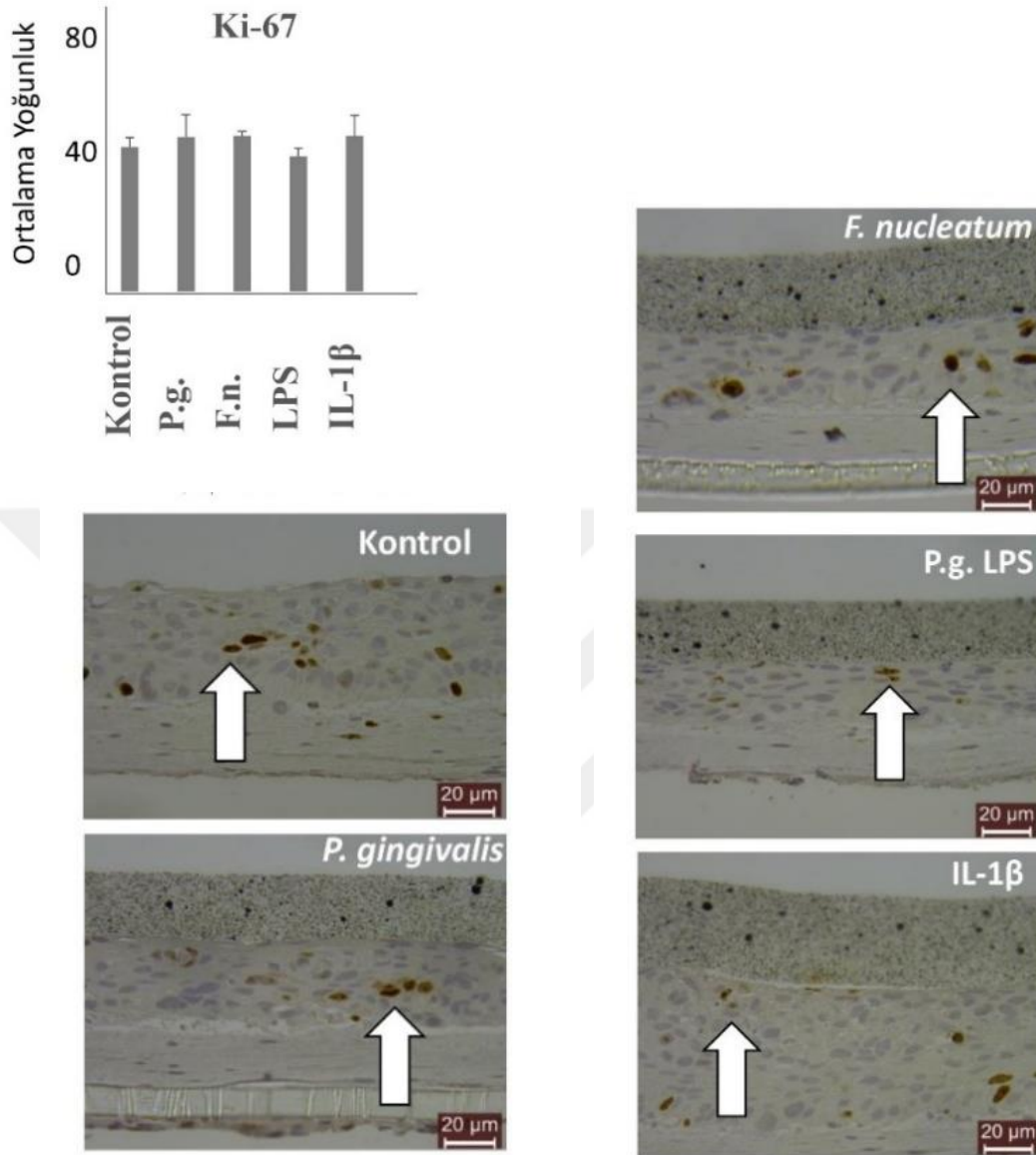
Şekil 17. 6 Saatlik İnkübasyon Sonrası β -aktin, MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınım Profillerini Gösteren Grafik

P. gingivalis grubu ve inhibitörlü *P. gingivalis* grubunda keratinositlerin yıkımı görülmüştür. Isı ile öldürülen *P. gingivalis* ve ısı ile öldürülüp inhibitör ilave edilen *P. gingivalis* gruplarında MCPIP-1, MALT-1 ve β -aktin proteinlerine rastlanmıştır.



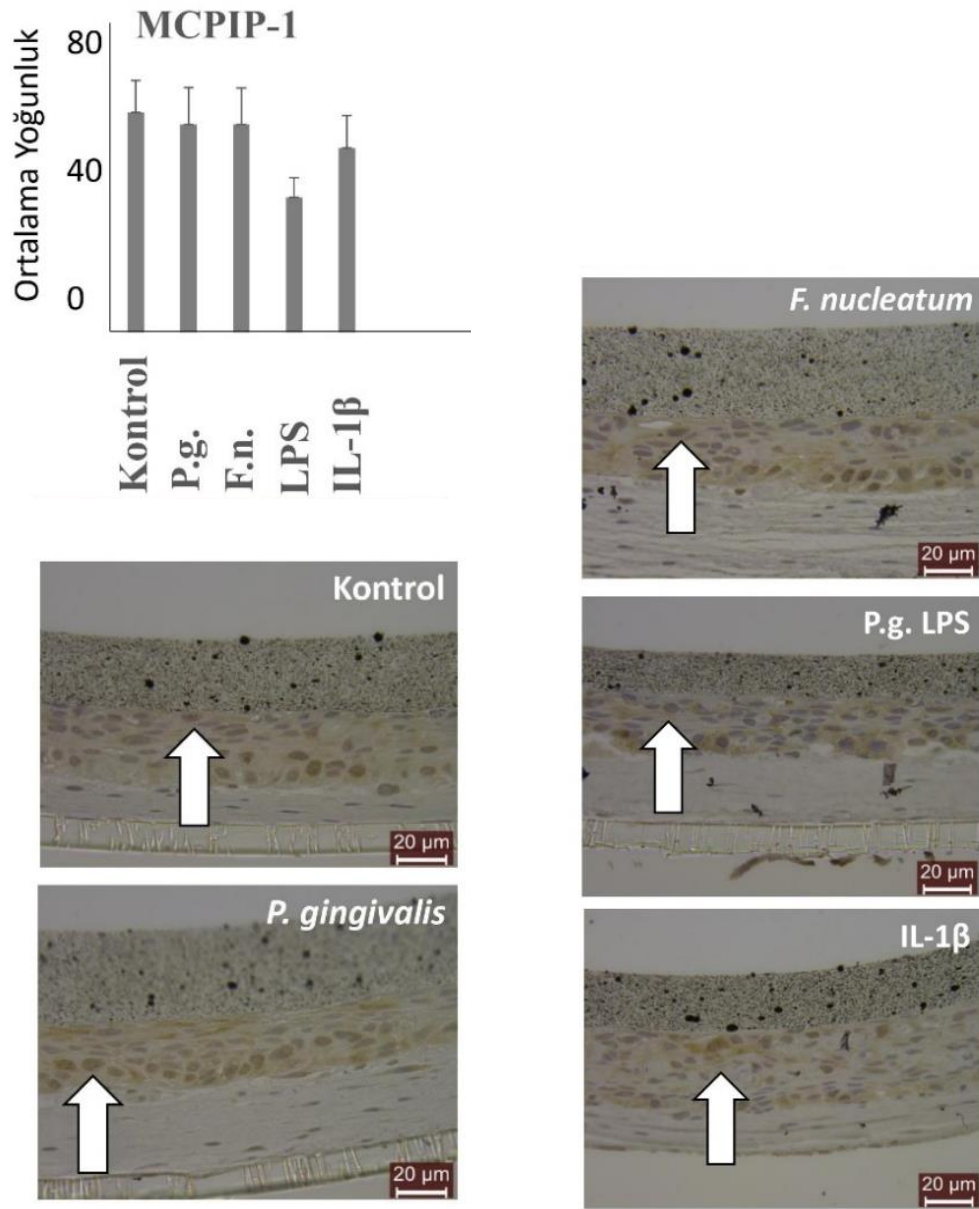
Şekil 18. 24 Saatlik İnkübasyon Sonrası β -aktin, MCPIP-1 ve MALT-1 Protein Salınım Profillerini Gösteren Grafik

P. gingivalis grubu ve inhibitörlü *P. gingivalis* grubunda keratinositlerin yıkımı görülmüştür. Isı ile öldürülen *P. gingivalis* ve ısı ile öldürülüp inhibitör ilave edilen *P. gingivalis* gruplarında MCPIP-1, MALT-1 ve β -aktin proteinlerine rastlanmıştır.



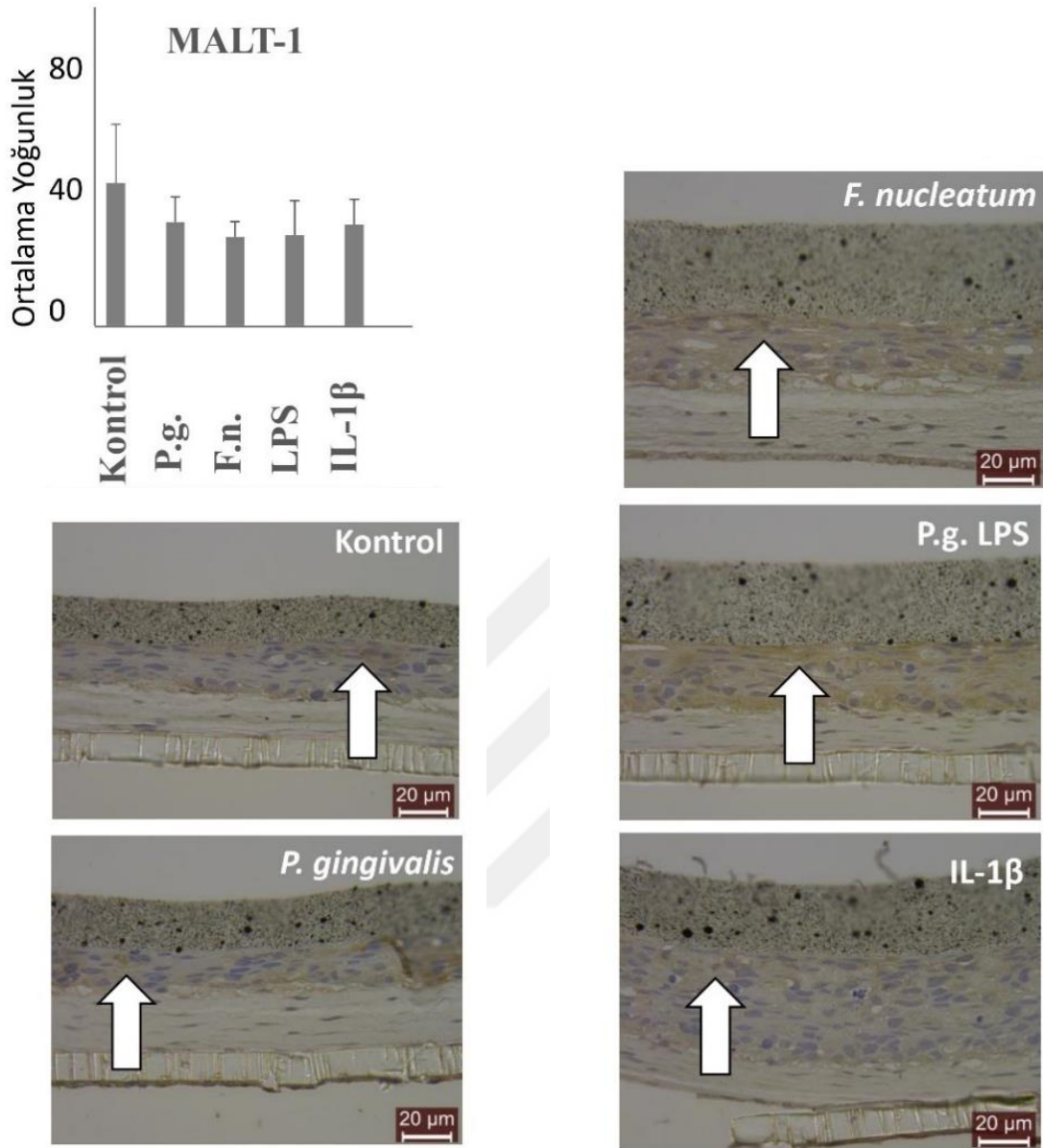
Şekil 19: Organotipik Oral Mukoza Modellerinin *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1β ile İnkübasyonu Sonrası Ki-67 Protein Salınım Seviyeleri

Ki-67 boyamaları ile hücresel çoğalma tespit edilir. Ki-67 pozitif hücreler koyu renkli bölgelerde beyaz okla gösterilmiştir ve hücrelerin farklı inkübasyonlardaki Ki-67 protein salınımını temsil etmektedir. Ortalama değerler ve standart sapmalar grafikte bar ile gösterilmiştir.



Şekil 20. Organotipik Oral Mukoza Modellerinin *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1β ile İnkübasyonu Sonrası MCPIP-1 Protein Salınım Seviyeleri

Beyaz okla gösterilen koyu renkli bölgeler hücrelerin farklı inkübasyonlardaki MCPIP-1 protein salınımını göstermektedir.



Şekil 21. Organotipik Oral Mukoza Modellerinin *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β ile İnkübasyonu Sonrası MALT-1 Protein Salınım Seviyeleri

Beyaz okla gösterilen koyu renkli bölgeler hücrelerin farklı inkübasyonlardaki MALT-1 protein salınımını göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Periodontal hastalıklarda konak savunması öncelikle tükürük içerisindeki salgısal IgA, lizozimler ve diğer antimikrobiyal savunma elemanları ile başlar. Ardından diş eti oluğunda bulunan IgG, IgM gibi antikorlar, nötrofiller, makrofajlar ve benzeri savunma elemanları devreye girer. Bu savunma mekanizmalarını aşan bakteriler diş eti oluğu içerisinde epitel hücreleri ve altındaki bağ dokusu hücreleri ile karşılaşır. Diş eti oluğunun yumuşak doku duvarını oluşturan mukoza (epitel tabakaları ve altındaki bağ dokusu hücreleri) ilk fiziksel bariyeri oluşturur. Epitel hücrelerimizin (keratinositler) mikroorganizmalar ile ilk teması esnasında verdiği yanıtlar periodontal hastalıklarda ortaya çıkan bağışıklık yanıtında son derece önemli bir rol oynar. Epitel hücrelerinin karşılaştığı mikroorganizmalar arasında *P.gingivalis* ve *F. nucleatum*, hastalığın gelişmesi ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar. MCPIP-1'in de içinde olduğu yeni bir RNA bağlayan protein grubu olan regülatuar RNase'lar bağışıklık sisteminin dengesinde önemli rol üstlenen elemanlar olarak tanımlanmıştır.⁶⁶ Savunma mekanizması için önemli olan elemanlardan nötrofillerin ve makrofajların devreye girmesinde veya fonksiyonlarının baskılanmasında MCPIP-1 ve MALT-1 önemli rol oynarlar. MCPIP-1 savunma hücrelerimizin proenflamatuar sitokinlerin mRNA sentezini baskımlarken, MALT-1, MCPIP-1'in etkisini baskılar.^{50,78}

Bakteri invazyonuna yanıt olarak İGK'lerin proliferasyonu 2 saatlik inkübasyon sonucunda artmaktadır (Şekil-1), fakat bu artış *F. nucleatum*'da görülürken *P. gingivalis*'te görülmemektedir. *P.gingivalis*'in keratinosit yıkımını 2 saatten daha kısa sürelerde incelenmiştir⁶ ve benzer sonuçlarımızın varlığı, 2 saatlik sürenin yıkımın ileri aşamalarına gelindiğinin işareti olduğunu düşündürmektedir. İnkübasyon süreleri artığında *P. gingivalis* gruplarındaki azalmış salınım yıkılan İGK'leriyle doğru orantılıdır ve bu fark *F. nucleatum* gruplarında görülmez. Bunun nedeni *P. gingivalis*'in *F. nucleatum*'a göre daha agresif bir patogeneze sahip olmasıdır.^{10,14} Sadece LPS ile inkübe edilen gruplardaki salınım miktarları, *P. gingivalis*'in bakteri zarında sahip olduğu LPS'ten ziyade gingipainlerin bu yıkımda rol oynadığını düşündürmektedir. Gingipainin proteaz yapısı, proteaz inhibitörü ile de engellenememiş, ancak bakterilerin ısı ile öldürülmesiyle bakteri faaliyeti durdurulabilmiştir. MCPIP-1 protein salınım seviyeleri *P. gingivalis* ile inkübe edilen hücrelerde tespit edilmemiştir, bu da salınım başlamadan hücrelerin yıkıldığını düşündürmektedir. Aynı deneylerde hücre iskeleti proteini beta-

aktin yıkımı da görülmüş, böylelikle keratinosit yıkımını doğrulamıştır. Şekil 16, 17 ve 18’de ise *P. gingivalis* yıkımının ısı ile öldürülerek inhibe edilişi, proteaz inhibitörlerinin bakteri hücrelerine yeterince hızlı etki edemediğini düşündürmektedir. Bakteriler ısı ile inhibe edildiğinde beta-aktin bütünlüğü görülmesiyle birlikte MCPIP-1 ve MALT-1 protein salınımları da beklendiği üzere görülmüştür.

6 saatlik inkübasyonların sonucunda salınım profillerindeki dengelenme bize konak hücrelerin insiyatifi aldığını düşündürmektedir. 24 saate gelindiğinde ise görülen MCPIP-1 protein baskılanması, bakterilerin yapay deney koşullarından ötürü canlılığını devam ettiremediğini ve bu yüzden keratinosit yanıtının azaldığını düşündürmektedir. Bunun bir başka belirtisi, mücadele durumunda salgılanan MCPIP-1’in durdurucusu MALT-1 protein seviyesinin 2 saatte diğer sürelerle göre en düşük seviyede olmasıdır. Tersine bir yükselişin 24 saatte görülmeyişi de bakteri canlılığının azaldığını düşündürmektedir.

mRNA seviyelerine baktığımızda *F. nucleatum* ile inkübe edilen gruplarda bütün deney sürelerinde yoğun miktarda salınım görülmektedir, bu da MALT-1’in MCPIP-1 inhibitörü görevini İGK’lerde bakteri varlığında diğer dokulardaki kadar etkili yapamadığına işaret ediyor olabilir.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma *F. nucleatum*, IL-1 β ve *P. gingivalis* LPS’in tek katlı insan diş eti keratinositlerindeki MCPIP-1 protein salınımı üzerindeki baskılayıcı rolünü gösteren ilk çalışmadır. *P. gingivalis* ise hem MCPIP-1 hem de MALT-1 proteinlerinin yıkımını azaltan bir görüntü oluşturdu fakat bu durum *P. gingivalis*’i ısı ile öldürerek tersine döndürüldü.

Aynı zamanda hücresel yanıtların tek katlı ve çok katlı oral mukozal keratinosit modellerinde farklılık gösterdiğini de gözlemledik.

Bu çalışmanın kuvvetli yönlerinden birisi tek katlı diş eti keratinositlerinde hem mRNA hem de MCPIP-1 ve MALT-1 protein seviyelerinin analizidir.

Aynı zamanda zamana bağlı değişiklikleri görebilmek için uyarılarımız zamanlamalarını değiştirdik. Zamanla hücre sayısı artışı için, immünooblottara her zaman

kesitinde farklı miktarda protein yüklendi ve bu nedenden dolayı elimizdeki sonuçlar zamana bağlı değişimleri takip etmemizi zorlaştırdı.

Çalışmanın bir başka kuvvetli yönü ise organotipik oral mukoza modellerinin kullanılmasıdır. Organotipik oral mukozal model, gingival keratinosit ile gingival fibroblast içerir ve çalışmanın tasarımında bu iki hücre tipinin arasında etkileşim oluşabilme durumunu katar. İki boyutlu modeller üç boyutlulular göre daha az sofistike olsalar da tüm tekrarlar da aynı miktarda hücre kullanıldı. Uzun süre ile kültür edilmesi, organotipik modeli çevresel koşullara karşı hassas hale getirmektedir.

Son olarak, MCP-1 ve MALT-1'in salınımlarının farklı medyatörler ile olan etkileşimleri incelenmiş olsa da bu proteinlerin birlikte bir enfeksiyon ve enflamasyon durumu denenmedi.

Periodontal hastalıklarda konak savunması ve konağın oluşturacağı bağışıklık yanıtının belirlenmesi için en kritik hücrelerden birisi periodontal mukoza hücreleridir. Periodontal hastalıklara karşı bağışıklık yanıtının oluşumunda epitel hücrelerin mikroorganizmalar ile karşılaşınca ortaya çıkan sinyal moleküllerinin bağ dokusuna iletilmesi ve bağ dokusu içerisinde yer alan bağışıklık sistemi hücrelerinin verdiği yanıtıdır. Bu yanıtın oluşmasında keratinositler arasında yer alan dentritik hücrelerin antijen sunumu kadar, keratinositlerin mikroorganizmaların LPS gibi parçaları veya kendilerine karşı doğrudan oluşturdukları sinyaller de önemlidir. Bu sinyallerin oluşumu ve iletimi esnasında periodontopatojen bakterilerin bazıları sinyal oluşumunu değişik yollarla etkileyebilir veya bloke edebilirler. Bu sinyallerden en önemlileri monositler üzerine etki oluşturabilecek sinyallerdir. Makrofajların bağ dokusu içerisine gelmesi (monosit kemotaksisi), aktive olmaları, bir yandan bağışıklık sisteminin aktivasyonunda yer almaları diğer yandan doğrudan doku içerisine ulaşmış bakteri ve ürünlerini fagosite ederek ortamdan uzaklaştırmaları konak savunması için en önemli aşamalardır. Bu aşamada rol oynayan proteinler MCP-1, MCP-1, MIF, MALT-1 ve benzeri moleküllerdir.

Önceki çalışmaların gösterdiğine göre LPS, IL-1 β ve *Escherichia coli* ile *Staphylococcus aureus* gibi bakteriler MCP-1 gen salınımını aktive edebilirler.⁷⁹ Mevcut sonuçlarımıza göre *P. gingivalis* insan diş eti keratinositlerinin MCP-1'lerini

yıkmaktadır.⁸⁰ Elimizdeki sonuçlara göre, *P. gingivalis*'in İDK MCPIP-1'in yıkımını indüklediği görülmektedir. *P. gingivalis*'in diş etindeki MCPIP-1'i gingipain aktivitesi ile yıktığı yakın zamanda gösterilmiştir.⁶ Bizim çalışmamız MCPIP-1 yıkımının *P. gingivalis*'in ısı ile denatüre edilmesi ile bozulabileceğini fakat aynı aktivitenin proteaz inhibitörleri ile durdurulamayacağını göstermektedir. Önceki çalışmaların sonuçlarına göre, serin ve sistein proteaz inhibitörleri *P. gingivalis*'in yıkıcı etkisini durdurmakta yeterli olamamışlardır⁸¹ ancak *P. gingivalis*'in ısı ile öldürülmesi aktin yıkım yeteneğinin durdurulmasına, sitokin aktivitesinin baskılanmasına ve onun konak hücrelerden IL-1 β uyarıcı fonksiyonunun azalmasına sebep olmuştur.⁶⁶ Bu sonuçlar bizim bulgularımızı destekler yöndedir.

Bizim çalışmamızın da gösterdiği gibi yapısal aktin *P. gingivalis*'in gingipainlerinin hedefindedir ve bu yıkım bakterilerin ısı ile öldürülmesi ile inhibe edilebilir ancak proteaz inhibitörleri ile durdurulamaz. Ayrıca MCPIP-1 yıkımı organotipik mukozal modellerde gözlemlenmemiştir bu da keratinositlerin çok katlı oluşumunun bakterilerin proteolitik aktivitelerine karşı savunma özelliğini bakterilerin geçişini zorlaştırarak ve bakterilerin proteazlarının hücrelerin proliferasyonu olduğu bazal tabakaya ulaşmasını engelleyerek artırdığına işaret etmektedir.⁶ Böylelikle bakteriyel proteazlar çoğalmakta olan keratinosit bazal hücrelerinden uzakta kalmıştır.

Mevcut çalışmanın ilginç bir bulgusu da insan diş eti keratinositlerinin *F. nucleatum* ile inkübasyonunun MCPIP-1 protein salınımını baskımlarken, tüm zaman aralıklarında MCPIP-1 mRNA seviyelerini artırmasıdır. Bunun bir açıklaması MCPIP-1'in *F. nucleatum* tarafından parçalanması olabilir.⁷

Daha önce açıklandığı üzere, mRNA ve protein salınımı arasındaki ters korelasyonda rol alan transkripsiyon veya transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, mRNA'nın proteine dönüşümüne ya da proteolitik degradasyonuna yol açmıştır.⁷²

Yine de bu çalışmanın sınırları dahilinde bu durumun nedenleri açıklanamamıştır.

Sonuçlarımıza göre *P. gingivalis* insan diş eti keratinositlerinin MALT-1 proteinlerini yıkmaktadır ve bu sonuç *P. gingivalis*'in ısı ile öldürülmesi ile durdurulabilir. *F. nucleatum*, *P. gingivalis* LPS ve IL-1 β 2 saatlik kısa bir inkübasyonun ardından MALT-1 protein seviyelerini baskılar. MALT-1'in keratinositlerdeki

proenflamatuar sitokinlerin salınımını düzenlediği gösterilmiştir.^{7,72} MALT-1 proteaz aktivitesi doğal ve kazanılmış yanıtların önemli bir parçasıdır.^{10,78} MALT-1 aktivitesini antijen reseptörü bağlanması,^{64,67,72,78,82} ve monoubikuitinleşme kontrol eder^{74,76} fakat bakterial medyatörlerin veya enflamatuar sitokinlerin katkısı bilinmemektedir. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla MALT-1 salınımının modülasyonunu, periodontal bakteri aktivitesindeki yanıtını veya periodontitisteki durumunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.⁸³

Yine de enflamatuar ve enfeksiyöz medyatörler tarafından MALT-1'in erken (2 saat) baskılanması ve MCP-1'in geç (24 saat) baskılanması bu birbiri ile ilişkili ikili proteinin eş zamanlı olmadığını işaret edebilir.

Sonuç olarak, diş eti keratinositler MCP-1'inin ve MALT-1'inin enfeksiyöz ve enflamatuar medyatörlere karşı mRNA ve protein salınım profilleri birbirinden farklıdır. Diş eti keratinositlerinin MCP-1 ve MALT-1 yanıtları bakteri tipine, bakterinin canlılığına, inkübasyon süresine ve uygulandığı keratinosit hücre modeline bağlıdır.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre;

- 1) İlk 2 saatlik inkübasyon sonucunda *F. nucleatum* varlığının İDK proliferasyonunu artırmış, 6 ve 24 saatlik inkübasyonların sonucunda ise *P. gingivalis* varlığının İDK proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir.
- 2) İlk 2 saatlik inkübasyonun sonucunda 1 İDK hücre sine 100 koloni oluşturan birim bakterinin denk geldiği *F.nucleatum* 1:100 grubu MCPIP-1 protein salınımını baskıladığı, 24 saatlik deneyin sonunda ise tüm gruplarda MCPIP-1 protein salınımının baskılandığı görülmüştür.
- 3) Tüm inkübasyon sürelerinde deneye katılan keratinositler *P. gingivalis* tarafından yıkılmıştır.
- 4) İlk 2 saatlik inkübasyonun sonunda MALT-1 protein salınımının bütün gruplarda baskılandığı, bu baskılanmanın inkübasyon süresi uzadıkça ortadan kalktığı gözlemlenmiştir.
- 5) MCPIP-1 gen salınımının 2 saatlik inkübasyon sonunda *F.n.* 1:50 ve *F.n.* 1:100 gruplarında arttığı, 6. saate gelindiğinde MCPIP-1 gen salınımının *P.g.* 1:100, *F.n.* 1:50, *F.n.* 1:100 ve IL-1 β gruplarında arttığı, 24 saatlik inkübasyonda ise bu artışın *F.n.* 1:50 ve *F.n.* 1:100 gruplarında görülmüştür.
- 6) MALT-1 gen salınımının inkübe edilen ajanlara göre farklılık göstermemektedir.

- 7) *P.gingivalis*'in yıkıcı etkisinin MCP-1 ve MALT-1 proteinlerinin tespit edilememesine yol açtığı, keratinositlerdeki β -aktini de yıktığı ve bu yıkımın proteaz inhibitörü ilavesi ile değil, bakterinin ısı ile inhibe edilerek inaktifleştirilebileceği, bu sayede protein seviyelerinin tespitinin mümkün olduğu gözlenmiştir.
- 8) Üç boyutlu organotipik diş eti modellerinde bu yıkımın immünohistokimyasal incelemede görülmediği ve bunun tek katlı keratinositlerin tabi olduğu deney ortamı ile üç boyutlu modelin deney koşullarının farklı olmasına bağlı olabileceği, iki saatlik organotipik model inkübasyonundan sonra hücrelerin çoğalmaya devam ettiği ve dokuda MCP-1 ile MALT-1 proteinine rastlandığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. 2000;14:33-53.
2. Okada H, Murakami S. Cytokine Expression in Periodontal Health and Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9:248-266. doi:10.1177/10454411980090030101
3. Jura J, Skalniak L, Koj A. Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCPIP1) is a novel multifunctional modulator of inflammatory reactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2012;1823:1905-1913. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.029
4. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016;430:64-70. doi:10.1016/j.jim.2016.01.012
5. Musson R, Szukała W, Jura J. MCPIP1 RNase and Its Multifaceted Role. *Int J Mol Sci*. 2020;21:7183. doi:10.3390/ijms21197183
6. Gasiorzek A, Dobosz E, Potempa B, et al. Subversion of Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Keratinocytes via MCPIP-1 Degradation as a Novel Pathogenic Strategy of Inflammophilic Pathobionts. *mBio*. 2021;12(3). doi:10.1128/mBio.00502-21
7. Li Y, Huang S, Huang X, et al. Pharmacological inhibition of MALT1 protease activity suppresses endothelial activation via enhancing MCPIP1 expression. *Cell Signal*. 2018;50:1-8. doi:10.1016/j.cellsig.2018.05.009
8. Chapple ILC, Mealey BL, van Dyke TE, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S68-S77. doi:10.1111/jcpe.12940
9. PAGE RC, KORNMAN KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11. doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x
10. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000*. 2017;75:116-151. doi:10.1111/prd.12181
11. Wim Teughels ILMQNJ. Biofilm and Periodontal Microbiology. In: NEWMAN MG, TAKEI HH, KLOKKEVOLD PR, CARRANZA FA, eds. *Newman and Carranz's Clinical Periodontology*. 13th ed. Elsevier; 2018:527-691.

12. Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: A dental microbial infection. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2:71. doi:10.4103/0976-9668.82317
13. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002;28:12-55. doi:10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x
14. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-187. doi:10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x
15. Cai Z, Lin S, Hu S, Zhao L. Structure and Function of Oral Microbial Community in Periodontitis Based on Integrated Data. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11. doi:10.3389/fcimb.2021.663756
16. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17038. doi:10.1038/nrdp.2017.38
17. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013;62:59-94. doi:10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x
18. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89:S173-S182. doi:10.1002/JPER.17-0721
19. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* 2015;23:141-147. doi:10.1016/j.mib.2014.11.013
20. Tefiku U, Popovska M, Cana A, et al. Determination of the Role of *Fusobacterium Nucleatum* in the Pathogenesis in and Out the Mouth. *Prilozi.* 2020;41(1):87-99. doi:10.2478/prilozi-2020-0026
21. Hasegawa Y, Mans JJ, Mao S, et al. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect Immun.* 2007;75:2540-2547. doi:10.1128/IAI.01957-06
22. Polak D, Ferdman O, Hourri-Haddad Y. *Porphyromonas gingivalis* Capsule-Mediated Coaggregation as a Virulence Factor in Mixed Infection With *Fusobacterium nucleatum* . *J Periodontol.* 2017;88:502-510. doi:10.1902/jop.2016.160397
23. Ishiguro K, Washio J, Sasaki K, Takahashi N. Real-time monitoring of the metabolic activity of periodontopathic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2015;115:22-26. doi:10.1016/j.mimet.2015.05.015
24. Takahashi N. Oral Microbiology and Immunology - 2003 - Takahashi - Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by.
25. Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH. *Fusobacterium Nucleatum* Supports the Growth of *Porphyromonas Gingivalis* in Oxygenated and Carbon-Dioxide-Depleted Environments. *Microbiology.* 2002;148:467-472. doi: 10.1099/00221287-148-2-467.

26. Rosen G, Sela MN. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;256:304-310. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00131.x
27. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. *Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of Fusobacterium Nucleatum*. Vol 9.; 1996.
28. Weiss EI, Shanitzki B, Dotan M, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE, Metzger Z. mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:371-377.
29. Polak D, Shapira L, Weiss EI, Houry-Haddad Y. The role of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on the host response to mixed infection. *J Clin Periodontol.* 2012;39:617-625. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01889.x
30. Feng Z, Weinberg A. Role of Bacteria in Health and Disease of Periodontal Tissues. *Periodontology* 2000. 2006;40:50-76. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00148.x.
31. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol* 2000. 1999;20(1):341-362. doi:10.1111/j.1600-0757.1999.tb00165.x
32. Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:341-349. doi:10.1034/j.1399-302x.2000.150601.x
33. Hasegawa Y, Tribble GD, Baker H v., Mans JJ, Handfield M, Lamont RJ. Role of *Porphyromonas gingivalis* SerB in Gingival Epithelial Cell Cytoskeletal Remodeling and Cytokine Production. *Infect Immun.* 2008;76:2420-2427. doi:10.1128/IAI.00156-08
34. Zhang Y, Wang T, Chen W, et al. Differential protein expression by *Porphyromonas gingivalis* in response to secreted epithelial cell components. *Proteomics.* 2005;5:198-211. doi:10.1002/pmic.200400922
35. Handfield M, Mans JJ, Zheng G, et al. Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. *Cell Microbiol.* 2005;7:811-823. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00513.x
36. Xia Q, Wang T, Taub F, et al. Quantitative proteomics of intracellular *Porphyromonas gingivalis*. *Proteomics.* 2007;7:4323-4337. doi:10.1002/pmic.200700543
37. Coats SR, Berezow AB, To TT, et al. The Lipid A Phosphate Position Determines Differential Host Toll-Like Receptor 4 Responses to Phylogenetically Related

- Symbiotic and Pathogenic Bacteria. *Infect Immun.* 2011;79:203-210. doi:10.1128/IAI.00937-10
38. Bainbridge BW, Darveau RP. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* 2001;59:131-138. doi:10.1080/000163501750266710
 39. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, et al. Porphyromonas gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/476068
 40. Sundqvist G, Bloom GD, Enberg K, Johansson E. Phagocytosis of Bacteroides melaninogenicus and Bacteroides gingivalis in vitro by human neutrophils. *J Periodontal Res.* 1982;17:113-121. doi:10.1111/j.1600-0765.1982.tb01137.x
 41. Travis J, Banbula A, Potempa J. The Role of Bacterial and Host Proteinases in Periodontal Disease. In: *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Kluwer Academic Publishers; :455-465. doi:10.1007/0-306-46826-3_46
 42. POTEPA J, BANBULA A, TRAVIS J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000.* 2000;24:153-192. doi:10.1034/j.1600-0757.2000.2240108.x
 43. Ohshima M, Otsuka K, Suzuki K. Interleukin-1 β stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 1994;29:421-429. doi:10.1111/j.1600-0765.1994.tb01244.x
 44. RYAN ME, GOLUB LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontol 2000.* 2000;24:226-238. doi:10.1034/j.1600-0757.2000.2240111.x
 45. de Andrade KQ, Almeida-da-Silva CLC, Coutinho-Silva R. Immunological Pathways Triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* : Therapeutic Possibilities? *Mediators Inflamm.* 2019;1-20. doi:10.1155/2019/7241312
 46. Lappin DF, McGregor AMP, Kinane DF. The systemic immune response is more prominent than the mucosal immune response in the pathogenesis of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2003;30:778-786. doi:10.1034/j.1600-051X.2003.00372.x
 47. Kurtiş B, Tüter G, Serdar M, et al. Gingival Crevicular Fluid Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Patients With Chronic and Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* 2005;76:1849-1855. doi:10.1902/jop.2005.76.11.1849
 48. Kasnak G, Könönen E, Syrjänen S, et al. NFE2L2/NRF2, OGG1, and cytokine responses of human gingival keratinocytes against oxidative insults of various origin. *Mol Cell Biochem.* 2019;452:63-70. doi:10.1007/s11010-018-3412-y

49. Zhang D, Xu T, Xu Q, et al. Expression profile of macrophage migration inhibitory factor in periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2021;122:105003. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.105003
50. Uehata T, Akira S. mRNA degradation by the endoribonuclease Regnase-1/ZC3H12a/MCPIP-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 2013;1829:708-713. doi:10.1016/j.bbagr.2013.03.001
51. Opal SM, DePalo VA. Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest.* 2000;117:1162-1172. doi:10.1378/chest.117.4.1162
52. Escalona LA, Mastromatteo-Alberga P, Correnti M. Cytokine and metalloproteinases in gingival fluid from patients with chronic periodontitis. *Invest Clin.* 2016;57:131-142.
53. Guzeldemir E, Gunhan M, Ozcelik O, Tastan H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis. *J Oral Sci.* 2008;50:151-159. doi:10.2334/josn.50.151
54. Caldeira FID, Hidalgo MAR, de Carli Dias ML, Scarel-Caminaga RM, Pigossi SC. Systematic review of ratios between disease /health periodontitis modulators and meta-analysis of their levels in gingival tissue and biological fluids. *Arch Oral Biol.* 2021;127:105147. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105147
55. Ebersole JL, Singer RE, Steffensen B, Filloon T, Kornman KS. Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Periodontol Res.* 1993;28:543-546. doi:10.1111/j.1600-0765.1993.tb02121.x
56. Cochran DL. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2008;79:1569-1576. doi:10.1902/jop.2008.080233
57. Leibbrandt A, Penninger JM. RANKL/RANK as Key Factors for Osteoclast Development and Bone Loss in Arthropathies. In: ; 2009:100-113. doi:10.1007/978-1-4419-0298-6_7
58. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK(L) as a Key Target for Controlling Bone Loss. In: ; 2009:130-145. doi:10.1007/978-0-387-89520-8_9
59. Czusak CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E2 potentiates interleukin-1 β induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol.* 1996;23:635-640. doi:10.1111/j.1600-051X.1996.tb00587.x
60. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, et al. IL-17 Promotes Bone Erosion in Murine Collagen-Induced Arthritis Through Loss of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin Balance. *The Journal of Immunology.* 2003;170:2655-2662. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2655
61. Dobosz E, Wilamowski M, Lech M, et al. MCPIP-1, Alias Regnase-1, Controls Epithelial Inflammation by Posttranscriptional Regulation of IL-8 Production. *J Innate Immun.* 2016;8:564-578. doi:10.1159/000448038

62. Jin Z, Zheng E, Sareli C, Kolattukudy PE, Niu J. Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein 1 (MCPIP-1): A Key Player of Host Defense and Immune Regulation. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.727861
63. Lin J, Li G, Xu C, et al. Monocyte Chemotactic Protein 1-Induced Protein 1 Is Highly Expressed in Inflammatory Bowel Disease and Negatively Regulates Neutrophil Activities. *Mediators Inflamm.* 2020;1-15. doi:10.1155/2020/8812020
64. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, et al. Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. *Cell.* 2015;161:1058-1073. doi:10.1016/j.cell.2015.04.029
65. Miao R, Huang S, Zhou Z, et al. Targeted disruption of MCPIP1/Zc3h12a results in fatal inflammatory disease. *Immunol Cell Biol.* 2013;91:368-376. doi:10.1038/icb.2013.11
66. Fischer M, Weinberger T, Schulz C. The immunomodulatory role of Regnase family RNA-binding proteins. *RNA Biol.* 2020;17:1721-1726. doi:10.1080/15476286.2020.1795584
67. Tanaka H, Arima Y, Kamimura D, et al. Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response. *Journal of Experimental Medicine.* 2019;216:1431-1449. doi:10.1084/jem.20181078
68. Tanaka H, Arima Y, Kamimura D, et al. Phosphorylation-dependent Regnase-1 release from endoplasmic reticulum is critical in IL-17 response. *Journal of Experimental Medicine.* 2019;216:1431-1449. doi:10.1084/jem.20181078
69. Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, et al. MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates MicroRNA Biogenesis through Precursor MicroRNA Degradation. *Mol Cell.* 2011;44:424-436. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.012
70. Niu J, Shi Y, Xue J, et al. USP10 inhibits genotoxic NF- κ B activation by MCPIP1-facilitated deubiquitination of NEMO. *EMBO J.* 2013;32:3206-3219. doi:10.1038/emboj.2013.247
71. Li Y, Huang S, Huang X, et al. Pharmacological inhibition of MALT1 protease activity suppresses endothelial activation via enhancing MCPIP1 expression. *Cell Signal.* 2018;50:1-8. doi:10.1016/j.cellsig.2018.05.009
72. Schmitt A, Grondona P, Maier T, et al. MALT1 Protease Activity Controls the Expression of Inflammatory Genes in Keratinocytes upon Zymosan Stimulation. *Journal of Investigative Dermatology.* 2016;136:788-797. doi:10.1016/j.jid.2015.12.027
73. Mäkelä M, Larjava H, Pirilä E, et al. Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase A) Is Related to Migration of Keratinocytes. *Exp Cell Res.* 1999;251:67-78. doi:10.1006/excr.1999.4564

74. Pöllänen MT, Gürsoy UK, Könönen E, Uitto VJ. Fusobacterium nucleatum Biofilm Induces Epithelial Migration in an Organotypic Model of Dento-Gingival Junction. *J Periodontol*. 2012;83:1329-1335. doi:10.1902/jop.2012.110535
75. Gürsoy UK, Pöllänen M, Könönen E, Uitto VJ. Biofilm Formation Enhances the Oxygen Tolerance and Invasiveness of Fusobacterium nucleatum in an Oral Mucosa Culture Model. *J Periodontol*. 2010;81:1084-1091. doi:10.1902/jop.2010.090664
76. Oksanen J, Hormia M. An Organotypic In Vitro Model That Mimics the Dento-Epithelial Junction. *J Periodontol*. 2002;73:86-93. doi:10.1902/jop.2002.73.1.86
77. Gürsoy UK, Salli K, Söderling E, Gürsoy M, Hirvonen J, Ouwehand AC. Regulation of hBD-2, hBD-3, hCAP18/LL37, and Proinflammatory Cytokine Secretion by Human Milk Oligosaccharides in an Organotypic Oral Mucosal Model. *Pathogens*. 2021;10:739. doi:10.3390/pathogens10060739
78. Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, et al. Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4+ Helper T Cells Regulates Immune Activation. *Cell*. 2013;153:1036-1049. doi:10.1016/j.cell.2013.04.034
79. Mizgalska D, Węgrzyn P, Murzyn K, et al. Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 β mRNA. *FEBS Journal*. 2009;276:7386-7399. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07452.x
80. Zhang S, Wang M, Wang C, et al. Intrinsic Abnormalities of Keratinocytes Initiate Skin Inflammation through the IL-23/T17 Axis in a MALT1-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*. 2021;206:839-848. doi:10.4049/jimmunol.2001031
81. Maekawa T, Krauss JL, Abe T, et al. Porphyromonas gingivalis Manipulates Complement and TLR Signaling to Uncouple Bacterial Clearance from Inflammation and Promote Dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2014;15:768-778. doi:10.1016/j.chom.2014.05.012
82. Qin H, Wu T, Liu J, et al. MALT-1 inhibition attenuates the inflammatory response of ankylosing spondylitis by targeting NF- κ B activation. *Injury*. 2021;52:1287-1293. doi:10.1016/j.injury.2021.03.053
83. Mizgalska D, Węgrzyn P, Murzyn K, et al. Interleukin-1-inducible MCPIP protein has structural and functional properties of RNase and participates in degradation of IL-1 β mRNA. *FEBS Journal*. 2009;276:7386-7399. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07452.x

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MCPIP-1'İN DİŞ ETİ BAĞIŞIKLIK YANITI ÜZERİNDE DÜZENLEYİCİ ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 18	% 14	% 10	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Yigit Firatli, Erhan Firatli, Vuokko Loimaranta, Samira Elmanfi, Ulvi K. Gürsoy. "Regulation of Gingival Keratinocyte Monocyte Chemoattractant Protein.1-Induced Protein (MCPIP).1 and Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein (MALT).1 Expressions by Periodontal Bacteria, Lipopolysaccharide and Interleukin.1 β ", Journal of Periodontology, 2022 Yayın	% 4
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 3
3	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	% 2
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
6	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	

