

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



İNSAN PSMD4 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

MESUT ACAR

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU
Doç. Dr. Aylin ER
Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT

BALIKESİR, OCAK - 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**İnsan PSMD4 Geninin Moleküler Karakterizasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Mesut ACAR

(imza)

ÖZET

İNSAN PSMD4 GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU
DOKTORA TEZİ
MESUT ACAR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, OCAK - 2023

Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), protein homeostazını düzenleyerek hücrel süreçlerin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde kritik rol oynar. PSMD4 geni, UPS’de görev alan 26S proteazomun başlıca ubikitin reseptörü olarak hizmet eden alt birimlerinden birini kodlar. Ayrıca PSMD4 geni, karboksil ucunda ek üç amino asit içeren angiosidin proteinini de kodlamaktadır. Her iki protein de çeşitli kanser tiplerinde tümör ilerlemesiyle ilişkilidir. Literatürde, PSMD4 geninin pankreas kanserindeki rolünü ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, PSMD4 geninden yönlendirilmiş mutagenezle angiosidin geni elde edildi ve her iki gen de pEGFP-C1 vektörüne klonlandı. PSMD4 ve angiosidin genleri, PANC-1 ve HUVEC hücrelerine geçici transfeksiyonla aktarıldı. Genlerin over ekspresyonu real-time PCR, western blot, flow sitometri ve GFP analizleri ile doğrulandı. PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde proliferasyonunu, migrasyonunu ve koloni oluşum yeteneğini arttırmaktadır. Ek olarak over ekspresyonun EMT ve apoptoz süreçleriyle ilişkili bazı genlerin ekspresyonuna etkisi mRNA düzeyinde belirlendi. Çalışmada ayrıca PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki PSMD4 geninin kısmi susturulması shRNA kullanılarak gerçekleştirildi. PSMD4 gen susturulması real-time PCR ve immüno Floresan analizleri ile doğrulandı. PSMD4 susturulması hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve koloni oluşum yeteneğini PANC-1 hücrelerinde azaltırken HUVEC hücrelerinde arttırmaktadır. Çalışmanın devamında VEGF sitokininin PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 gen ekspresyonunu mRNA ve protein seviyesinde arttırdığı belirlendi. VEGF’in PSMD4 gen regülasyonunu P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K yolları üzerinden etkilediği mRNA ve protein düzeyinde gösterildi. Son olarak PSMD4 genine ait üç promotor parçasının PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki transkripsiyonel aktivitesi belirlendi. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bilgilerin PSMD4 genini hedef alan tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELELER: PSMD4, angiosidin, over ekspresyon, susturma, pankreas kanseri, VEGF, S5A/Rpn10

Bilim Kodları : 20320, 20326, 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 167

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE HUMAN PSMD4 GENE

PH.D THESIS

MESUT ACAR

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JANUARY - 2023

The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays a critical role in the healthy progression of cellular processes by regulating protein homeostasis. The PSMD4 gene encodes one of the subunits of the 26S proteasome in UPS, which serves as the major ubiquitin receptor. In addition, the PSMD4 gene encodes the angiocidin protein with an additional three amino acids at the carboxyl terminus. PSMD4 and angiocidin proteins share similar sequences and have common binding interactions. There is no study in the literature revealing the role of the PSMD4 gene in pancreatic cancer. In this study, the angiocidin gene was obtained from PSMD4 gene by directed mutagenesis and both genes were cloned into pEGFP-C1 vector. PSMD4 and angiocidin genes were transferred into PANC-1 and HUVEC cells by transient transfection. Overexpression of genes was confirmed by real-time PCR, western blot, flow cytometry, and GFP analyses. Overexpression of PSMD4 and angiocidin increases proliferation, migration and colony formation ability in PANC-1 and HUVEC cells. In addition, the effect of overexpression on the expression of some genes associated with EMT and apoptosis processes was determined at the mRNA level. Also, partial silencing of PSMD4 gene in PANC-1 and HUVEC cells was performed using shRNA. PSMD4 gene silencing was confirmed by real-time PCR and immunofluorescence analyses. PSMD4 silencing reduces cell proliferation, migration, and colony formation ability in PANC-1 cells while increasing it in HUVEC cells. In the continuation of the study, it was determined that VEGF cytokine increased PSMD4 gene expression at mRNA and protein level in PANC-1 and HUVEC cells. VEGF was shown to affect PSMD4 gene regulation via P38 MAP kinase, JNK, MEK and PI3K pathways at the mRNA and protein level. Finally, the transcriptional activity of three promoter fragments of the PSMD4 gene in PANC-1 and HUVEC cells was determined. We foresee that the information obtained as a result of this thesis study will contribute to the development of treatments targeting the PSMD4 gene.

KEYWORDS: PSMD4, angiocidin, overexpression, silencing, pancreatic cancer, VEGF, S5A/Rpn10

Science Codes : 20320, 20326, 20606, 20610

Page Number : 167

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOL LİSTESİ	xi
ÖN SÖZ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Protein Yıkımı.....	1
1.2 Ubikitin – Proteazom Sistemi	2
1.2.1 Ubikitin Sistemi	3
1.2.2 Proteazom.....	4
1.2.2.1 20S Çekirdek Parçacık	5
1.2.2.2 19S Düzenleyici Parçacık.....	5
1.3 PSMD4 Geni.....	6
1.3.1 ASF.....	8
1.3.2 S5A.....	8
1.3.3 Angiosidin.....	10
1.4 PSMD4 Geni ve Kansere İlişkisi	11
1.4.1 Angiosidin-Kansere İlişkisi	11
1.4.2 PSMD4-Kansere İlişkisi	14
1.5 Pankreas Kanseri.....	15
1.6 VEGF Ailesi ve Reseptörleri	17
1.7 Pankreas Kanseri ve VEGF ilişkisi.....	19
2. TEZİN AMACI VE KAPSAMI	22
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	26
3.1 Materyal	26
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Cihazları.....	26
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	27
3.1.3 Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteri Soyları	29
3.1.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Vektörler.....	29
3.1.5 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Soyları.....	31
3.2 Yöntemler	32
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu	32
3.2.2 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Teknikler	32
3.2.2.1 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	32
3.2.2.2 Kompetent Hücre Hazırlanması	32
3.2.2.3 Transformasyon.....	33
3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması	34
3.2.2.5 Kompetent Hücrenin Etkinliğinin Hesaplanması.....	34
3.2.2.6 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu.....	34
3.2.2.7 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu.....	35
3.2.3 DNA ile İlgili Teknikler.....	36

3.2.3.1	DNA Miktar Tayini	36
3.2.3.2	Primer Tasarımı	36
3.2.3.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	36
3.2.3.4	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	37
3.2.3.5	Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması.....	37
3.2.3.6	Restriksiyon Endonükleaz Kesimi	38
3.2.3.7	Ligasyon	38
3.2.3.8	PCR Tabanlı Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği.....	38
3.2.3.9	shRNA Hazırlama Tekniği.....	39
3.2.4	Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler	40
3.2.4.1	Besiyeri Serumunun Hazırlanması	40
3.2.4.2	Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması	40
3.2.4.3	Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	40
3.2.4.4	Hücre Soyunun Başlatılması	40
3.2.4.5	Hücrelerin Pasajlanması	41
3.2.4.6	Hücrelerin Dondurulması	41
3.2.4.7	Hücre Canlılığının ve Sayısının Belirlenmesi	42
3.2.4.8	Sitokin Deneylerinin Kurulması.....	43
3.2.4.9	Yolak İnhibisyon Deneylerinin Kurulması	43
3.2.5	Transfeksiyon Çalışmaları ile İlgili Teknikler	44
3.2.5.1	Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon.....	44
3.2.5.2	Ticari Transfeksiyon Reaktifleri ile Geçici Transfeksiyon	45
3.2.6	Flow Sitometri Yöntemi.....	45
3.2.7	Sitotoksikite Deneyi	46
3.2.8	Migrasyon Deneyi.....	47
3.2.9	Koloni Formasyon Deneyi	48
3.2.10	Floresan Çalışmaları ile İlgili Teknikler	48
3.2.10.1	Floresan Mikroskopunda GFP Analizi.....	49
3.2.10.2	İmmünofloresan (IFC) Deneyi	50
3.2.10.3	Floresan Miktarının Belirlenmesi.....	51
3.2.11	Salınan Sistem Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi	51
3.2.12	RNA ile İlgili Teknikler.....	52
3.2.12.1	RNA İzolasyonu	52
3.2.12.2	RNA Miktar Tayini	53
3.2.12.3	RNA Formaldehit-Agaroz Jel Elektroforezi	53
3.2.12.4	Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	54
3.2.12.5	Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA Sentezi	54
3.2.12.6	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cDNA Kalite Kontrolü	54
3.2.12.7	Real-Time PCR	55
3.2.13	Protein ile İlgili Teknikler	57
3.2.13.1	Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi	57
3.2.13.2	Hüresel Proteinlerin Ekstraksiyonu	59
3.2.13.3	Proteinlerin Kantitatif Belirlenmesi	59
3.2.13.4	SDS-PAGE.....	60
3.2.13.5	SDS Jeldeki Proteinlerin Membrana Blotlanması.....	61
3.2.13.6	Proteinlere Antikor Uygulanması (İmmünooblotlama)	61
3.2.13.7	Görüntüleme ve Analiz	62
3.2.14	İstatistiksel Analiz	62
4.	BULGULAR.....	63

4.1 Alt Klonlama Çalışmaları	63
4.1.1 Klonlama Primeri Tasarımı.....	63
4.1.2 PSMD4 Genini pEGFP-C1 Vektörüne Alt Klonlama	63
4.2 Yönlendirilmiş Mutagenез Çalışmaları	68
4.2.1 Yönlendirilmiş Mutagenез için Primer Tasarımı.....	68
4.2.2 Angiosidin Genini Mutagenез ile Elde Ederek pEGFP-C1 Vektörüne Klonlama	68
4.3 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Aşırı Ekspresyonu	76
4.3.1 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Over Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi.....	76
4.3.2 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Over Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Belirlenmesi.....	78
4.3.3 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Over Ekspresyonunun Flow Sitometriyle Belirlenmesi.....	80
4.4 PSMD4 ve Angiosidin Proteinlerinin Hücresel Lokalizasyonunun Floresans ile İncelenmesi	82
4.5 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücresel Düzeydeki Etkilerinin Belirlenmesi	85
4.5.1 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücre Sitotoksitesine Etkisinin İncelenmesi	86
4.5.2 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücre Migrasyonuna Etkisinin İncelenmesi	88
4.5.3 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisinin İncelenmesi.....	92
4.5.4 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun EMT ve Apoptoz Süreçleriyle İlişkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	95
4.6 PSMD4 Geninin Susturulma Çalışmaları	98
4.6.1 shRNA Oligolarının Tasarımı	98
4.6.2 shRNA Oligoların pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanması.....	99
4.7 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Susturulması	100
4.7.1 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücre Hatlarında Susturulmasının mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	100
4.7.2 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücre Hatlarında Susturulmasının Protein Düzeyinde IFC ile Belirlenmesi	102
4.8 PSMD4 Geninin Susturulmasının Hücresel Düzeydeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	105
4.8.1 PSMD4 Geni Susturulmasının Hücre Sitotoksitesine Etkisinin İncelenmesi	105
4.8.2 PSMD4 Geni Susturulmasının Hücre Migrasyonuna Etkisinin İncelenmesi	106
4.8.3 PSMD4 Geni Susturulmasının Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisinin İncelenmesi	109
4.9 İnsan PSMD4 Geninin VEGF Sitokini ile Regülasyonu	110
4.9.1 VEGF Sitokininin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	110
4.9.2 VEGF Sitokininin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerinde PSMD4 Genine Etkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	112
4.9.3 VEGF Sitokininin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerinde PSMD4 Genine Etkisinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi	114
4.10 Yolak İnhibisyon Çalışmaları	116

4.10.1 VEGF Sitokininin PSMD4 Regülasyonunda Kullandığı Yolakların mRNA Düzeyinde Belirlenmesi	116
4.10.2 VEGF Sitokininin PSMD4 Regülasyonunda Kullandığı Yolakların Protein Düzeyinde Belirlenmesi	118
4.11 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitesinin İncelenmesi ..	121
4.11.1 PSMD4 Geni P2: 326 bç (-274/+52) Promotor Parçasının pMetLuc-Reporter Vektörüne Klonlanması	121
4.11.2 Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz ve SEAP Sisteminde Optimizasyonu .	124
4.11.3 PSMD4 Geni Promotor Parçalarının Bazal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	125
4.11.4 VEGF Sitokininin PSMD4 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi	126
4.11.5 VEGF Sitokini ve Yolak İnhibitörlerinin PSMD4 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi	128
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	132
6. KAYNAKLAR	139
EKLER	153
EK A.1: PSMD4 Geni Transkript Varyant 2 (PSMD4) mRNA Nükleotit Dizisi.....	153
EK A.2: PSMD4 Geni Transkript Varyant 1 (Angiosidin) mRNA Nükleotit Dizisi.....	154
EK B: PSMD4 ve Angiosidin Gen Dizilerinin Karşılaştırılması	155
EK C: PSMD4 Varyant 2 mRNA'sı Restriksiyon Haritası.....	156
EK D: Alt Klonlama Dizi Sonuçlarının Karşılaştırılması	159
EK E: PCR1 ve PCR2 için Çoğalma Bölgeleri	160
EK F: Susturma Çalışmalarında Kullanılan Vektörler	161
EK G: PSMD4 Promotor Parçalarının Dizi Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	162
EK H: Kullanılan Büyüklük Belirteçleri	163
EK I: Salınan Lusiferaz ve SEAP Sisteminin Akış Şeması	164
EK İ.1: Dünyada En Yaygın Görülen 10 Kanserin 2020 Yılı Tahmini Dağılımı	165
EK İ.2: Pankreas Kanserinin Yaşa Standardize İnsidans Oranları (Dünya/2020 Yılı)	166
ÖZGEÇMİŞ	167

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Ubikitin-proteazom sisteminin genel yapısı	2
Şekil 1.2: Ubikitinasyon yolunda görev alan enzimler	3
Şekil 1.3: 26S proteazomun şematik gösterimi (A: Genel yapısı, B: Alt birimleri)	5
Şekil 1.4: İnsan PSMD4 geninin 1. kromozom üzerindeki lokasyonu	6
Şekil 1.5: PSMD4 proteinlerindeki işlevsel bölgeler	7
Şekil 1.6: TSP-1'in tek bir alt biriminin multimodüler yapısının şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.7: VEGF ailesi üyeleri ve reseptörleri	17
Şekil 1.8: VEGFA-VEGFR2 sinyal iletim yolağının şematik gösterimi	19
Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılan basamakları özetleyen akış diyagramı	25
Şekil 3.1: pcDNA 3.3-TOPO ve pEGFP-C1 vektörlerinin şematik gösterimi	30
Şekil 3.2: pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektörlerinin şematik gösterimi.	30
Şekil 3.3: pMETLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektörlerinin şematik gösterimi.	31
Şekil 3.4: Çalışmada kullanılan hücre hatları.	31
Şekil 3.5: PCR-tabanlı mutagenез tekniğinin basamakları.....	39
Şekil 3.6: Thoma lamı şematik gösterimi.	42
Şekil 3.7: MTT testinde gerçekleşen kimyasal değişim.....	46
Şekil 3.8: Çalışmada kullanılan hücrelerdeki formazan kristallerinin görüntüsü.	47
Şekil 3.9: Western blot yönteminin akış şeması.	57
Şekil 3.10: Bradford yöntemi BSA standart eğrisi.	59
Şekil 4.1: PSMD4-pcDNA-3.3-TOPO vektöründeki geni pEGFP-C1 vektörüne alt klonlama basamakları.	64
Şekil 4.2: Klonlama PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü	65
Şekil 4.3: Klonlama PCR kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	66
Şekil 4.4: pEGFP-C1 vektörü kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	66
Şekil 4.5: Alt klonlama kontrolü için restriksiyon kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	67
Şekil 4.6: PSMD4-pcDNA-3.3-TOPO vektöründeki PSMD4 geninin mutasyona uğratılarak pEGFP- C1 vektörüne alt klonlanmasının basamakları.	69
Şekil 4.7: PCR1 ve PCR2 ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	70
Şekil 4.8: PCR3 ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü	72
Şekil 4.9: PCR3 kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	72
Şekil 4.10: Mutasyon klonlamasının kontrolü için kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	73
Şekil 4.11: Mutasyon klonlaması doğrulanması için kesim ürünlerinin kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	74
Şekil 4.12: Yönlendirilmiş mutagenез dizi sonuçlarının karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.13: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun mRNA seviyesinde gösterilmesi	77
Şekil 4.14: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun mRNA seviyesinde gösterilmesi.	77
Şekil 4.15: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun protein bantları.....	78
Şekil 4.16: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun protein bantları.	78
Şekil 4.17: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun protein seviyesinde gösterilmesi.	79
Şekil 4.18: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun protein seviyesinde gösterilmesi.	79
Şekil 4.19: PANC-1 hücrelerindeki GFP ekspresyon sinyali histogramları.	80
Şekil 4.20: HUVEC hücrelerindeki GFP ekspresyon sinyali histogramları.	81
Şekil 4.21: Transfekte PANC-1 hücrelerindeki GFP sinyalinin flow sitometri analizi.	81

Şekil 4.22: Transfekte HUVEC hücrelerindeki GFP sinyalinin flow sitometri analizi.	82
Şekil 4.23: PANC-1 hücrelerinde GFP etiketli PSMD4 ve angiosidin proteinlerinin hüresel lokalizasyonu.....	83
Şekil 4.24: HUVEC hücrelerinde GFP etiketli PSMD4 ve angiosidin proteinlerinin hüresel lokalizasyonu.....	84
Şekil 4.25: PANC-1 hücrelerindeki GFP sinyal yoğunluğu	85
Şekil 4.26: HUVEC hücrelerindeki GFP sinyal yoğunluğu	85
Şekil 4.27: MTT testi için PANC-1 hücrelerinde optimum sayının belirlenmesi.....	86
Şekil 4.28: MTT testi için HUVEC hücrelerinde optimum sayının belirlenmesi.....	86
Şekil 4.29: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun zamana bağlı hücre canlılığına etkisinin MTT analizi	87
Şekil 4.30: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun zamana bağlı hücre canlılığına etkisinin MTT analizi	88
Şekil 4.31: PANC-1 için farklı zaman aralıklarına ait scratch testi görüntüleri.	89
Şekil 4.32: HUVEC için farklı zaman aralıklarına ait scratch testi görüntüleri.....	90
Şekil 4.33: PANC-1 hücre hattında yapılan over ekspresyonunun hücre göçüne etkisi.....	91
Şekil 4.34: HUVEC hücre hattında yapılan over ekspresyonunun hücre göçüne etkisi.....	91
Şekil 4.35: Koloni formasyon testi için optimum hücre sayısının belirlenmesi.	92
Şekil 4.36: PANC-1 için koloni formasyon görüntüleri.	93
Şekil 4.37: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun koloni oluşumuna etkisi.....	93
Şekil 4.38: HUVEC için koloni formasyon görüntüleri.....	94
Şekil 4.39: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun koloni oluşumuna etkisi.....	94
Şekil 4.40: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun EMT ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi	96
Şekil 4.41: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi	96
Şekil 4.42: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun EMT ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi	97
Şekil 4.43: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi	97
Şekil 4.44: shRNA oligo- pLKO.1 klonlamasının kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü	99
Şekil 4.45: PANC-1 hücre hattında gen susturulmasının mRNA seviyesine etkisi.....	101
Şekil 4.46: HUVEC hücre hattında gen susturulmasının mRNA seviyesine etkisi.....	101
Şekil 4.47: PANC-1 hücrelerinde gen susturulmasının immünofloresan yöntemle görüntülenmesi.	102
Şekil 4.48: HUVEC hücrelerinde gen susturulmasının immünofloresan yöntemle görüntülenmesi.	103
Şekil 4.49: PANC-1 hücrelerinde gen susturulmasının floresan sinyal yoğunluğu.....	104
Şekil 4.50: HUVEC hücrelerinde gen susturulmasının floresan sinyal yoğunluğu.....	104
Şekil 4.51: PANC-1 hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının zamana bağlı hücre canlılığına etkisi.....	105
Şekil 4.52: HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının zamana bağlı hücre canlılığına etkisi.....	106
Şekil 4.53: PANC-1'de PSMD4 geni susturulmasının scratch testi görüntüleri.	107
Şekil 4.54: PANC-1 hücrelerinde susturulan PSMD4 geninin hücre göçüne etkisi.	107
Şekil 4.55: HUVEC'de PSMD4 geni susturulmasının scratch testi görüntüleri.....	108
Şekil 4.56: HUVEC hücrelerinde susturulan PSMD4 geninin hücre göçüne etkisi.	108
Şekil 4.57: PANC-1'de PSMD4 geni susturulmasının koloni oluşumuna etkisi.....	109
Şekil 4.58: HUVEC'de PSMD4 geni susturulmasının koloni oluşumuna etkisi.....	110

Şekil 4.59: PANC-1 hücrelerinde farklı dozlardaki VEGF sitokininin sitotoksik etkisi ..	111
Şekil 4.60: HUVEC hücrelerinde farklı dozlardaki VEGF sitokininin sitotoksik etkisi ..	112
Şekil 4.61: PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi	113
Şekil 4.62: HUVEC hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi.	114
Şekil 4.63: PANC-1 hücrelerinde yapılan sitokin deneyi protein bantları.....	115
Şekil 4.64: PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi.	115
Şekil 4.65: HUVEC hücrelerinde yapılan sitokin deneyi protein bantları.....	116
Şekil 4.66: HUVEC hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi.	116
Şekil 4.67: PANC-1 hücrelerinde inhibitörlerin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine etkisi.....	117
Şekil 4.68: HUVEC hücrelerinde inhibitörlerin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine etkisi.....	118
Şekil 4.69: PANC-1 hücrelerinde yapılan yolak inhibisyon deneyi protein bantları.....	119
Şekil 4.70: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine etkisi.	119
Şekil 4.71: HUVEC hücrelerinde yapılan yolak inhibisyon deneyi protein bantları.....	120
Şekil 4.72: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine etkisi.	120
Şekil 4.73: P2: 326 bç promotör parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	121
Şekil 4.74: P2 promotör parçasını içeren pMetLuc-reporter vektörü kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	122
Şekil 4.75: Promotör parçalarının restriksiyon endonükleaz kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	123
Şekil 4.76: PSMD4 promotör parçalarının şematik gösterimi	123
Şekil 4.77: pMetLuc-kontrol ve pMetLuc-reporter vektörlerinin transfeksiyon etkinliği.	124
Şekil 4.78: PANC-1 hücrelerindeki PSMD4 promotör parçalarının bazal aktivitesi	125
Şekil 4.79: HUVEC hücrelerindeki PSMD4 promotör parçalarının bazal aktivitesi.....	126
Şekil 4.80: PANC-1 hücrelerinde VEGF'in PSMD4 promotör parçalarının transkripsiyonel aktivitesine etkisi.	127
Şekil 4.81: HUVEC hücrelerinde VEGF'in PSMD4 promotör parçalarının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	127
Şekil 4.82: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P1: 150 bç (-98/+52) promotör parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	128
Şekil 4.83: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P2: 326 bç (-274/+52) promotör parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	129
Şekil 4.84: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P3: 683 bç (-631/+52) promotör parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	129
Şekil 4.85: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P1: 150 bç (-98/+52) promotör parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	130
Şekil 4.86: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P2: 326 bç (-274/+52) promotör parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	130
Şekil 4.87: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P3: 683 bç (-631/+52) promotör parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi	131

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.....	26
Tablo 3.2: Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların ve malzemelerin listesi.	27
Tablo 3.3: Transformasyon aşamasında kullanılan bakteri soyları.	29
Tablo 3.4: PCR döngü koşulları.	36
Tablo 3.5: DNA agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.	37
Tablo 3.6: Ligasyon ortamı bileşenleri.....	38
Tablo 3.7: Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler.....	40
Tablo 3.8: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitörler ve son konsantrasyonları.....	43
Tablo 3.9: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.	44
Tablo 3.10: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözelti bileşenleri.....	45
Tablo 3.11: MTT testinde kullanılan çözeltiler.	46
Tablo 3.12: Floresan çalışmalarda kullanılan çözeltiler.	49
Tablo 3.13: Formaldehit agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	53
Tablo 3.14: RT reaksiyonu bileşenleri ve yapılan işlemler.	54
Tablo 3.15: PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleri.	55
Tablo 3.16: PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerlerinin PCR bileşenleri.....	55
Tablo 3.17: PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerlerinin PCR döngü şartları.	55
Tablo 3.18: Real-time PCR bileşenleri.....	56
Tablo 3.19: Real-time PCR döngü şartları.	56
Tablo 3.20: EMT ve apoptoz süreçleriyle ilişkili genlerin ekspresyon primerleri.	57
Tablo 3.21: Western blot analizinde kullanılan çözeltiler.	58
Tablo 3.22: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları.....	60
Tablo 4.1: PSMD4 klonlama primerleri.	63
Tablo 4.2: PSMD4 geni alt klonlama PCR bileşenleri.	65
Tablo 4.3: Mutagenez primerleri.	68
Tablo 4.4: PCR1 ve PCR2 bileşenleri.	70
Tablo 4.5: PCR1 ve PCR2 döngü şartları.....	70
Tablo 4.6: PCR3 bileşenleri.....	71
Tablo 4.7: PCR3 döngü şartları.	71
Tablo 4.8: PSMD4 ve angiosidin genleri için tasarlanan shRNA oligoları.....	98
Tablo C.1: PSMD4 varyant 2 mRNA restriksiyon haritası.....	156

KISALTMA VE SEMBOL LİSTESİ

A	: Adenin
A	: Absorbans
α	: Alfa
Ab	: Antikor
Ag	: Antijen
APS	: Amonyum persülfat
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
bç	: Baz çifti
β	: Beta
bk.	: Bakınız
BSA	: Bovine Serum Albumin
C	: Sitozin
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Komplementer DNA (Complementary DNA)
cfu	: Colony forming unit
Ct	: Cycle threshold
CTCF	: Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı (Corrected Total Cell Fluorescence)
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	: Dietil pirokarbonat
dH₂O	: Distile su
dk.	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EDTA	: Etilendiaminetetraasetik asit
EGTA	: Etilenglikoltetraasetik asit
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (Epithelial-Mesenchymal Transition)
ϵ	: Epsilon
Et-Br	: Etidyum bromür
EU (U)	: Enzim ünitesi
FA	: Formaldehit
FCS	: Fetal Calf Serum
G	: Guanin
g	: Gram
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
HeBS	: HEPES'li tuz çözeltisi (HEPES-Buffered Saline)
HEPES	: N-2-Hidroksietilpiperazin-N-2-etansülfonik asit
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Hβ-2-M	: İnsan beta-2-mikroglobulin
IFC	: İmmünofloresan
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
L	: Litre

LB	: Luria Broth
M	: Molar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA (messenger RNA)
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MW	: Moleküler ağırlık
NaAc	: Sodyum Asetat
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
nt	: Nükleotit
OD	: Optik Densite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PANC-1	: Human Pancreatic Carcinoma (Pancreatic ductal epithelioid carcinoma)
PBS	: Fosfatlanmış tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Salin)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PFA	: Paraformaldehit
pH	: $\log (1/[H^+])$
pmol	: Pikomol
PSMD4	: Proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4
PVDF	: Polivinilidin diflorid
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı (Rounds per minute)
RT	: Reverse transkriptaz (transkripsiyon)
S	: Svedberg birimi
sa.	: Saat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEAP	: Salınan alkalın fosfataz (Secreted alkaline phosphatase)
shRNA	: Small hairpin RNA
sn.	: Saniye
T	: Timin
TE	: Tripsin-EDTA
TEMED	: Tetrametiletildiamin
T_m	: Erime sıcaklığı (Melting temperature)
U	: Urasil
Ub	: Ubikitin
UPS	: Ubikitin proteazom sistemi
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
% (v/v)	: Hacimce yüzde
% (w/v)	: Hacimde kütlece yüzde

ÖN SÖZ

Doktora çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrüberiyle yolumu aydınlatan, karşılaştığım zorlukları aşmamda desteğiyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a öncelikle sonsuz teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen başta Prof. Dr. Gülendarn TÜMEN olmak üzere her zaman özlem ve minnetle andığım hocalarıma çok teşekkür ederim

Tez izleme toplantılarında verdikleri değerli katkıları için Doç. Dr. Aylin ER'e ve Doç. Dr. Burcu ERBAYKENT'e ayrıca teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini hiç esirgemeyen değerli hocalarımız Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a ve Doç. Dr. Sümeyye A. TÜRKÖĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora sürecimde gösterdikleri içten ve samimi desteklerinden dolayı Doç. Dr. Esra TOKAY'a, Dr. Öğr. Üyesi Meltem ALPER'e ve Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaştığımız kıymetli arkadaşlarım Kübra PASPAL'a, Ehed M. AYMAZ'a Saliha Derya KESKİN'e, Kamil TOK'a, Yasemin KELEŞ'e, Feyza Nur SAV'a ve diğer ekip arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve beni hep cesaretlendiren değerli dostlarım Serhad ONAT'a ve Ahmet ORUÇ'a minnetle teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca attığım her adımda koşulsuz desteklerini esirgemeyen annem Fatma ACAR'a, babam Hasan ACAR'a, canım kardeşlerim Ayşe ACAR ve Selime ACAR'a, manevi annem ve babam olan Nigar ACAR'a ve Hüseyin ACAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi, hayatımın her anında maddi-manevi desteğini hissettiğim ve onunla paylaştığımız her anı özlemle andığım, rahmetli babaannem Kadire ACAR'a ithaf ediyorum.

Balıkesir, 2023

Mesut ACAR

1. GİRİŞ

1.1 Protein Yıkımı

Proteostaz olarak da bilinen protein homeostazı hücrel süreçlerin sağlığı için kritik öneme sahiptir [1], [2]. Hücrel proteinlerin miktarı değişen fizyolojik ve çevresel koşullara göre ayarlanarak dinamik bir denge içinde tutulur. Herhangi bir proteinin hücre içi seviyesi protein sentezi ve protein yıkımı arasındaki dengeli bir düzenleme ile korunur [3]. Gen ekspresyonunun bir ürünü olarak sentezlenen proteinler gerektiğinde protein yıkım süreciyle ortamdan uzaklaştırılır. Böylece anormal veya gereksiz proteinlerin parçalanarak birikmesi önlenir ve amino asitlerin geri dönüşümü sağlanır [2].

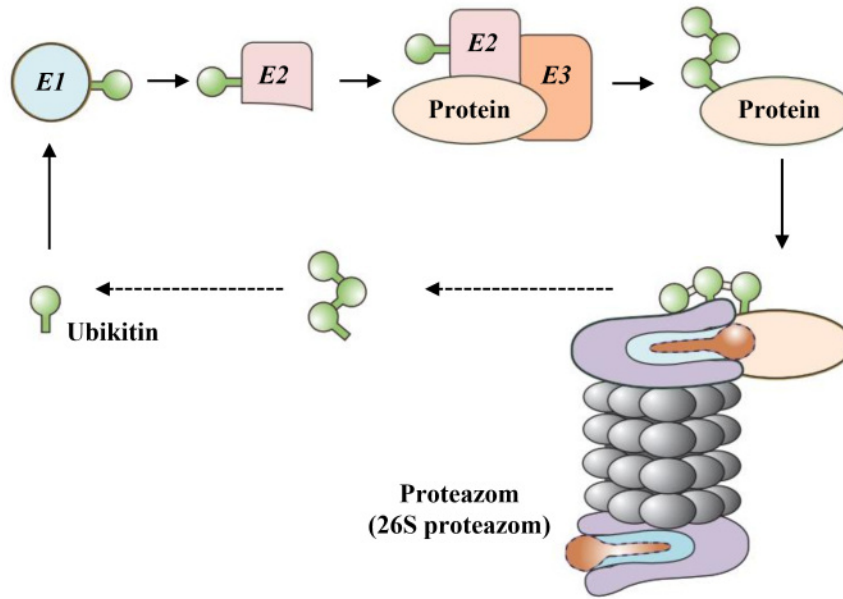
Proteinlerin hücre içinde değişken ancak sınırlı bir ömrü vardır. Ömrü tamamlanan proteinler özel proteolitik sistemler kullanılarak parçalanır [3]. Zar proteinleri, ekstrasellüler proteinler ve uzun ömürlü proteinler lizozomal sistemlerde parçalanır. Anormal veya kısa ömürlü proteinler ise ATP-bağımlı bir sistem olan proteazomda parçalanır [2].

Lizozomlar, katepsinler olarak bilinen çeşitli proteazlar dahil olmak üzere yaklaşık 50 hidrolitik enzim içeren zarla çevrili organellerdir. Lizozomun içi asidik özellik gösterdiğinden enzimleri asidik pH değerinde optimum aktiviteye sahiptir. Lizozomdaki proteazlar, endositozla alınan proteinleri veya otofaj sürecinde hücre içi proteinleri parçalar. İyi beslenmiş hücrelerde lizozomal protein yıkımı seçici değildir. Ancak uzun süreli açlık durumunda aktive olan ve Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) veya yakından ilişkili bir diziyi içeren sitozolik proteinleri içine alıp parçalayan seçici bir yola sahiptir [4].

Proteazomlar, ATP-bağımlı bir süreçle hücre içi proteinlerin yıkımından sorumlu makromoleküllerdir. Hücre içinde yıkılması hedeflenen proteinler ubiquitin kovalent bağlanmasıyla etiketlenir ve ardından ubiquitinlenmiş proteinler multiprotein bir kompleks olan proteazomda seçici olarak yıkılır [3]. Hücre içindeki proteinlerin çoğu ubiquitin-proteazom sistemi tarafından parçalanır [5]. Proteazomların başlangıçta sadece hasarlı veya yanlış katlanmış proteinleri yıktığı düşünülüyordu. Ancak son yıllarda hücre döngüsü ve apoptozu kontrol eden proteinlerin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bundan dolayı proteazomlar kanser tedavisinde dikkate değer hedef haline gelmektedir [6].

1.2 Ubikitin – Proteazom Sistemi

Protein yıkımı başlangıçta nispeten spesifik olmayan bir süreç olarak düşünülürken ubikitin-proteazom sisteminin keşfi bu görüşü önemli ölçüde değiştirmiştir. Proteinlerin ubikitinlenerek proteazom tarafından parçalandığı yola ubikitin-proteazom sistemi (UPS) denir. UPS tarafından yıkılacak proteinlere ilk önce küçük bir protein olan ubikitin eklenir. Bu ubikitin etiketi, yıkılacak proteinleri proteazomun hedefi haline getirir. Son aşamada ise proteazom hedef proteinleri tanır, katlanmasını açar ve parçalar [6], [7]. Bu sürecin genel hatları Şekil 1.1’de gösterilmektedir.



Şekil 1.1: Ubikitin-proteazom sisteminin genel yapısı [8].

Ubikitin-proteazom sistemi tüm ökaryotik hücrelerin sitozol ve çekirdeğindeki ana proteolitik sistemdir. Proteazom inhibisyon çalışmalarıyla kısa ömürlü proteinlerin yanı sıra uzun ömürlü proteinlerin de yıkımında görev aldığı gösterilmiştir [9]. UPS, regüle edilmiş protein yıkımında ana yol olarak hizmet eder ve hücredeki tek tek bireysel protein seviyesini hassas bir şekilde kontrol eder. Özellikle kilit roller üstlenen düzenleyici proteinlerin seviyesini düzenlemesiyle hücresel işlevlerin neredeyse her yönüne katkıda bulunur. UPS ayrıca hücre için toksik olabilecek anormal proteinleri tanıyıp yok ederek protein kalite kontrolünde de işlev gösterir [7]. UPS'nin hedef aldığı proteinleri yıkmasıyla hücre döngüsü, gen ekspresyonu, sinyal iletimi, bağışıklık, apoptoz ve onkogenez gibi süreçler düzenlenmektedir [9]. Bu süreçlerin UPS tarafından düzenli bir şekilde kontrol edilmesi hücresel sağlık için kritik önem arz eder [7].

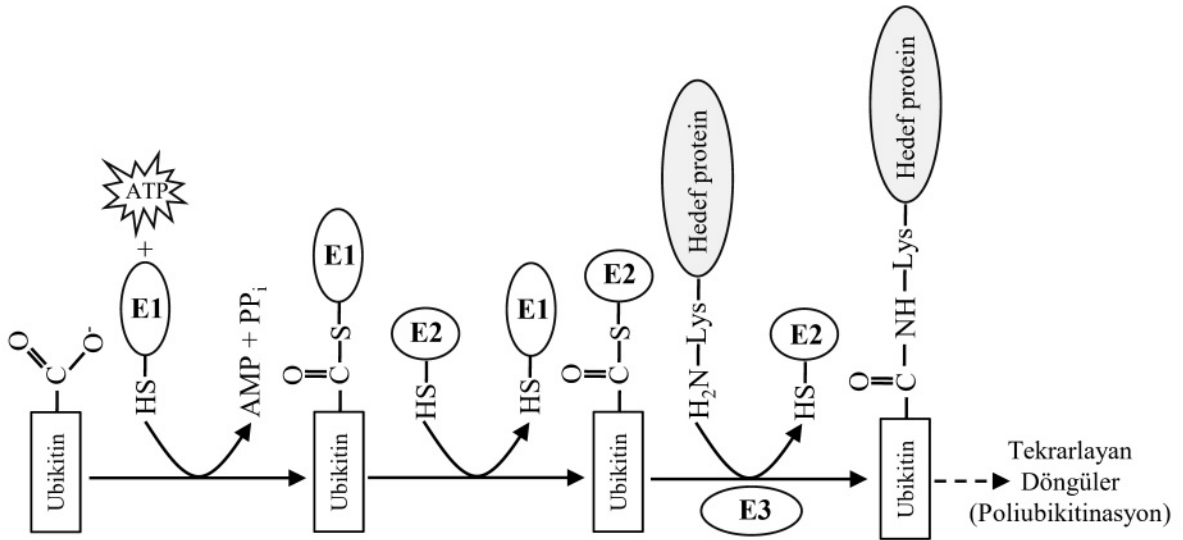
Son yıllarda UPS'deki düzensizliklerin birçok insan hastalığıyla kritik ilişkili olduğu ve UPS'nin çok yönlü ve kapsamlı yapısının bu hastalıkların tedavisinde fırsatlar sağlayacağı öngörülmektedir [7]

1.2.1 Ubikitin Sistemi

Ubikitin-proteazom sisteminde yıkılacak proteinlerin, proteazom tarafından tanınıp parçalanabilmesi için ubikitin eklenerek hedef haline gelmesi gerekir [6]. Ubikitin aracılı protein yıkımıyla ilgili öncül çalışmaları nedeniyle Avram Hershko, Aaron Ciechanover ve Irwin Rose 2004 Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır [10].

Ubikitin, birçok önemli hücresel süreçte yer alan 76 amino asitlik düzenleyici küçük (8,5 kD) bir proteindir [11]. Bilinen en yüksek düzeyde korunmuş proteinlerden biri olan ubikitin, ökaryotlarda yaygın olarak bulunur [2], [7].

Ubikitin hedef proteinlere bağlanma yeteneği için kritik olan bir diglisin (GC) motifi ile biter. Ubikitin C-terminal glisini, hedef proteindeki lizin rezidüsünün ϵ -amino grubuna (ya da bazen hedef proteindeki α -NH₂ terminaline) bir izopeptid bağı yoluyla kovalent bağlanır [7]. Ubikitinasyon olarak adlandırılan bu süreçte bir dizi enzim görev alır. Şekil 1.2'de gösterilen bu enzimler E1 (Ub-aktifleştirici enzim), E2 (Ub-konjuge edici enzim) ve E3 (Ub-protein ligaz) olarak adlandırılır [8], [12].



Şekil 1.2: Ubikitinasyon yolunda görev alan enzimler [2].

Şekil 1.2'de gösterildiği gibi E1 enzimi, ATP'ye bağlı bir süreçle ubikitini aktive ederek ubikitinin C-terminal glisin rezidüsündeki serbest karboksil grubuna tiyoester bağı ile bağlanır. Bu aktive edilmiş ubikitin daha sonra E2 enzime aktarılır. E3 enzimi ise ubikitini, E2 enziminden hedef proteindeki Lys ϵ -NH₂ grubuna (bazen α -NH₂ terminaline) izopeptid bağı ile ekler [2], [8].

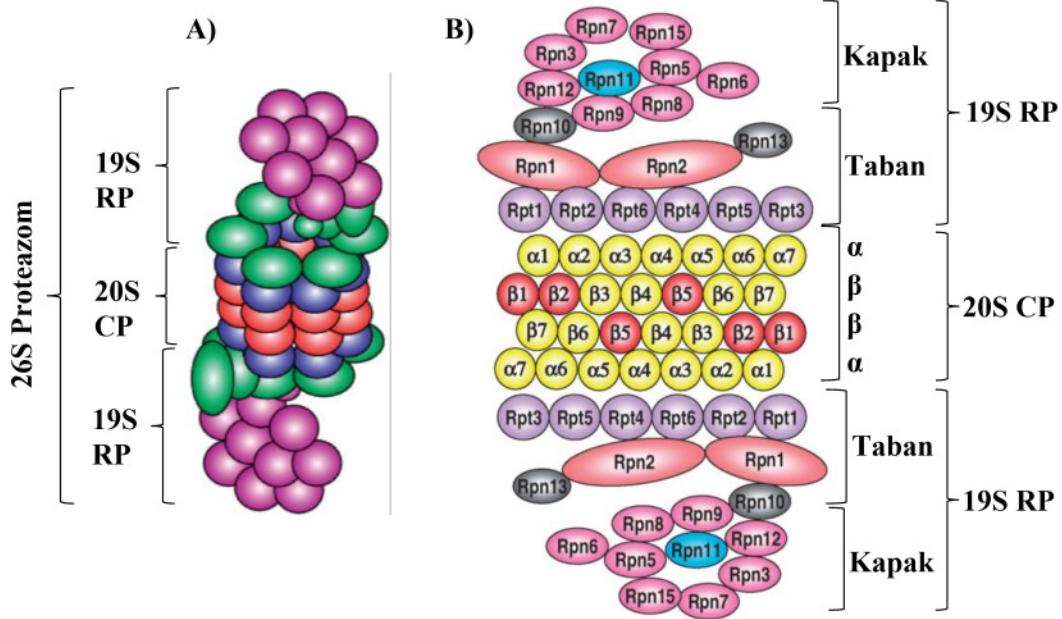
İnsan genomu iki E1 enzimi, yaklaşık kırk E2 enzimi ve yaklaşık altı yüz E3 enzimini kodlamaktadır [11]. E2-E3 enzim çifti arasındaki dört farklı işbirliği de göze aldığımızda binlerce farklı protein substratın özgül bir şekilde ubikitinasyonu sağlanmış olur [7].

Ubikitinin hedef proteinlerdeki bir ya da daha fazla lizine tek molekül olarak eklenmesi monoubikitinasyon durumudur. Ubikitin, 6, 11, 27, 29, 33, 48 ve 63 pozisyonlarında yedi lizin rezidüsü içerir. Ubikitin bu lizinlerden biri aracılığıyla birbirine eklenerek uzun ubikitin zincirleri oluşturur. Bu poliubikitinasyon durumuyla sonuçlanır [7], [8]. Ubikitinin bağlandığı rezidü, monoubikitinasyon veya poliubikitinasyon durumları ve ubikitin zincir uzunluğu substrat proteinleri farklı şekilde etkilemektedir. Bazıları protein lokalizasyonunu değiştirirken, diğerleri protein aktivitesini veya protein stabilitesini düzenler. Örneğin lizin-48 üzerinden gerçekleşen poliubikitinasyon güçlü bir proteazomal yıkım sinyalidir. Diğer ubikitinasyonlar ise yıkımla ilgili olmayan düzenleyici görevlere işaret eder [7], [11].

1.2.2 Proteazom

Genellikle "proteazom" olarak adlandırılan 26S proteazomu, tüm ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde ve sitoplazmasında bulunan ve hücre kütlelerinin %1-2'sini oluşturan multi-katalitik bir enzim kompleksidir [6], [13]. Ubikitinlenmiş proteinler yaklaşık 35 farklı alt birim içeren oldukça büyük (2500 kDa) 26S proteazom kompleksi tarafından parçalanır [7]. Proteazomlar tipik proteazlardan 50-100 kat daha büyüktür ve kritik farklılıklar gösterirler. Protein parçalanmasının ATP bağımlı bir süreçle gerçekleşmesi en temel farklılığı oluşturur [12]. Ayrıca proteazların aksine üç farklı aktif bölgeye sahip olmaları binlerce farklı hedef substratı parçalamasını sağlar [7].

26S proteazom, 20S çekirdek parçacık (CP: core particle) ve 19S düzenleyici parçacık (RP: regulatory particle) adı verilen iki alt kompleksten oluşur. 20S çekirdek parçacık, sırasıyla tek (19S RP1-20S CP) ve çift (19S RP2-20S CP) kapaklı enzimatik olarak aktif bir 26S proteazomu oluşturmak için bir veya iki uçtan çevrelenir [14], [15].



Şekil 1.3: 26S proteazomun şematik gösterimi [15]. (A: Genel yapısı, B: Alt birimleri)

1.2.2.1 20S Çekirdek Parçacık

20S proteazom olarak da adlandırılan 20S çekirdek parçacık (CP) eksensel olarak istiflenmiş dört heteroheptamerik halkadan (iki dış α - ve iki iç β -halkası) oluşur ve silindir şeklinde bir yapıya sahiptir [16], [17]. Halkaların düzenlenişi $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ şeklindedir. İki dış α -halkası, iki β halkası içindeki proteolitik odaya kontrolsüz erişimi engelleyen bir kapı işlevi görür. Kapı, substrat girişini bloke eden α alt birimlerinin sıkıca iç içe geçmiş amino (N) terminal kuyruklarından oluşur [14]. Yedi β alt birimi arasından sadece üçü $\beta 1$ (kaspaz benzeri), $\beta 2$ (tripsin benzeri) ve $\beta 5$ (kimotripsin benzeri) proteolitik aktivitelere sahiptir. $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ alt birimleri sırasıyla asidik, bazik ve hidrofobik amino asit kalıntılarından C-terminal tarafındaki peptit bağlarını parçalar [18].

1.2.2.2 19S Düzenleyici Parçacık

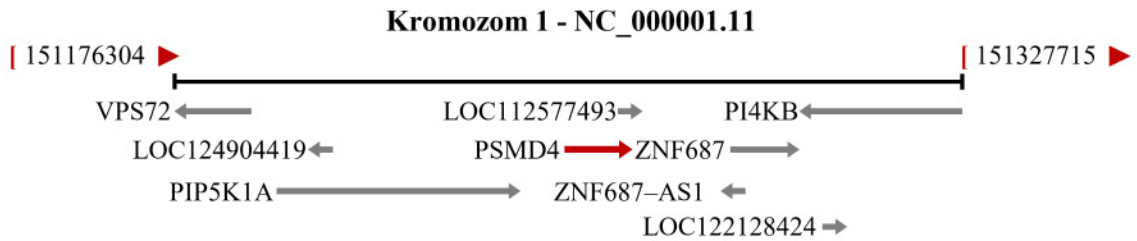
19S düzenleyici parçacık (RP), hedef substratların CP'nin proteolitik odasına tanıtılması, bağlanması, deubikitasyonu, açılması ve translokasyonu yoluyla proteazom işlevini düzenleyen çok işlevli bir komplekstir [16]. 19S düzenleyici parçacık yaklaşık 20 alt birimden oluşur ve bu alt birimler Rpt (Regulatory particle of triple-ATPase) ve Rpn (Regulatory particle of non-ATPase) olarak iki gruba ayrılan molekül kütleleri 10-110 kDa arasında değişen çok sayıda proteinden oluşur. [15]. Ayrıca 19S RP biyokimyasal olarak taban ve kapak alt komplekslerine ayrılabilir [18].

Taban alt kompleksi altı Rpt (Rpt1-Rpt6) ve dört Rpn (Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13) olan alt birimlerden oluşur. AAA+ATPaz özelliğindeki Rpt1-Rpt6 alt birimleri 20S CP'nin dış α -halkasının yüzeyine doğrudan temas edecek şekilde bir halka oluşturur. Rpt alt birimleri, ATP bağımlı bir süreçle substratların açılmasında ve proteolitik odaya translokasyonunda görev alır [15]. ATPaz olmayan alt birimler taban ile kapağın arayüzünde bulunur ve bunlardan Rpn1, Rpn 10 ve Rpn13 proteazom için hedeflenen substratları tanıyan ubiquitin reseptörleri olarak görev yapar [16].

Kapak alt kompleksi ATPaz olmayan dokuz alt birimden (Rpn 3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 ve Rpn15) oluşur [15]. Kapak alt birimleri, proteazomun yapısal yönleri ve deubikitinasyon için önemlidir. İçsel deubikitinaz olan Rpn11, ubiquitin zincirini substrattan ayıran çinko bağımlı bir metaloproteazdır [18].

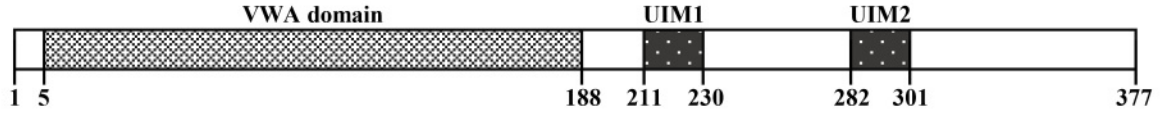
1.3 PSMD4 Geni

Proteazom gen ailesinden olan PSMD4 (Proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4) geni, 10 ekzona sahiptir ve insan genomundaki 1. kromozomun uzun (q) kolunun 21.3 lokasyonunda yer almaktadır. Literatüre bakıldığında PSMD4 geninin ayrıca S5A, Rpn10, AF, AF-1, ASF, MCB1 ve pUB-R5 gibi adlarla anıldığı görülmektedir [19], [20].



Şekil 1.4: İnsan PSMD4 geninin 1. kromozom üzerindeki lokasyonu [19].

PSMD4 geni, 26S proteazomun 19S düzenleyici parçacığının ATPaz olmayan alt birimlerinden birini (Rpn10) kodlamaktadır [19]. Bu PSMD4 (Rpn10) alt birim sahip olduğu ubiquitin etkileşimli motifler (UIM) aracılığıyla ubiquitinlenmiş substratları seçen bir ubiquitin reseptörü olarak hizmet eder. PSMD4'ün N-terminalinde bir VWA (von Willebrand factor A) domaini ve C-terminalinde iki ubiquitin etkileşim motifi (UIM) bulunur [21]–[23].



Şekil 1.5: PSMD4 proteinlerindeki işlevsel bölgeler [22].

Gen bankalarında insan PSMD4 geninin iki farklı transkript varyantı olduğu görülmektedir. Transkript varyant 1 nispeten daha uzundur ve 380 amino asitlik izoform 1 (angiosidin) proteinini kodlamaktadır. Varyant 2 ise varyant 1'e kıyasla alternatif bir çerçeve içi splay bağlantısı kullanır ve 377 amino asitlik izoform 2 (S5A, ASF, Rpn10 v.b) proteinini kodlar. Her iki izoform da aynı N- ve C-terminallerine sahiptir. Ayrıca sahip oldukları motifler arasında bir fark yoktur. Her ikisinde de 2'şer ubiquitin etkileşim motifi (UIM) bulunur [19], [24].

PSMD4 geni, benzer diziyeye sahip ancak farklı işlevleri olan üç protein kodlamaktadır. Bu proteinler S5A, ASF (antisecretory factor) ve angiosidindir. Bu proteinlerin analizleri yapıldığında S5A ve ASF'nin aynı dizilere sahip olduğu, angiosidinin ise karboksil ucundaki 3 ek amino asit ile diğerlerinden farklılık gösterdiği bulunmuştur [25].

S5A ve ASF aynı protein dizisine sahip olmasına rağmen ilginç bir şekilde farklı işlevler gösterdiği bildirilmektedir. S5A, proteinleri yıkım için hedefleyen sinyal olan poliubikitini bağlayan 26S proteazom kompleksinin alt birimidir [26]. ASF ise sıçanlarda kolera toksini ile uyarılan bağırsaktaki sıvı salgılanmasını engellemektedir [27].

Angiosidin, karboksil ucunda ek üç amino asit (G₂₅₅ER₂₅₇) içermesinden dolayı S5A ve ASF proteinlerinden farklılık gösterir. Angiosidin (ya da CSVTCG özgül reseptör) başlangıçta akciğer kanserinde thrombospondin-1'e (TSP-1) bağlanan protein olarak izole edilmiştir [28]. Daha sonraki çalışmalarda ise prostat kanseri cDNA kütüphanesinden klonlanarak bakterilere ifade ettirilmiştir. Angiosidin olarak adlandırılan bu rekombinant proteinin, anjiyogenez ve tümör büyümesinde etkili bir inhibitör olduğu gösterilmiştir [29]. Angiosidin, S5A ve ASF proteinleri, poliubikitinlenen proteinlerin S5A'ya bağlanmasına aracılık eden aynı polipeptit dizilerini paylaşır [26]. Ayrıca bu proteinler hücresel lokalizasyon ve işlevsel farklılıklarına rağmen ortak bağlanma etkileşimleri göstermektedir [25].

Sonuç olarak; PSMD4 gen ürünleri, benzer dizileri paylaşan ancak farklı işlevler gösteren bir grup (S5A, ASF ve angiosidin) proteini temsil etmektedir. Literatürde bu proteinlerin 26S proteazom aracılı protein yıkımı dahil çeşitli hücresel süreçlerdeki rollerini araştıran çalışmalar mevcuttur.

1.3.1 ASF

İnsan ASF (Antisekretuar faktör) proteini 41 kDa molekül kütlesine sahip asidik (pI 4,7) bir proteindir [30]. ASF proteini, hücrede birçok işleve sahiptir ve post-translasyonel değişikliklerin bir sonucu olarak farklı fonksiyonel formlarda mevcut olabilir [31]. ASF, kolera toksini tarafından indüklenen bağırsak sıvısı sekresyonunu inhibe eden düzenleyici bir protein olarak tanımlanmıştır [32]–[34]. Daha sonraki çalışmalarda ASF'nin etkili bir anti-inflamatuar ajan olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca immünohistokimyasal analizlerle ASF'nin MSS'in perivasküler alanında ifade edildiği bulunarak bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir [35], [36]. Son olarak ASF'nin 26S proteazom kompleksinde bir alt birim olduğu keşfedilmiştir. Bu nedenle S5A/Rpn10 olarak da bilinir [26], [37]. ASF, memelilerde çoğu dokuda ifade edilmektedir. Çekirdek ve sitoplazmada serbest ya da 26S proteazomla ilişkili bulunabilir [35], [38].

1.3.2 S5A

S5A proteini, 26S proteazomun 19S kompleksinin internal poliubikitin tanıma alt birimi olarak tanımlanmıştır. 26S proteazom aracılı protein yıkımında, hedef proteinlerdeki sinyal olan poliubikitine bağlandığı gösterilmiştir. [39]. S5A proteini ubiquitinlenmiş substratları proteazoma yönlendiren iki ubiquitin etkileşim motifi (UIM) içermektedir [21]. Bu motifler proteinin C-terminalindeki 211-230. ve 282-301. amino asitler arasında tanımlanmıştır. Ayrıca proteinin N- terminalinde bir VWA (von Willebrand factor A) domaini bulunmaktadır [26].

Hücrelerde serbest formdaki S5A ile 26S proteazomla ilişkili S5A, ubiquitinlenmiş substratları bağlamak için birbiriyle rekabet edebilir. Serbest formdaki S5A substratların 26S proteazoma alınmasına engel olarak ubiquitinlenmiş proteinlerin birikmesine ve belirli proteinlerde stabilite artışına neden olabilir. Elangovan vd. [40] tarafından yapılan bir çalışmada HEK-293 hücrelerinde tam uzunluktaki S5A'nın ve S5AN (N terminal 1-195), S5AC (C terminal 196-377) parçalarının ektopik over ekspresyonu yapılarak hücrelerdeki ubiquitin-konjugatlarının birikimi belirlenmiştir. En yüksek Ub-konjugat birikiminin S5AC

over ekspresyonu yapılan grupta olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada A549 akciğer kanser hücrelerinde yapılan S5A over ekspresyonu, hücrelerin ölümünü indüklemiştir. Sağlıklı hücrelerde (BEAS-2B) ise benzer etki görülmemiştir. Elangovan vd. [41] yaptığı başka bir çalışmada S5A'nın ubiquitin etkileşim motifleri tarafından stabilize edilen proteazomal substratlar belirlenmiştir. Çalışmada serbest S5A-UIM'lerin p53, c-Fos, c-Jun ve p27 dahil olmak üzere yalnızca bir grup proteazomal substrat alt kümesini stabilize ettiği, b-katenin, p15 ve ornitin dekarboksilazı ise stabilize etmediği gösterilmiştir.

Piterman vd. [42] tarafından yapılan çalışmada S5A VWA domainini, ubiquitin ve ubiquitin benzeri substratların 26S proteazoma bağlanmasında sınırlayıcı bir bölge olarak tanımlanmıştır. Ayrıca memelilerde S5A'nın proteazoma bağlı ve serbest durumda bulunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada S5A'nın poliubiquitin ve ubiquitin benzeri (Ubl) proteinleri proteazomal yıkıma yönlendirmek için gerekli olmakla birlikte ubiquitin ve Ubl bağlanmaların yalnızca proteazomun kendisinde gerçekleştiği gösterilmiştir.

Hasskarl vd. [43] tarafından yapılan bir çalışmada ID1 (DNA-bağlayıcı inhibitör) proteininin S5A aracılığıyla sentrozomal anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada S5A'nın kısmı susturulmasının fazladan sentrozomlu hücrelerin artmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

Sparks vd. [44] tarafından yapılan bir çalışmada S5A'nın ubiquitinlenen p53'ün proteazom tarafından tanınıp yıkılmasına aracılık ettiği gösterilmiştir. S5A'nın susturulmasının p53 yıkımını önleyerek ubiquitinlenen P53 birikimine neden olmuştur. Çalışmada ayrıca S5A susturmasının hücre proliferasyonunda p53'e bağlı bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Mdm2'nin proteazomal yıkımında S5A'dan farklı bir yolun aracılık ettiği tespit edilmiştir. 2022 yılında Sparks vd. [45] tarafından yapılan başka bir çalışmada Mdm2 yıkımında S5A ve diğer ubiquitin reseptörlerinin (RAD23A, RAD23B ve ADRM1/PSMD16/hRpn13) işlevsel olarak örtüştüğünü tespit edilmiştir. Ubiquitin reseptör çeşitliliği S5A aracılı yıkımı daha duyarlı hale getirmiştir.

Wang vd. [46] tarafından yapılan bir çalışmada apoptotik THP-1 (insan akut monosit lösemi) hücrelerinden endojen S5A salgıladığını ve S5A'nın DR6'ya (ölüm reseptörü-6 olarak bilinir) bağlanarak THF-1 hücre farklılaşmasını uyardığı tespit edilmiştir. Aynı

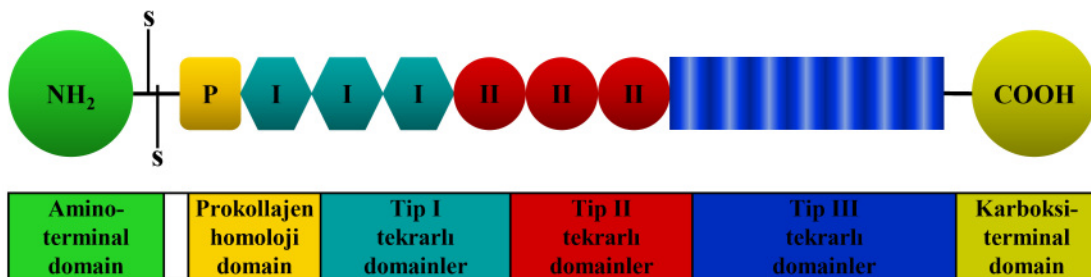
çalışmada S5A'nın bu farklılaşmayı NF-k β yolağının aktivasyonunun aracılık ettiği bir mekanizma yoluyla uyardığı bildirilmiştir.

Gus vd. [47] tarafından yapılan bir çalışmada S5A'nın geni olan PSMD4'ün -1200/+384 promotor bölgesi klonlanmış ve PSMD4 genine bağlanan transkripsiyon faktörleri incelenmiştir. Promotor bölgesinde Tcf / Lef-1 transkripsiyon faktörü için bir bağlanma bölgesi (-250/-234) olduğu bulunmuştur. Promotorle ilişkili diğer faktörlerin ise; p53 (-440/-420) ve Hif-1 α (-71/-51) olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada PSMD4 geninin apoptoz sırasında transkripsiyon seviyesinde düzenlendiğini ve anti-apoptotik sinyaller tarafından PSMD4 up-regülasyonunun hücrenin hayatta kalmasına katkı sağlayabileceği gösterilmiştir.

Son olarak Aydoğan Türkoğlu vd. [48] tarafından yapılan ekibimize ait bir çalışmada, PSMD4 genine ait 150 bç, 326 bç ve 682 bç promotor parçaları klonlanarak PC3 hücrelerinde hipoksik şartlardaki transkripsiyonel aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada PC3 hücrelerinde hipoksik koşulların PSMD4 gen ekspresyonunu ve promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesini uyardığı tespit edilmiştir. Ayrıca EMSA analiziyle HIF-la transkripsiyon faktörünün, PSMD4 promotörünün 98/+52 bölgesi içinde bulunan hipoksiya yanıt elementine (HRE) bağlandığı gösterilmiştir.

1.3.3 Angiosidin

Thrombospondin-1 (TSP-1) 450 kDa molekül ağırlığında sahip bir glikoproteindir. TSP-1 hücre adezyonu, hücre göçü ve anjiyogenez dahil birçok hücrenel süreçte görev almaktadır [49]. TSP-1'in her monomeri benzer amino asit dizilerinin tekrarını içeren üç polipeptid zincirden oluşur (bk. Şekil 1.6). Bu benzer amino asit dizilimlerini içeren domainler TSP-1'in dahil olduğu pek çok hücrenel süreç için spesifik reseptörlerdir [50].



Şekil 1.6: TSP-1'in tek bir alt biriminin multimodüler yapısının şematik gösterimi [51].

TSP-1'in sahip olduğu tekrarlı domainlerin hangi hücrel süreçte işlev gösterdiği merak edildiğinden araştırmalar bu noktaya yönelmiştir. 1993 yılında Tuszynski vd. [28] tarafından yapılan bir araştırmada, TSP-1'in tip I tekrarlı domainindeki CSVTCG (cys-ser-val-thr-cys-gly) dizisinin bir tümör adezyon domaini olduğu ve CSVTCG peptidleri ile birlikte bir anti-peptid antikorun akciğer metastazında anti-metastatik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca TSP-1'in tip I tekrarlı domainine bağlanan protein CSVTCG-peptid affinite kromatografisi ile izole edilmiştir. 2004 yılında Tuszynski vd. [29] prostat kanseri cDNA kütüphanesinden bu proteini izole edilerek saflaştırılmış ve bu rekombinat proteine angiosidin (angiocidin) adı verilmiştir.

Angiosidin protein dizisi karboksil ucunda ek üç amino asit (G₂₅₅ER₂₅₇) hariç S5A ve ASF protein dizisine benzerdir. S5A sitoplazmik bir protein iken ASF salgılanan bir proteindir. Angiosidin ise hem salgılanan hem de hücre içi bir proteindir [27], [29]. Angiosidin akciğer, prostat, mesene, pankreas, karaciğer, melanoma ve yumurtalık tümörleri gibi çeşitli insan tümörlerinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir [29].

1.4 PSMD4 Geni ve Kanseri İlişkisi

PSMD4 geni, ubiquitinlenen proteinlerin 26S proteazom aracılı yıkımında ubiquitin reseptörü olarak hizmet ederek pek çok hücrel süreçte görev almaktadır. Olağan süreçlerin dışında PSMD4 geninin tümör gelişimde onkojenik rolü olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [52].

PSMD4 geni, izoform 1 (380 amino asit) ve izoform 2 (377 amino asit) olarak ifade edilen iki farklı protein kodlamaktadır. Literatüre uygun olacak şekilde bu tez çalışmasında izoform, angiosidin olarak ifade edilmiştir. Rpn10, S5A, ASF gibi isimlerle anılan izoform 2 proteini ise kısaca PSMD4 olarak ifade edilmiştir. PSMD4 geninin kanserle ilişkisini ortaya koyan çalışmaları, angiosidin ve PSMD4 proteinin farklılığını yansıtacak şekilde, iki başlık altında toplamak mümkündür.

1.4.1 Angiosidin-Kanseri İlişkisi

Angiosidin ilk kez prostat kanseri cDNA kütüphanesinden klonlanıp, rekombinant olarak elde edildiği Tuszynski vd. çalışmasında [29]; angiosidin, in vivo Lewis akciğer kanseri tümör büyümesinin in vitro tümör invazyonu ve anjiyogenezin etkili bir inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca angiosidin tümör ve endotelial hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği apoptozu ise indüklediği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, angiosidin TSP-1'e

bağlanma aktivitesine bağlı olarak bu etkileri gösterdiğini belirtmiştir. Ancak TSP-1'in bağlanma bölgesi mutasyona uğratıldığında angiosidinin etkisi tamamen ortadan kalkmamıştır. Bu yüzden araştırmacılar, angiosidinin apoptotik aktivitesinin S5A (PSMD4) ile gösterdiği dizi benzerliğine dayanarak poliubikitin bağlama aktivitesiyle ilişkili olabileceğini düşünmüştür. Aynı grubun bu ilişkiyi test ettiği bir çalışmada [25] angiosidinin, poliubikite yüksek afinite ile bağlandığı ancak muhtemel poliubikitin bağlama bölgeleri mutasyona uğratılmış üç rekombinant proteinin, poliubikite bağlanmadığı bulunmuştur. Ayrıca rekombinant proteinlerin apoptotik etkisinde poliubikitin bağlama yeteneğine bağlı olarak azalma tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak angiosidinin apoptotik aktivitesinin poliubikite bağlama aktivitesiyle ilişkili olduğunu belirtilmiştir.

Tuszynski vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada [53] angiosidinin, anti-tümör aktivitesinin endotelial ve tümör hücreleri üzerindeki tip I kollajen ve $\alpha 2\beta 1$ integrine bağlanma yeteneğine kaynaklandığını ileri sürmüştür. Aynı grubun yaptığı başka bir çalışmanın verileri ise oldukça ilginçtir. HUVEC hücrelerinde siRNA kullanarak angiosidinin susturulduğu çalışmada [54] hücrelerin tüp oluşumunda, adhezyonunda ve invazyonunda azalma gözlenmiştir. Aynı grubun 2004 yılında yaptığı çalışmanın [29] verileri göz önüne alındığında bu sonuç şaşırtıcı bulunmuştur. Araştırmacılar, angiosidinin salgılanan bir endojen anjiyogenez inhibitörü olarak işlev görebileceğini ancak susturulmasının daha az anjiyogenik bir fenotiple sonuçlandığını önermiştir. Ayrıca aynı çalışmada angiosidin ekspresyonunun azalması, endotelial hücrelerin anjiyogenik ve invazyon yeteneğine aracılık eden bir enzim olan matriks metalloproteinaz-2'nin (MMP-2) ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Sabherwal vd. [55] tarafından 33 karaciğer kanseri hastasının ve 27 sağlıklı gönüllünün serumundaki angiosidin seviyesinin ELISA testi ile ölçüldüğü bir çalışma yapılmıştır. Araştırmacılar, karaciğer kanser ilerlemesinde angiosidinin rol aldığını ve angiosidinin karaciğer kanserinde bir tümör belirteci olabileceğini göstermiştir. Ayrıca hastaların serumlarındaki angiosidin seviyesinin kanserin metastatik durumu ve gelişme evresi ile ilişkili olduğunu tespit edilmiştir.

Liebig vd. [56] tarafından yapılan bir çalışmada angiosidinin insan kolon kanseri modelinde aşırı ifade olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada angiosidini hedef alan iki

inhibitör peptidin primer tümör hacmini ve tümör yükünü etkili bir şekilde azalttığı bulunmuştur. Aynı grubun yaptığı başka bir araştırmada düşük ve yüksek dereceli sarkoma modellerinde angiosidin, TSP-1 ve jelatinaz ekspresyonu incelenmiştir. Çalışmada tümörün derecesi ile bu üç molekülün ekspresyonu arasında korelasyon bulunmuştur. Ayrıca angiosidinin sarkomlarda jelatinaz up-regülasyonunu ve tümör hücresi invazyonunu uyardığı bulunmuştur. Son olarak angiosidin inhibitör peptidlerinin in vitro sarkom hücre invazyonunun etkili inhibitörleri olduğu tespit edilmiştir [57].

Angiosidinin antitümör aktivitesine katkı sağlayabilecek başka bir çalışmada, angiosidinin monositleri proinflamatuvar sitokinlerin bir karışımını salgılaması için aktive ettiğini ve onların makrofaj benzeri hücelere farklılaşmasını indüklediğini göstermiştir. Ayrıca, angiosidinin bu proinflamatuvar aktivitesinin nükleer faktör- κ B (NF- κ B), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) aktivasyonunu içeren bir yolla gerçekleştiği gösterilmiştir [58].

Merkezi sinir sisteminin otoimmün bir hastalığı olan multipl sklerozda (MS), angiosidin ifadesi ve potansiyel işlevi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda MS hastalarının beyin lezyonlarında angiosidin ve interlökin-7'nin (IL-7) aşırı ifade olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca angiosidin uygulanan monositler, periferel kan T hücreleri ve primer astrositler çeşitli sitokinleri ve IL-6, IL-7, GM-CSF ve MCP-1'i içeren kemokinleri salgılamıştır. Hücre kültürüne rekombinant angiosidin ilave edilmesi monositlerin makrofaj benzeri hücelere farklılaşmasını yönlendirmiş ayrıca MCH sınıf I ve sınıf II gen ifadesini ve CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerin aktive olmasını uyarmıştır. Aynı çalışmada angiosidin ile uyarılan tek çekirdekli fagositlerde, T hücrelerinde ve birincil astrositlerde STAT3 ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir [59].

L'Heureux vd. [60] tarafından yapılan çalışmada angiosidinin ile doku transglutaminaz -2 (tTgaz) arasındaki etkileşim incelenmiştir. Angiosidinin tTgaz'ye doygun bir şekilde bağlandığını ancak angiosidinin matriks bağlanma domaininde yapılan bir delesyonunun bu bağlanmayı başarısız hale getirdiği göstermiştir. Ayrıca angiosidin tTgaz ile muamele edildiğinde yüksek molekül ağırlıklı çapraz bağlı multimerler oluşmuş ve bu çapraz bağlı angiosidin hücre göçünü inhibe etmiştir.

Godek vd. [61] tarafından yapılan çalışmada angiosidinın tümör hücre proliferasyonu üzerinde doğrudan inhibitör etkisinin olduğunu gösterilmiştir. Meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde angiosidin ve epidermal büyüme faktörü (EGF) varlığında çoğalmada inhibisyon gözlenmiştir. Ayrıca meme kanseri hücrelerinin angiosidin ile muamele edilmesi, nükleer faktör- κ B'nin (NF- κ B) aktivasyonuna ve NF- κ B yoluyla pek çok downstream genin *de novo* up-regulasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, angiosidinın sadece tümör anjiyogenezini inhibe eden bir peptid değil aynı zamanda doğrudan tümör büyümesi sürecini inhibisyonunu, NF- κ B aracılı transkribe edilmiş downstream genler ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) aktivasyonu yoluyla, aktive ettiği sonucuna ulaşmıştır.

Son olarak Guan vd. [62] tarafından angiosidinın karaciğer kanserindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada iki tip karaciğer kanser hücresinde (HepG2 ve SMMC-7221) yüksek seviyede angiosidin ifadesi olduğu tespit edilmiştir. HepG2 hücrelerinde angiosidin ifadesi siRNA'lar tarafından belirgin bir şekilde azaltıldığında kontrol hücrelerine kıyasla bu hücrede çok yavaş proliferasyon aktivitesi göstermiştir. SMMC-7221 karaciğer kanseri hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

1.4.2 PSMD4-Kanser İlişkisi

Literatürde son yıllarda PSMD4'ün tümör gelişimindeki rolünü ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Li vd. [63] tarafından yapılan bir çalışmada PSMD4'ün yumurtalık kanserindeki (EOC) karboplatin direnci düzenleyici ağdaki çekirdek molekül olduğu ve EOC karboplatine dirençli doku ve hücrelerde ifadesinin up-regüle olduğu bulunmuştur. Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla PSMD4'ün down-regüle edilmiş ekspresyonu yumurtalık kanserinde karboplatine duyarlılığındaki artışla yakından ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

Huang vd. [64] tarafından yapılan bir çalışmada PSMD4'ün böbrek kanserindeki rolü araştırılmıştır. Berrak hücreli-renal hücreli karsinomda (ccRCC) PSMD4 over ekspresyonu hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını arttırmıştır. PSMD4 ekspresyonunun susturulması ise ccRCC hücrelerinde hücre çoğalmasının, göçünün ve istilasının azalmasına neden olmuştur. Ayrıca PSMD4'ün ccRCC'de NF- κ B yolunu düzenleyerek hücre çoğalmasını ve göçünü desteklediği tespit edilmiştir.

Cai vd. [65] tarafından yapılan bir çalışmada, hepatoselüler karsinom (HCC) doku ve hücrelerinde PSMD4'ün aşırı ifade olduğu, PSMD4 susturulmasının hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini önemli ölçüde baskıladığı ve hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca HCC hücre hatlarında (HepG2 ve SK Hep1) PSMD4 susturulmasının proteazom aktivitesini ve COX2, p-SRC ve Bcl-2'nin ekspresyonunu bastırdığı ancak p53 ve Bax'ın protein seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar akciğer kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri ve endometriyal kanseri hücre hatlarında da görülmüştür. HCC'de yapılan başka bir çalışmada PSMD4'ün up-regülasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. HCC hücrelerinde, PSMD4'ün ektojik over ekspresyonu hücre proliferasyonunu arttırırken PSMD4 susturulması ise hücre proliferasyonunu azaltmıştır. Ayrıca PSMD4'ün PTEN/Akt yollarının düzenlenmesi yoluyla hücre proliferasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir [66].

PSMD4'ün tümör gelişiminde onkojenik bir rolü olduğunu gösteren bir çalışmada, özofagus karsinomu dokularında PSMD4 ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. PSMD4 susturulmasının ise hücre canlılığını azalttığı, apoptozu ve hücre döngüsünü durdurduğu belirlenmiştir. Ayrıca PSMD4'ün up-regülasyonu endoplazmik retikulum stresi kaynaklı hücre apoptozunu azaltarak özofagus kanserinin ilerlemesini desteklediği tespit edilmiştir [52]. Başka bir çalışmada ise PSMD4'ün insan kolon kanseri örneklerinde aşırı ifade edildiği bulunmuştur [67].

Meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada PSMD4'ün aşırı ifade edildiği ve bu aşırı ifadenin düşük hayatta kalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca PSMD4 susturulmasının hücre büyümesinde önemli bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [68]. Başka bir çalışmada kolon kanseri hücrelerindeki artan cNrf2 (nükleer faktör benzeri-2) ekspresyonunun PSMD4'ü up-regüle ederek kolorektal kanserinde daha agresif tümörlere teşvik ettiği bildirilmiştir [69].

1.5 Pankreas Kanseri

Pankreas; ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan, retroperitoneal yerleşimli, mide, duodenum ve karaciğerle yakın komşuluğu olan karma bir bezdir. Pankreas bir baş, gövde ve kuyruk kısmından oluşmaktadır. Baş, pankreasın duodenum eğrisine yakın genişlemiş kısımdır; başın üstünde ve solunda merkezi gövde ve sivri bir kuyruk bulunmaktadır [70]. Pankreas glandüler epitel hücrelerinin küçük kümelerinden oluşur. Asini adı verilen

hücre kümeleri ve bunlara bağlı kanallar organın yaklaşık %99'unu kaplayan ekzokrin kısmını oluşturur. Ekzokrin pankreas, sindirim enzimleri, su ve iyon içeren alkali özellikteki pankreas özsuyu üretir ve duodenuma salgılar. Pankreasın endokrin kısmını ekzokrin hücreler arasına dağılmış pankreas adacıkları (Langerhans adacıkları) adı verilen hücre kümeleri oluşturur. Endokrin pankreas organın yaklaşık %1'ini oluşturur ve yaklaşık 2 milyon pankreas adacığı içerir. Pankreas adacıklarındaki çeşitli hücrelerden glukagon (α hücreleri), insülin (β hücreleri), somatostatin (δ hücreleri) ve pankreatik polipeptit (F hücreleri) hormonları üretilip kana salgılanır [70], [71]. Pankreas hastalıklarının başlıcaları arasında akut ve kronik pankreatit, diyabet (diabetes mellitus) ve pankreas kanseri yer almaktadır [72].

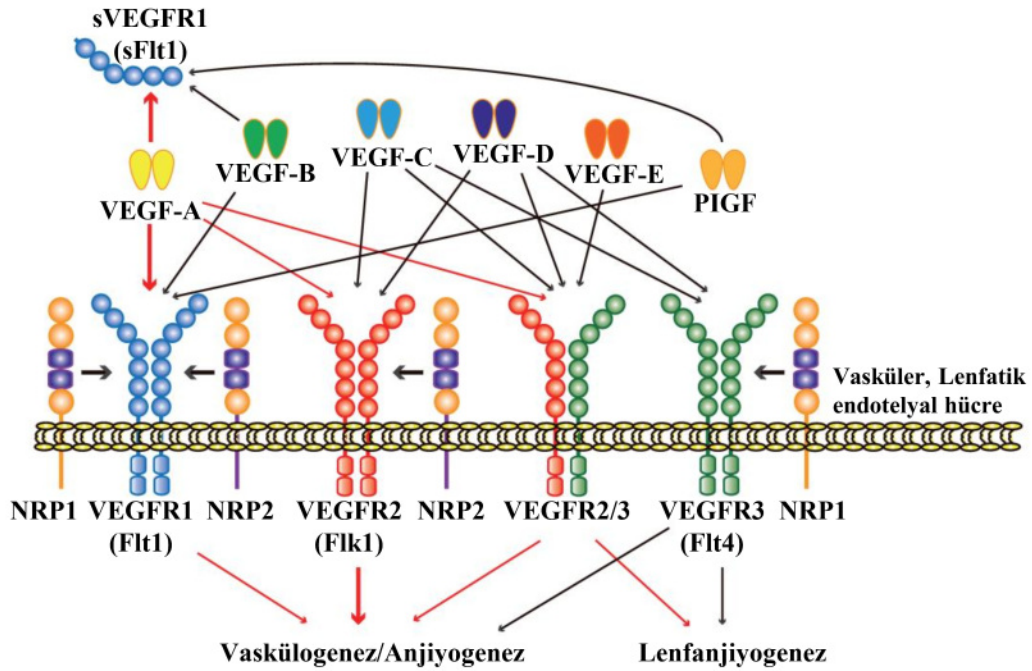
Pankreas kanseri, dünyada yaygın yaygın kanser çeşitleri arasında 12. sırada ve kansere bağlı mortalite sıralamasında 7. sırada yer almaktadır [73]. Pankreas kanserinin tespiti ve tedavisindeki gelişmelere rağmen 5 yıllık sağ kalım oranı hala %9'dur [74]. Pankreas kanseri, kötü prognozu nedeniyle neredeyse vaka sayısı kadar (496.000) ölümden (466.000) sorumludur ve her iki cinsiyette de kansere bağlı ölümlerin yedinci önde gelen nedenidir (bk. EK İ). İnsani gelişme endeksi (HDI) oranı yüksek olan ülkelerde 4 ila 5 kat daha yüksek görülmektedir. En yüksek insidans oranları; Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya/Yeni Zelanda'dadır [75]. 28 Avrupa ülkesinde yapılan bir çalışmaya göre pankreas kanserinin 2025 yılına kadar kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedeni olan, meme kanserini geçeceği öngörülmektedir [76]. Ayrıca başka bir çalışmada, 2030 yılında ABD'de kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir [77].

Pankreas kanseri tümörleri iki ana gruba ayrılmaktadır. En yaygın olanı (%85-90'ı) ekzokrin pankreastan kaynaklanan pankreas adenokarsinomu ve daha az yaygın olanı (%5'ten az) endokrin pankreastan oluşan pankreas nöroendokrin tümörüdür (PanNET) [78]

Pankreas kanseri olarak nitelendirilen kanser türü aslında hızlı yayılan, çevre dokulara ve uzak organlara metastaz yapabilen infiltrate pankreas duktal adenokarsinomudur. Bu duktal adenokarsinom, tipik olarak yoğun bir desmoplastik stromal reaksiyonla çevrili glandüler neoplastik epitel hücreleri ile karakterize edilmektedir [79], [80]. Pankreas kanserinin %65-70'i pankreas başında, %15'i gövdesinde ve %15'i ise pankreasın kuyruk kısmında yer almaktadır [81].

1.6 VEGF Ailesi ve Reseptörleri

Vaskülogenez ve anjiyogenez süreçleri gelişimsel ve fizyolojik olaylarda homeostazi sürdürmede kritik öneme sahiptir [82]. Yeni kan damarlarının oluşumu normal koşullarda (yara iyileşmesi, organ rejenerasyonu, menstrual döngü, gebelik sırasında) meydana gelir. Ancak çeşitli patolojik süreçlerde (tümör gelişimi, romatoid artrit, diyabetik retinopati gibi) ayrıca görülen önemli bir faktördür. Anjiyogenez, kan damarı büyümesi için uyarıcı (proanjiyogenik) ve inhibe edici (antianjiyogenik) sinyaller arasındaki fizyolojik denge tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir [83]. Anjiyogenez ve vaskülogenez ağırlıklı olarak birkaç farklı büyüme faktörü (VEGF, TGF- β , FGF-2 vb.) ve bunlarla ilişkili tirozin kinaz reseptörleri tarafından düzenlenir [84]. Bu süreçlerin ana düzenleyicileri vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF'ler) ve reseptörleridir. Organogenez ve doğum sonrası fizyolojik ve patolojik anjiyogenez sırasında ana anjiyogenik molekül olan VEGF, endotel hücre proliferasyonunun, filizlenmesinin, göçünün ve tüp oluşumunun en güçlü uyarıcısıdır. Ayrıca endotel hücreleri için etkili bir hayatta kalma ve geçirgenlik faktörüdür [85].



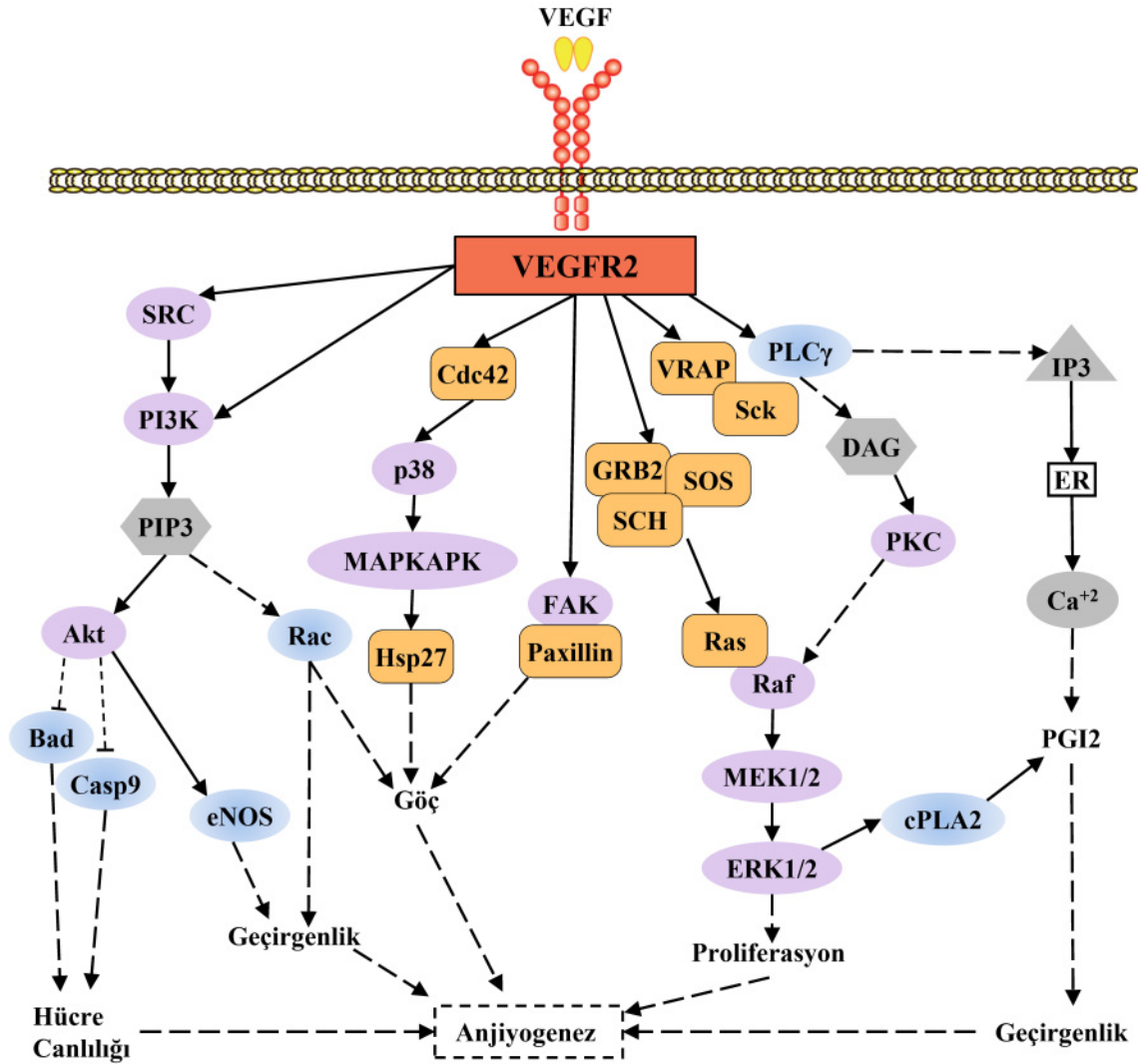
Şekil 1.7: VEGF ailesi üyeleri ve reseptörleri [86].

Memelilerde VEGF ailesi, üç tirozin kinaz reseptörü (VEGFR1, 2 ve 3) için farklı bağlanma afinitelerine sahip beş salgılanan proteinden [VEGF-A (kısaca VEGF), VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PlGF)] oluşur [87]. VEGF ailesi

ilişkili diğer protein çeşitleri VEGF-E (parapox virüs kaynaklı) ve VEGF-F (yılan zehri kaynaklı) olarak bilinir [84], [88]. VEGF ailesinin üyeleri, VEGFR'ler için ko-reseptör olarak işlev gösteren tirozin kinaz olmayan reseptörlere de (NRP1 ve NRP2) bağlanabilir [89]. Yetişkin dokularında VEGFR1 (Fms-benzeri tirozin kinaz 1; Flt1) ve VEGFR2 (kinaz domaini içeren; KDR ya da fetal karaciğer kinaz 1; Flk1) en güçlü şekilde ifade edilir ve vasküler endotelial hücrelerde çok önemli rol oynar [86]. VEGFR3'ün (Fms-benzeri tirozin kinaz 4; Flt4) başlangıçta lenfatik endotelial hücrelere özgü kabul edilmiştir. Ancak daha sonraki çalışmalarda VEGFR3'ün vasküler endotelial hücrelerde yüksek düzeyde ifade edildiği ve anjiyogenezde rol aldığı gösterilmiştir [90], [91].

VEGF olarak da adlandırılan VEGF-A, normal ve anormal durumlardaki birçok anjiyogenik süreç için gerekli olan bir dimerik glikoproteindir [84]. Tüm VEGF aile üyeleri arasında en spesifik ve öne çıkan anjiyogenik faktördür [92]. İnsan VEGF-A geni, 6p23.1 kromozom lokasyonunda yer alır ve yedi intron ile sekiz ekzon bulundurur [93], [94]. VEGF-A geninden alternatif splaylar ile farklı uzunluktaki homodimerik izoformlar sentezlenir. Bu izoformlar VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A_{165b}, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ ve VEGF-A₂₀₆ olmak üzere dokuz tanedir [95]. Bu izoformlar içerdikleri amino asit sayısına, yapısına ve ECM'nin heparin ve heparan-sülfat proteoglikanlarına olan afinitelerine bağlı olarak farklı biyolojik özelliklere sahiptir [96], [97]. Her izoformun vasküler sistemin farklılaşmasında ve gelişiminde özel bir rolü vardır [84]. İnsanda VEGF-A izoformlarından en çok VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅ ve VEGF-A₁₈₉ ifade edilmektedir. Bunlardan VEGF-A₁₆₅ baskın izoformdur ve vaskülogenezde en aktif olanıdır [84], [98]. VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₆₂ ve VEGF-A_{165b} izoformları çok daha az yaygındır. Özellikle VEGF-A_{165b}'nin VEGF-A₁₆₅'i inhibe eden bir antianjiyogenik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [97]. VEGF-A, vasküler endotelial hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesine ve vasküler geçirgenliği artırma yeteneğine sahiptir [99]. Aynı zamanda endotel hücrelerinin hayatta kalmasını ve göçünü de destekler [84]. VEGF-A, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, menstrual döngü, kanser vb. fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki önemli rolü nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir [92], [100]. VEGF-B, geniş bir doku dağılımına sahiptir ancak yetişkin miyokardiyum, iskelet kası ve pankreasta bol miktarda ifade edilir [101]. Yetişkin dokularında VEGF-C en belirgin şekilde kalp, plasenta, yumurtalık, ince bağırsak ve tiroid bezinde ifade edilir [83]. Ayrıca lenfanjiyogenez için gerekli olan parakrin faktördür [84]. VEGF-D yetişkin dokularında, özellikle akciğer, kalp, iskelet kası, kolon ve ince bağırsakta bulunur [83], [102].

Sonuç olarak VEGF-A, anjiyogenez ile ilişkili endotel hücre fonksiyonları için gereklidir. VEGF sistemindeki en belirgin ligand-reseptör kompleksi olan VEGFA-VEGFR2 tarafından başlatılan sinyal iletim ağları, endotel hücre proliferasyonuna, göçüne, hayatta kalmasına, geçirgenliğine ve anjiyogenezi içeren yeni damar oluşumuna yol açar [103]. VEGFA-VEGFR2 sinyal iletim yolağı Şekil 1.8’de verilmiştir [104], [105].



Şekil 1.8: VEGFA-VEGFR2 sinyal iletim yolağının şematik gösterimi [106], [107].

1.7 Pankreas Kanseri ve VEGF ilişkisi

VEGF, önemli bir anjiyogenik büyüme faktörüdür ve ekspresyon seviyesi anjiyogenik hastalıkların tespiti için kritik bir belirteçtir. Anjiyogenezin artması veya azalması, yaşamın farklı evrelerindeki çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Bu nedenle anjiyogenezde artış görülen bazı hastalıklarda (kanserler, ateroskleroz, hemanjiom, retinopati gibi) yüksek düzeyde

VEGF ekspresyonu bulunmuştur. Anjiyogenezde azalış görülen bazı patolojik durumlarda ise (iskemik hastalık, koroner arter hastalığı ve periferik damar hastalığı gibi) düşük VEGF ekspresyonu görülür [92], [99]. VEGF çoğu tümörde ifade edilir ve ekspresyonu tümörün ilerlemesiyle ilişkilidir [108].

Literatürdeki çalışmalarda pankreas tümörlerinde VEGF protein ailesi ve reseptörlerinin önemi gösterilmiştir. Pankreas endokrin tümörü (PET), VEGF-C ile ilişkili intratümöral lenfanjiyogenezin gösterildiği ilk insan tümörüdür [109]. Müsinöz pankreatik kistler (intraduktal papiller müsinöz neoplazm ve müsinöz kistik neoplazm) invaziv pankreas adenokarsinomasına ilerleme potansiyeline sahiptir. Bu tip tümörlerde VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 ve VEGFR-3 aşırı ifade edilmektedir [99], [110].

VEGF, pankreas kanseri gelişiminde önemli bir rol oynar [111]. Normal pankreas ve kronik pankreatit ile karşılaştırıldığında, pankreas kanserinde VEGF ve reseptörleri aşırı ifade edilmektedir [112]. Seo vd. [113] tarafından yapılan bir çalışmada duktal pankreatik adenokarsinomların %93'ünün VEGF proteini için pozitif olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise pankreas kanseri dokularında %77 ve komşu normal pankreas dokularında %15 oranında pozitif bir VEGF ekspresyon oranı olduğu tespit edilmiştir [114]. VEGF aşırı ifadesi yüksek mikrovasküler yoğunlukla ilişkilidir ve pankreatik duktal adenokarsinomda hasta sağkalımı açısından olumsuz prognostik faktördür [115]. Ayrıca VEGF ekspresyonu, TNM evresi ve lenf nodu metastazı ile önemli ölçüde ilişkili olduğundan pankreas kanserinin oluşumunda, gelişmesinde ve metastazında önemli bir rol oynayabilir [114]. İn vitro şiddetli hipoksik şartlarda çoğu pankreas duktal karsinomu VEGF ile ilişkili belirgin bir anjiyogenik potansiyel gösterir [116]. 50 pankreas kanseri doku örneğinin immünohistokimyasal analizinin yapıldığı bir çalışmada örneklerin %50'sinde VEGF-A immünoaktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Bu hücrelerde VEGF-A'nın varlığı, daha büyük tümör boyutu ve artan lokal yayılım ile ilişkili bulunmuştur [117]. VEGF-A, pankreas kanseri hücrelerinin invazyonunu ve göçünü tetiklemede önemli bir rol oynayan hücre hareketliliğini önemli ölçüde arttırmaktadır [118].

Kanser örneklerinde normal pankreasa kıyasla VEGF-C mRNA seviyesinde yaklaşık 2,2 kat artış olmaktadır. İmmünohistokimyasal analizle tümör kitlesi içindeki hücrelerde VEGF-C ve reseptörünün (VEGFR-3) ekspresyonu doğrulanmıştır. Ayrıca pankreas kanserlerinin yaklaşık %80'inde VEGF-C ekspresyonu pozitif bulunmuştur [119], [120].

Başka bir çalışmada VEGF-C ekspresyonunun tümörün etrafındaki lenfatik damarların invazyonu ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [121]. Ayrıca insan pankreas kanseri ve fare modellerinde yapılan bir çalışmada lenfatik metastazdaki VEGF-C ekspresyonu primer tümörden daha yüksek bulunmuştur [122]. Sonuç olarak kanser hücrelerindeki VEGF-C varlığı artan lenf nodu metastazı ile ilişkili ancak hasta sağkalımının azalmasıyla ilişkili değildir [117], [119].

VEGF-D, insan duktal pankreas kanserinde lenfanjiyogenezi ve lenfatik metastazı uyarda önemli bir rol oynamaktadır [123]. Pankreas kanserlerinin %36'sında VEGF-D ekspresyonu pozitifdir [120]. Tümörün marjinal kısmındaki tümör hücrelerinde VEGF-D ekspresyonu pankreas kanserli hastalarda lenfatik metastaz ve prognoz ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur [124].

VEGF reseptörleri esas olarak endotel hücreleri tarafından ifade edilmektedir ancak aynı zamanda pankreas kanseri hücrelerinde de ifadeleri olmaktadır. Normal pankreas ve kronik pankreatit ile karşılaştırıldığında pankreas kanserinde VEGF reseptörlerinin aşırı ifadesi görülmüştür [112]. VEGF ve 3 ana reseptörü (VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3) pankreas tümörlerinde değişen derecelerde ifade edilmektedir. Tümörlerdeki aşırı VEGF ekspresyonu bir otokrin yol aracılığıyla VEGFR-1 taşıyan tümör hücrelerini aktive edebilir [125]. VEGFR-1, pankreas kanserinde EMT sürecini uyararak tümör ilerlemesinde rol oynar [126]. VEGFR-1'in pankreas karsinom hücre hatlarında ifade edildiği ve sinyalleşmeyi indükleyerek migrasyon ve invazyonu teşvik ettiği görülmüştür. Ancak düşük VEGFR-1 ekspresyonu ile hem kötü prognoz hem de ileri evre arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu durum tümördeki yüksek VEGFR-1 ekspresyonu daha az agresif bir hastalığın belirteci olduğunu düşündürmektedir [127]. Normal insan pankreasına kıyasla kanser dokusunda yüksek lenfatik vaskülarizasyonla bağlantılı olarak VEGFR-3'ün aşırı ekspresyonu görülmektedir [123]. Ancak pankreas kanserinde VEGFR-2 anjiyogenezi değerlendirmede en önemli reseptördür. VEGFR-2'nin pankreas kanserlerinin %69'unda pozitif bulunmuştur. Buna karşılık pankreas kanserlerinin %12'sinde VEGFR-1 ve %14'ünde ise VEGFR-3 ekspresyonu görülmüştür. Kanser hücrelerindeki VEGFR-2 ekspresyonu, pankreas kanserinin kötü prognozunu yanı sıra çevre dokulara invazyon ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur [120].

2. TEZİN AMACI VE KAPSAMI

Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), protein homeostazını düzenleyerek hücrel süreçlerin sağlıklı bir şekilde ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır. Bu sistemdeki 26S proteazomun ubikitin reseptörü olarak hizmet eden alt birimlerinden birini PSMD4 geni kodlamaktadır. UPS aracılı protein yıkımıyla hücre döngüsü, apoptoz ve onkogenez gibi pek çok süreç düzenlenmektedir. Literatürdeki çok sayıda çalışmada PSMD4 geni ile tümör gelişimi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

PSMD4 geninin iki farklı transkript varyantı bulunmaktadır. Varyant 2 (PSMD4) 377 amino asitlik izoform 2 proteinini, varyant 1 (angiosidin) ise 380 amino asitlik izoform 1 proteinini kodlamaktadır. Bu proteinlerin yüksek derecede benzerlik göstermesi ve ortak bağlanma etkileşimleri içermesi araştırmacıları, bu proteinler ve kanser arasındaki ilişkiyi incelemeye yönlendirmiştir.

Tez çalışmasında PSMD4 ve angiosidin genlerinin insan pankreas karsinomunda (PANC-1) ve sağlıklı hücre modeli olan insan göbek kordon damarı endotel hücrelerindeki (HUVEC) rolü incelenmiştir. Literatürde bu genlerle pankreas kanseri arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar dört basamak altında toplanabilir. Bu basamakları özetleyen akış diyagramı şekil 2.1 de gösterilmiştir.

Birinci basamakta PSMD4 ve angiosidin genlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde over ekspresyonu yapılarak moleküler ve hücrel düzeyde karakterizasyon yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

- pcDNA-3.3 TOPO vektöründeki insan PSMD4 geni pEGFP-C1 vektörüne klonlandı.
- PSMD4 geninden (varyant 2) yönlendirilmiş mutagenesis ile angiosidin geni (varyant 1) elde edildi ve bu mutant gen pEGFP-C1 vektörüne klonlandı.
- pEGFP-C1 vektörüne klonlanan PSMD4 ve angiosidin genleri PANC-1 ve HUVEC hücrelerine geçici transfeksiyonla aktarıldı.
- PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonu mRNA (real-time PCR ile) ve protein (Western blot ile) düzeyinde belirlendi.

- PSMD4 ve angiosidin genlerinin hücrelerdeki over ekspresyonu floresan (GFP) sinyalin flow sitometride ölçümüyle teyit edildi.
- Floresan (GFP) sinyali ile etiketli olan PSMD4 ve angiosidin proteinlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki lokalizasyonu tespit edildi.
- PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarındaki PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonunun hücrelerin canlılığına (MTT testi ile), göç etme yeteneğine (scratch testi ile) ve koloni oluşturma yeteneğine (koloni formasyon testi ile) etkisi araştırıldı.
- PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu yapılan hücrelerde EMT ve apoptoz süreçleriyle ilişkili bazı genlerin mRNA seviyesindeki değişiklikler real-time PCR ile tespit edildi.

İkinci basamakta PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 genlerinin susturulması yapılarak moleküler ve hücresel düzeyde karakterizasyon yapılmıştır. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

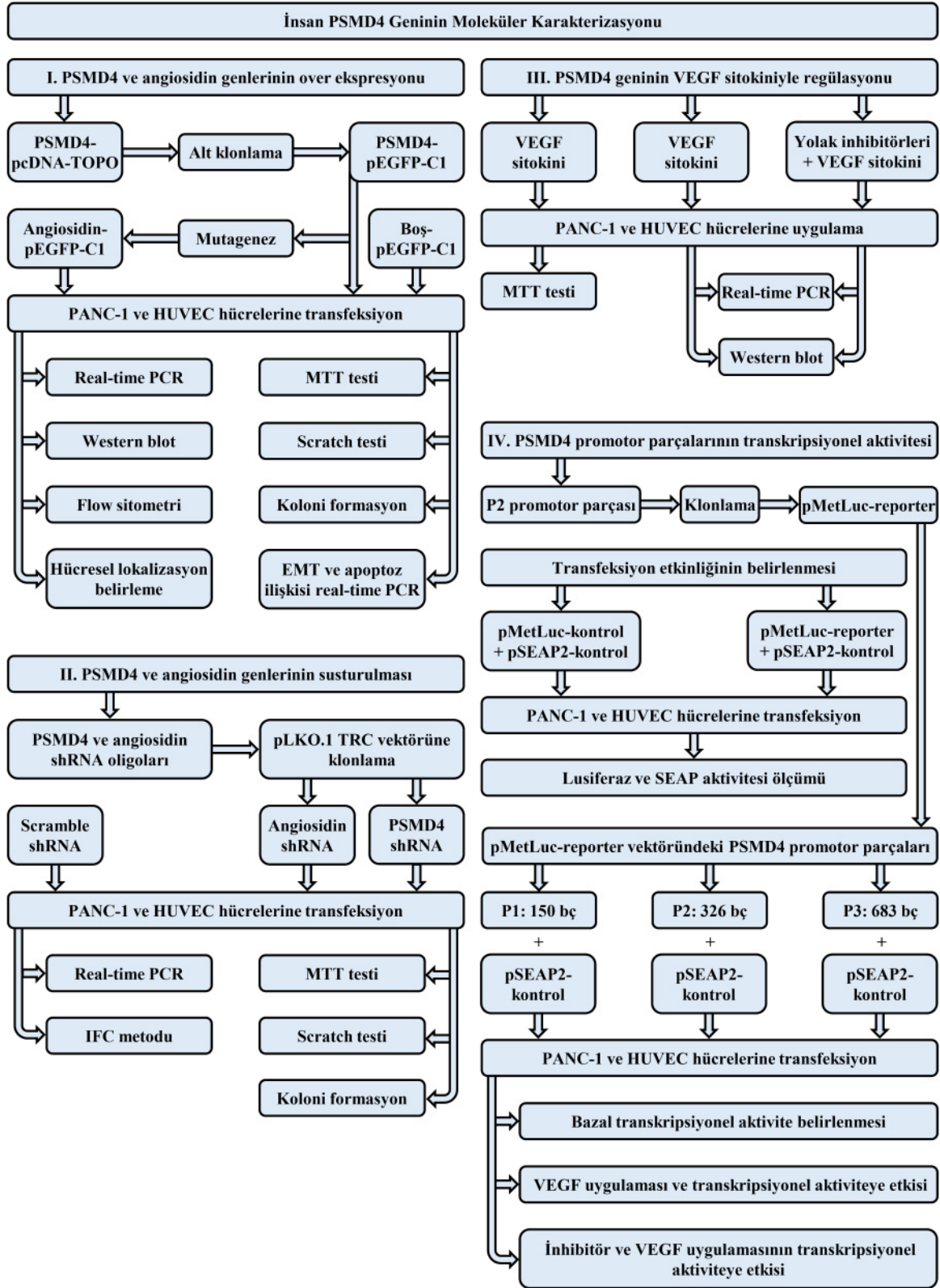
- PSMD4 ve angiosidin genlerini hedef alan shRNA oligoları pLKO.1 TRC vektörüne klonlandı.
- pLKO.1 TRC vektöründeki PSMD4 ve angiosidin shRNA oligoları PANC-1 ve HUVEC hücrelerine geçici transfeksiyonla aktarıldı.
- PSMD4 ve angiosidin genlerinin susturulması mRNA (real-time PCR ile) ve protein (immünofloresan deneyi ile) düzeyinde belirlendi.
- PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında PSMD4 gen susturulmasının hücrelerin canlılığına (MTT testi ile), göç etme yeteneğine (scratch testi ile) ve koloni oluşturma yeteneğine (koloni formasyon testi ile) etkisi araştırıldı.

Üçüncü basamakta VEGF-A₁₆₅ sitokininin PSMD4 gen regülasyonuna etkisi belirlendi. Bu amaca uygun olarak aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

- VEGF sitokininin PANC-1 ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi.
- PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde VEGF sitokini uygulamasının PSMD4 gen ekspresyonu seviyesine etkisi mRNA (real-time PCR ile) ve protein (Western blot ile) düzeyinde belirlendi.
- PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 gen regülasyonunda kullandığı yolları belirlemek amacıyla P38 MAP kinaz, JNK, MEK, PI3K yolak inhibitörleri ve VEGF sitokini uygulamasının ardından PSMD4 ekspresyon seviyesindeki değişimler mRNA düzeyinde ve protein düzeyinde tespit edildi.

Son basamakta ise PSMD4 geni promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi incelendi. Bu amaçla aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

- 326 bç'lik P2 (-274/+52) promotor parçası pMetLuc-reporter vektörüne klonlandı.
- PANC-1 ve HUVEC hücrelerine pMetLuc-kontrol ve pMetLuc-reporter vektörleri, pSEAP2-kontrol vektörüyle birlikte transfekte edildi. Salınan sistem lusiferaz ve SEAP ölçümleri yapılarak transfeksiyon etkinliği belirlendi.
- pMetLuc-reporter vektöründeki promotor parçaları (P1, P2 ve P3) pSEAP2-kontrol vektörüyle birlikte PANC-1 ve HUVEC hücrelerine geçici transfeksiyonla aktarıldı.
- PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktivitesi belirlendi.
- Promotor parçalarının PANC-1 ve HUVEC transfeksiyonundan sonra VEGF sitokini uygulanarak transkripsiyonel aktiviteye etkisi belirlendi.
- Promotor parçalarının PANC-1 ve HUVEC transfeksiyonundan sonra P38 MAP kinaz, JNK, MEK, PI3K yolak inhibitörleri ve VEGF sitokini uygulanarak transkripsiyonel aktiviteye etkisi tespit edildi.



Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılan basamakları özetleyen akış diyagramı.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Deneysel çalışmalar sırasında çeşitli cihazlar kullanılmıştır. Bu cihazların periyodik olarak bakım, temizlik ve kalibrasyonları yapılmıştır. Kullanılan cihazlara ait bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Markası
Laminar Air Flow	Telstar Bio II / İspanya
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuaire / ABD
Inverted Mikroskop, Floresan Mikroskobu	Nikon / Japonya
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo / ABD
Buzdolabı (+4 °C / -20°C), Mikrodalga Fırın	Arçelik / Türkiye
Buz Makinesi	Hoshizaki / Japonya
pH Metre	Hanna / ABD
Su Banyosu	Elektromag / Türkiye
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
Isıtıcı Blok	FALC/ İtalya
Vorteks, Isıtımlı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Hassas Terazı	Sartorius / Almanya
Otoklav	Hirayama / Japonya
Etüv	WTB / Almanya
Çalkalamalı İnkübatör (Isı Ayarlı)	GFL / Almanya
Soğutmalı Santrifüj	Sigma / Almanya
Mikro Santrifüj	Thermo / ABD
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Hanil Science
Döner Hareketli Çalkalayıcı	Thermo / ABD
Horizontal Çalkalayıcı	GFL / Almanya
Saf Su Cihazı	Human Corporation
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Görüntüleme Sistemi	UVP BioSpectrum
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
Elektrikli Pipet Pompası	IsoLab
DNA Elektroforez Sistemi	Minicell Primo
RNA Elektroforez Sistemi	Apelex / İngiltere
SDS PAGE Aparatları	BioRad
PCR Cihazı	Techne Progene / İngiltere
Real Time PCR Cihazı (Light-Cycler 480)	Roche Life Science
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Luminometre (Luminoskan™ Microplate)	Thermo / ABD
Spektrofotometre, µDrop™ Plate	Multiskango, Thermo
Flow Sitometri	Guava

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Deneysel sırasında kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji çalışmaları için uygun saflıkta temin edilmiştir. Bu kimyasallar güvenlik sertifikalarına uygun şekilde saklanmış ve kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan kimyasallara ve malzemelere ait bilgiler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların ve malzemelerin listesi.

Kimyasal / Malzeme Adı	Markası
▼ Bakteri Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
LB Agar Besiyeri	Pronadisa
LB Broth Besiyeri	Pronadisa
Ampisilin ve Kanamisin Antibiyotikleri	Sigma
Gliserol ve CaCl ₂	Sigma
Petri Kutuları (Steril)	IsoLab
50 mL ve 15 mL Falconlar (Steril)	IsoLab
GeneJET Plasmid Miniprep™ Kit	Thermo Scientific
Midi-NucleoBond® Xtra™ Kit	Macherey-Nagel
▼ DNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Taq DNA Polimeraz Enzimi (5 U/μL)	Thermo Scientific
10X Taq Tamponu (+KCl)	Thermo Scientific
dNTP Karışım (10 mM)	Thermo Scientific
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Scientific
Agaroz, Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
1 kb DNA Ladder, 6X Yükleme Boyası	Thermo Scientific
Tris Base, Borik Asit	Sigma
GeneJET Gel Extraction™ Kit	Thermo Scientific
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Thermo Scientific, NEB
T4 DNA Ligaz Enzimleri ve Tamponları	Thermo Scientific, NEB
▼ Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium)	Gibco, EuroClone
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
EDTA (Etilendiaminetetraasetik Asit)	Sigma
L-Glutamin, Tripsin	Sigma
PBS (Phosphate Buffered Salin)	VWR Life Science
Pastör Pipeti (3 mL, Steril)	IsoLab
Serolojik Pipetler (10 mL ve 25 mL, Steril)	Sarstedt
Flasklar (25 cm ² ve 75 cm ² , Steril)	Sarstedt
Steril Filtreler (0,22 μm ve 0,45 μm)	Sartorius
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
Ependorflar (1,5 mL’lik ve 2 mL’lik, Steril)	IsoLab
50 mL ve 15 mL Falconlar (Steril)	EuroClone

Tablo 3.2 (devam)

Kimyasal / Malzeme Adı	Markası
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
Penisilin-Streptomisin Solüsyon (100X)	Gibco
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon (100X)	Gibco
Hücre Kültürü Plaka (96, 24, 12, 6 Kuyucuklu)	Sarstedt
MTT	Sigma
HCl, İzopropanol	Sigma
Paraformaldehit	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma
Antifade Reagent	Prolong Invitrogen
Metanol, Kristal Viyole	Sigma
▼ Sitokin ve İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
VEGF-A ₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor)	PeptoTech
PD169316 (p38 MAP kinaz inhibitörü)	Sigma
SP600125 (JNK inhibitörü)	Santa Cruz
PD98059 (MEKI inhibitörü)	Cell Signaling
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	Cell Signaling
▼ Transfeksiyon Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
HEPES	Sigma
NaCl, Na ₂ HPO ₄ , CaCl ₂	Sigma
X-tremeGENE™ HP DNA Transfect. Reagent	Roche
TurboFect™ Transfection Reagent	Thermo Scientific
▼ Transkripsiyonel Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Ready-To-Glow™ Dual Sec. Reporter Ass.	Takara Clontech
Lusiferaz ve SEAP Substratları	Takara Clontech
384 Kuyucuklu Plaka	Corning
▼ RNA Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
DEPC (Dietil Pirokarbonat)	Sigma
GeneJET RNA Purification™ Kit	Thermo Scientific
MOPS (3-(N-morpholino) propansülfonik asit)	Merck
β-merkaptoetanol, Formaldehit	Merck
İnsülin Enjektörü (Steril)	Bd Micro-Fine
Etanol	Merck
NaAc (Sodyum Asetat), EDTA	Sigma
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma
Agaroz, Etidyum Bromür (Et-Br)	Sigma
Oligo(dT)	Thermo Scientific
dNTP Karışım	Thermo Scientific
RiboLock RNaz İnhibitörü	Thermo Scientific
RevertAid Reverse Transkriptaz Enzimi	Thermo Scientific
Reverse Transkriptaz Tamponu (5X)	Thermo Scientific
RealQ Plus 2X Master Mix Green	Ampliqon
96 Kuyucuklu Plaka (Beyaz) Light-Cycler 480	Roche Life Science
96 Kuyucuklu Plaka Jelatini	Thermo Scientific

Tablo 3.2 (devam)

Kimyasal / Malzeme Adı	Markası
▼ Protein Çalışmalarında Kullanılan Malzemeler	
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
Fosforik asit, Etanol, Metanol	Merck
Akrilamid/Bisakrilamid (37.5/1)	Sigma
APS (Amonyum Persülfat)	Merck
TEMED (Tetrametiletilendiamin)	Sigma
4X Laemli Örnek Tamponu	BioRad
β -merkaptetanol	Merck
Tris, EDTA, EGTA, SDS, Glisin, NaCl	Sigma
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo
PVDF Membranı	Millipore
Yağsız Süt Tozu	Santa Cruz
Tween®-20	Sigma
PSMD4 Mouse Monoklonal Antikor	Santa Cruz
β -aktin Mouse mAb	Cell Signaling
m-IgG κ BP-HRP (Sekonder Antikor)	Santa Cruz
Pierce™ ECL	Thermo Scientific

3.1.3 Transformasyon Çalışmalarında Kullanılan Bakteri Soyları

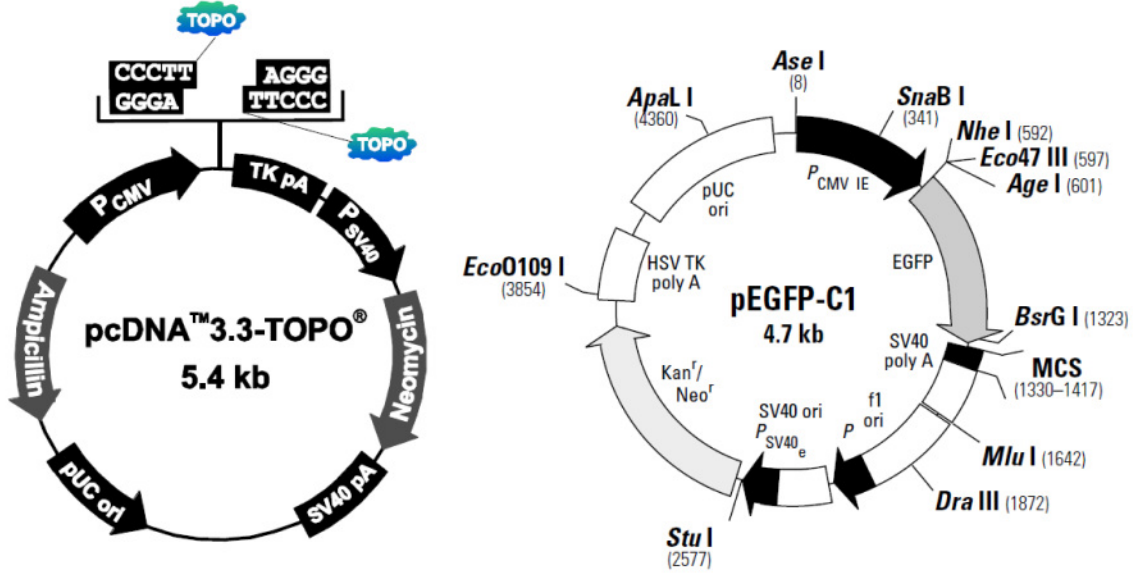
Klonlama çalışmalarındaki transformasyon ve sonrasında stokların oluşturulması amacıyla çeşitli *E. coli* soyu hücreler kullanıldı. Bu hücre soylarına ait bilgiler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3: Transformasyon aşamasında kullanılan bakteri soyları.

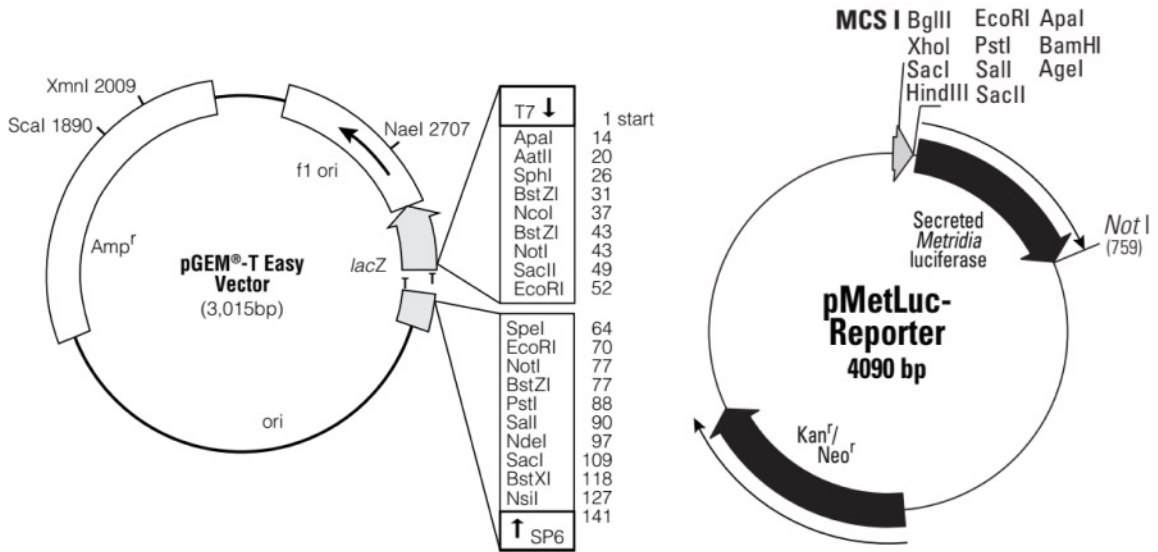
<i>E. coli</i> Soyu	Genotip
JM109	EndA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZ Δ M15].
DH5 α	SupE44 Δ (lacZYA-argF)U196 (Φ 80 Δ lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

3.1.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Vektörler

Klonlama ve mutasyon çalışmalarında pcDNA 3.3-TOPO™ (İnvitrogen) vektöründeki PSMD4 geni pEGFP-C1 (Clontech) vektörüne klonlandı (Şekil 3.1). Transkripsiyonel aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere promotor parçaları öncelikle T.A klonlamayla pGEM-T® Easy (Promega) vektörüne daha sonra ise pMETLuc-Reporter (Clontech) vektörüne klonlandı (Şekil 3.2).



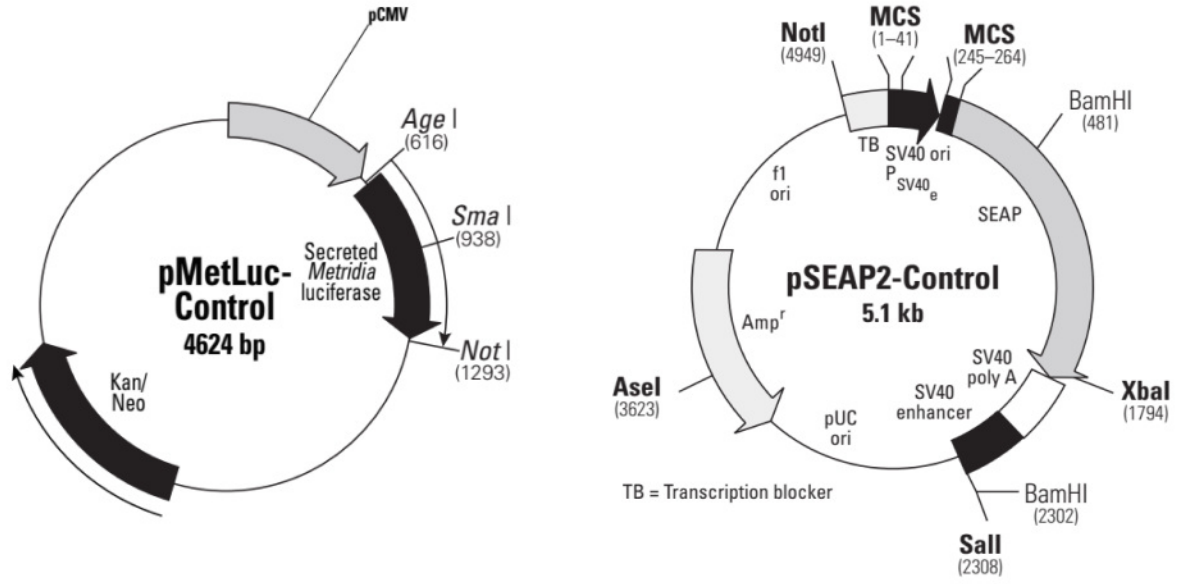
Şekil 3.1: pcDNA 3.3-TOPO ve pEGFP-C1 vektörlerinin şematik gösterimi.



Şekil 3.2: pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektörlerinin şematik gösterimi.

Transfeksiyonun etkinliğini belirlerken pozitif kontrol olarak pMETLuc-kontrol (Clontech) vektörü ve normalizasyon amaçlı pSEAP2-kontrol (Clontech) vektörü kullanılmıştır (Şekil 3.3). Ayrıca olası arka plan aktivitesini belirlemek için negatif kontrol olarak (boş) pMETLuc-reporter vektörü kullanıldı.

PSMD4 genini susturma çalışmalarında ise pLKO.1-TRC (Addgene) klonlama vektörü ve negatif kontrol olarak scramble shRNA (Addgene) vektörü kullanılmıştır (EK F).

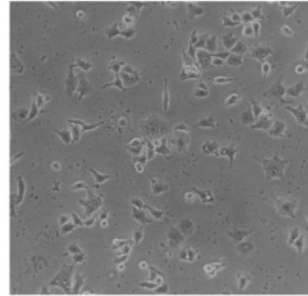


Şekil 3.3: pMETLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektörlerinin şematik gösterimi.

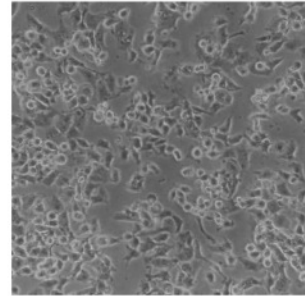
3.1.5 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmalarda kullanılan İnsan Pankreas Kanseri (PANC-1) hücre hattı, Prof. Dr. Kemal ERGİN'den (Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi), İnsan Göbek Kordon Damarı Endotelial Hücre (HUVEC) hattı, Bilkent Üniversitesi-UNAM'dan temin edilmiştir. Bu hücrelerin inverted mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 3.4'de gösterilmektedir.

a) PANC-1 (Human Pancreatic Carcinoma)

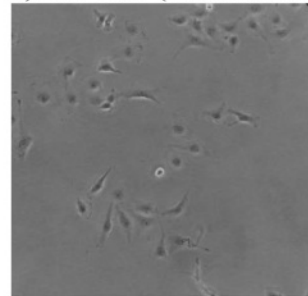


▲ Düşük yoğunluk (20X)

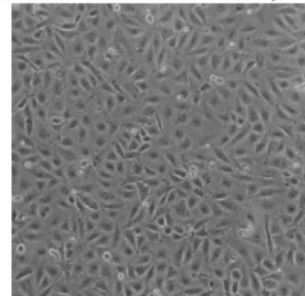


▲ Yüksek yoğunluk (20X)

b) HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)



▲ Düşük yoğunluk (20X)



▲ Yüksek yoğunluk (20X)

Şekil 3.4: Çalışmada kullanılan hücre hatları.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya karşı dayanıklı ependorf tüpler, pipet uçları, solüsyonlar ve diğer malzemeler otoklav cihazında 121 °C'de 20 dakika otoklavlanıp steril hale getirilmiştir. Otoklavlanmaya uygun olmayan çözeltiler ise 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Hücre kültürü laboratuvarı haftalık periyotlarla çamaşır suyu, %70'lik etil alkol ve virkon içeren dezenfektanla temizlendi. Çalışmaya başlanmadan önce odanın ve laminar flow kabinin UV lambası ~ 30-45 dk açılarak sterilizasyonu yapıldı. Laminar flow kabinine dışından alınan malzemeler %70'lik etil alkol ile silinerek alındı. Ayrıca RNA çalışmalarında hacimce %0,1 DEPC'li su kullanılarak ortam ve malzemelerdeki RNaz'ların inaktive olması sağlanmıştır.

3.2.2 Bakteri Çalışmaları ile İlgili Teknikler

3.2.2.1 Katı ve Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Katı besiyeri için LB (Luria Broth) agar kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği miktardaki LB agar dH₂O'da çözüldü ve 20 dk. boyunca 121 °C'de otoklavlanarak steril edildi. Yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra bek alevi yanında besiyerindeki son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde ampisilin veya 30 µg/mL olacak şekilde kanamisin ilave edilerek karıştırıldı. LB agar karışımı petri kaplarına döküldü ve polimerleşip katılaşması için beklendi. Son aşamada ise petrilerin etrafı parafilm ile sarılıp ters çevrildi ve +4 °C'de ışık almayacak şekilde muhafaza edildi.

Sıvı besiyeri olarak LB (Luria Broth) kullanıldı. Üretici firmanın 1 Litre için önerdiği miktardaki LB dH₂O'da çözüldü. Sterilizasyonu 20 dk. boyunca 121 °C'de otoklavlanarak yapıldı ve +4 °C'de muhafazası sağlandı. LB sıvı besiyerine son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde ampisilin veya 30 µg/mL olacak şekilde kanamisin ilave edildi.

3.2.2.2 Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetent yapılacak *E. coli* (JM109 veya DH5a soyu) hücreler -80 °C'deki gliserol stoğundan LB agar içeren petrilere tek koloni ekimi yapılarak bir gece (16 sa.) 37 °C'de inkübasyonu yapıldı. 20 mL LB sıvı besiyerine tek koloniden ekim yapılarak bir gece 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Hacminin en az üç katı steril erlene konulan 100 mL LB besiyerine bu ön kültürden 15 mL inoküle edilerek 37 °C'deki çalkalamalı etüvde

inkübasyona alındı. Belirli zaman periyotlarında absorbands ölçümleri alınarak OD₆₀₀ değeri 0,5-0,6 arasına ulaşınca kadar inkübasyona devam edildi. Bakteri süspansiyonu bek alevi yanında 2 adet 50 mL'lik steril falkon tüplerine paylaştırıldı. Falkon tüpleri +4 °C'de 3.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete bakteri süspansiyonu başlangıç hacminin yarısı kadar 0,1 M CaCl₂ çözeltisi eklendi ve nazikçe pellet çözüldü. Hücre süspansiyonu 25 dk. boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra +4 °C'de 3.000 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellete başlangıç hacminin 1/10'u kadar 0,1 M CaCl₂ çözeltisi eklenerek tekrar nazikçe çözüldü. Süspansiyon 1-4 saat kadar buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra eşit hacimde steril %40'luk soğuk gliserol ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışım, etiketlenip buz üzerinde soğutulmuş, 1,5 mL'lik ependorflara 200'er µL paylaştırıldı ve -80 °C'de muhafaza edildi [128].

3.2.2.3 Transformasyon

Kompetent hücrelerin -80 °C'de muhafaza edilen gliserol stoklarından çıkarılıp buza konuldu ve çözünmesi için 5-10 dk. beklendi. 1,5 mL'lik ependorf tüpteki 200 µL kompetent hücre üzerine transforme edilecek plazmitin 1-5 µL eklendi. Bu kompetent hücre-plazmit karışımı 40 dk. buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ependorf tüp 42°C'deki su banyosunda 2 dk. bekletilerek hücrelere ısı şoku uygulandı. Hemen ardından tüp 2 dk. buz üzerinde bekletildi. Daha sonra tüpe 37 °C'ye ılıtılmış LB besiyerinden 800 µL eklendi ve hücreler 1,5 sa. 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda transformasyon kültürünün 100 µL'si, aktarılan plazmitin dirençli olduğu antibiyotiği içeren LB agar dökülmüş petrilere yayıldı. Geriye kalan transformasyon kültürü 4.000 rpm'de beş dakika santrifüj yapıldı ve elde edilen pellet 100 µL LB besiyerinde süspansiyon edilerek diğer petrilere yayıldı. Petrilere 37 °C'deki inkübatöre 15 dk. kadar besiyerinin yayılan kültürü emmesi için düz olarak konuldu. Daha sonra petrilere ters çevrilerek hücrelerin büyümesi için 16-24 sa. inkübasyona devam edildi [129]. İnkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden gliserol stok hazırladı ve plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitlerin restriksiyon endonükleaz kesimi gerçekleştirilerek kolonilerin rekombinant olup olmadığını tespit edildi.

3.2.2.4 Gliserol Stok Hazırlanması

Transformasyon aşamasında dirençli olduğu antibiyotikle seçilimi yapılan kolonilerden, yine dirençli antibiyotiği içeren, 20 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Bir gece (16 sa.) 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilerek hazırlanan ön kültür, bek alevi yanında etiketlenmiş ependorf tüplere paylaştırıldı. Tüplere eşit hacimde %30'luk steril gliserol eklendi ve -80 °C'ye kaldırılarak uzun dönemli muhafaza edildi.

3.2.2.5 Kompetent Hücrenin Etkinliğinin Hesaplanması

Klonlama ve alt klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan kompetent hücrelere, transformasyon etkinliği bilinen, çok kopyalı halkasal plazmitler: 100 ng, 10 ng ve 0,1 ng dilüsyonlarda transforme edildi. Transformasyondan sonra seçici antibiyotiği içeren petrielerde oluşan koloniler sayıldı. Transformasyon etkinliği 10^6 - 10^8 cfu/ μ g olan kompetent hücreler çalışmalarda kullanıldı. Kompetent hücre etkinliği aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\frac{\text{Petrideki koloni sayısı (cfu)}}{\text{Petriye ekilen plazmit DNA konsantrasyonu}} \times \frac{1 \times 10^3}{\mu\text{g}} \quad (3.1)$$

3.2.2.6 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Tek koloniden ya da -80 °C'deki gliserol stoktan ilgili antibiyotiği içeren 20 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Bir gece (16 sa.) 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilerek ön kültür hazırlandı ve plazmit izolasyonu GeneJET Plasmid Miniprep™ kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Ön kültür 10.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Geriye kalan pellet 250 μ L resüspanسیون solüsyonunda çözüldü. Örnek 1,5 mL'lik ependorf tüplere alınarak üstüne 250 μ L lizis solüsyonu eklendi. Tüpler 4-6 kez nazıkçe alt üst edilerek örnek şeffaf ve sümüksü bir hale getirildi. Bu işlemten sonra 350 μ L nötralizasyon solüsyonu eklendi ve tüpler 4-6 kez alt üst edilerek örneğin bulutumsu bir hal alması sağlandı. Tüplerin 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüjü yapıldı. Dikkatle Süpernatant GenJET™ kolona transfer edildi ve kolonun 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüjü yapıldı. Kolondan süzülen alt kısım atıldı ve kolona 500 μ L yıkama solüsyonu eklenerek 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Yıkama kısmı bir kez daha tekrarlandı ve kolondaki etanol kalıntısından kurtulmak için kolon boş olarak santrifüj edildi. Son olarak kolon yeni bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 35 μ L dH₂O eklendi ve 2 dk. oda sıcaklığında bekletildi.

Kolon 14.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilerek elüsyon alındı. İzole edilen plazmit DNA miktarı belirlendikten sonra örnekler -20 °C'de saklandı.

3.2.2.7 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

İzole edilecek plazmiti içeren -80 °C'deki gliserol stoktan seçici antibiyotik içeren LB agara tek koloni ekimi yapılarak bir gece (16 sa.) 37 °C'de inkübasyonu gerçekleştirildi. LB besiyerine (20 mL) tek koloniden ekim yapılarak bir gece 37 °C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edilerek ön kültür hazırlandı. Ön kültürün 1/1000'i alınarak seçici antibiyotiği içeren 100 mL LB medyuma ekildi ve bir gece (16 sa.) 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan son kültürden plazmit izolasyonu Midi-NucleoBond Xtra™ kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. 100 mL'lik son kültür +4 °C'de 6.000 g'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Geriye kalan pellet 8 mL RNaz A içeren RES tamponunda çözülerek süspansiyon hale getirildi. Liziz aşaması için hücre süspansiyonunun üzerine 8 mL LYS tamponu eklendi ve tüpler 5 kez nazik bir şekilde ters düz edilerek 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lizat karışımına 8 mL NEU nötralizasyon tamponu eklenip tüpler nazikçe ters düz edilerek örneğin renksiz hale gelmesi sağlandı. Daha sonra örnek 5.000 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Bu esnada kitin kolonu 50 mL'lik falkona yerleştirildi ve kolona 12 mL EQU tamponu eklenerek yerçekimine karşı akış ile dengelenmesi sağlandı. Santrifüj edilmiş örneğin süpernatantı bu kolona eklenerek yerçekimine karşı akması sağlandı. Örneğin akışı tamamlandıktan sonra kolona 5 mL EQU tamponu eklenerek birinci yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kolonun akışı bitince kolon filtresi çıkarıldı ve 8 mL WASH tamponu kolona eklendi ve yerçekimine karşı akması beklendi. Kolon 50 mL'lik steril falkona alındı ve 5 mL ELU tamponu eklenerek yerçekimine karşı akışı ile elüsyon yapıldı. Elde edilen elüata oda sıcaklığındaki 3,5 mL %99,99'lük izopropanol eklendi ve vorteks yapılarak karıştırıldı. Elüat 4500 g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant dikkatle uzaklaştırıldı. Ardında kalan pellete oda sıcaklığındaki 2 mL %70'lik etanol eklendi ve pellet yıkandı. Ardından 10.000 g'de 5 dk. santrifüj edildi ve etanol dikkatle uzaklaştırıldı. Son olarak pellet oda sıcaklığında 15 dk. etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı ve ardından 400 µL dH₂O eklenerek dikkatle çözüldü. İzole edilen plazmit DNA miktarı belirlendikten sonra örnekler -20 °C'de saklandı.

3.2.3 DNA ile İlgili Teknikler

3.2.3.1 DNA Miktar Tayini

İzole edilen DNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometrik 260-280 nm dalga boylarındaki absorbans ölçümü sonucu belirlendi. Bu amaçla DNA örneklerinden 2'şer μL ve kör olarak ise 2 μL dH_2O $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ plakaya konuldu. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak DNA miktarı ve saflığı belirlendi [32]. Bu veriler aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{DNA miktarı (ng}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm}) \quad (3.2)$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280} \quad (3.3)$$

3.2.3.2 Primer Tasarımı

Tez çalışmasında kullanılan primerlerin tasarımı amacıyla www.ncbi.nlm.nih.gov, www.idtdna.com, ve www.restrictionmapper.org adreslerinden faydalanıldı. Primerler tasarlanırken saç tokası yapısı oluşmamasına, T_m değerlerinin birbirine yakın olmasına ve nükleotit dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına özellikle dikkat edildi. Son olarak tasarlanan primerlerin NCBI Blast, T_m , saç tokası ve %GC ve analizleri yapılarak uygunluğu kontrol edildi.

3.2.3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PSMD4 geninin klonlama ve mutagenез çalışmalarında hedef dizilerin amplifikasyonu amacıyla yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 50 μL son hacimde kuruldu. Çoğaltılacak bölgeye özgü olarak tasarlanmış ve 100 pmol/ μL 'ye sulandırılmış ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerden 1 μL kullanıldı. Kalıp olarak $\sim 300 \text{ ng}/\mu\text{L}$ DNA'dan 1 μL kullanıldı. 10 mM dNTP karışımından 1 μL ve 25 mM MgCl_2 'den 2 μL kullanıldı. Taq polimeraz tamponundan (10X) 5 μL ve 5 U/ μL Taq polimeraz enziminden 0,5 μL kullanıldı. PCR döngü koşulları Tablo 3.4'de belirttiği gibi yapıldı. PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

Tablo 3.4: PCR döngü koşulları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	1 dk.
2	30	94 °C	1 dk.
		55 °C	1 dk.
		72 °C	1 dk.
3	1	72 °C	10 dk.

3.2.3.4 DNA Agaroz Jel Elektrofrez

DNA'yı jelde görüntülemek amacıyla %1'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla jel elektrofrez aparatının hacmine uygun miktarda (75 mL için 1 g) agaroz tartıldı ve 0,5X TBE tamponunda çözülüp kaynatıldı. Yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğutulan agaroz jele son konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (Et-Br) ilave edilerek karıştırıldı. Tarakları önceden yerleştirilen elektrofrez kasetine jel döküldü. Dökülen jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarıldı ve kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankı 0,5X TBE tamponu ile dolduruldu. 1 kb DNA büyüklük belirteci (marker) ve 6X yükleme boyası ile karıştırılan örnekler kuyulara yüklendi ve 90 volt akımda 40 dakika yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğraflandı. DNA agaroz jel elektrofrez çalışmasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.5'de belirtilmiştir.

Tablo 3.5: DNA agaroz jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
5X TBE Tamponu	445 mM Tris Base-Borik asit ve 10 mM EDTA içeren (pH 8,3) çözelti hazırlandı. 54 g Tris Baz, 27,5 g Borik asit ~900 mL dH ₂ O'da çözüldü ve 20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklendi. pH 8,3'e ayarlanıp hacim 1 L'ye tamamlandı. Otoklavlanıp kullanıldı.
Et-Br Stok Çözelti	Son derişimi 10 mg/mL olarak hazırlandı ve ışık almayan bir şişede +4 °C'de saklandı.
1 kb DNA Marker	1 µL (DNA ladder) : 1 µL (Yükleme boyası) : 4 µL (dH ₂ O) oranında karıştırılarak hazırlandı.

3.2.3.5 Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması

Agaroz jelden geri kazanılmak istenilen DNA bantları UV ışığa fazla maruz bırakılmadan mümkün olduğunca jel hacmi minimize edilerek kesildi. Jelden DNA'nın geri kazanılması GeneJET Gel Extraction™ kitinin önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kesilen agaroz jel parçalarının miktarı belirlenerek ependorf tüplere konuldu ve üzerine 1:1 oranında bağlama tamponu eklendi (Örneğin, her 100 mg agaroz jel için 100 µL bağlama tamponu gibi). Jel-tampon karışımı 55-60 °C'deki ısıtıcı blokta ~10 dk. inkübe edilerek jelin tamamen erimesi sağlandı. Bu erimiş jel solüsyonunun 800 µL'si GeneJET™ saflaştırma kolonuna transfer edilerek kolon 1 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işleme erimiş jel solüsyonu bitene kadar devam edildi ancak her kolon için toplam agaroz miktarının 1 gramı geçmemesine dikkat edildi. Transferden sonra kolona 700 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Kolonun alt kısmı döküldü ve yıkama kalıntılarını

uzaklaştırmak için kolon boş olarak santrifüj edildi. Son olarak kolon yeni bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 55 °C’de ısıtılmış 35 µL dH₂O eklendi ve 14.000 rpm’de 1 dk. santrifüj yapılarak elüsyon yapıldı. Örnek -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.3.6 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin hedefi olan kesim bölgeleri taşıyan primer ya da plazmitlere restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı. Bu amaçla kullanılacak restriksiyon endonükleaz enzimleri için önerilen tampon, son hacim, DNA ve enzim miktarları dikkate alınarak kesim reaksiyonları hazırlandı. Kullanılan enzim miktarının (hacminin) reaksiyonun son hacminin %10’nunu aşmamasına dikkat edildi. Kesim reaksiyonu üretici firmaların enzim için önerdiği optimum sıcaklık ve inkübasyon süresine göre gerçekleştirildi. Ayrıca iki farklı endonükleaz ile aynı zamanda kesim yapılması gerekiyorsa bu enzimlerin optimum çalışabileceği ortak tamponlar tercih edildi. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV ışık altında görüntülendi. Bazı durumlarda çalışmanın devamındaki plana göre agaroz jelden geri kazanıldı.

3.2.3.7 Ligasyon

Çalışmalarda, klonlanacak olan DNA (insert) ile lineer vektörü birbirine bağlamak için ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Farklı son hacimlere göre Tablo 3.6’da bileşenleri verilen ligasyon ortamları hazırlanarak +16 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı [128]. Ligasyon ürünleri kompetent hücrelere transforme edilip rekombinant koloniler araştırıldı.

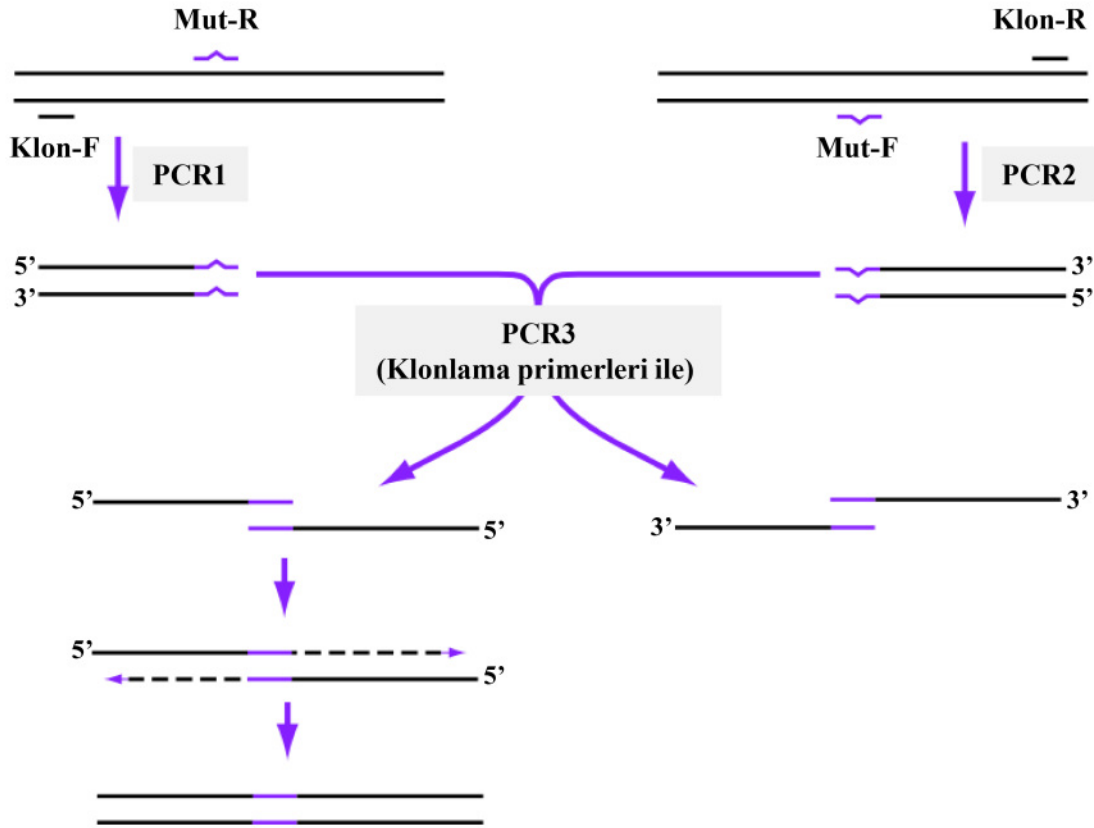
Tablo 3.6: Ligasyon ortamı bileşenleri.

Bileşenler	Miktar	
	► Son hacim 20 µL	► Son hacim 30 µL
İnsert DNA	12 µL	19 µL
Lineer vektör	5 µL	7 µL
T4 DNA ligaz tampon (10X)	2 µL	3 µL
T4 DNA ligaz (5 U/µL)	1 µL	1 µL

3.2.3.8 PCR Tabanlı Yönlendirilmiş Mutageniz Tekniği

PCR-tabanlı *in vitro* mutageniz tekniğinde farklı amaçlarla üç PCR gerçekleştirildi [131]. Mutasyonu hedeflenen gene, mutasyon ve klonlama primeri kullanılarak, PCR1 (geri mutasyon / ileri klonlama primeri) ve PCR2 (ileri mutasyon / geri klonlama primeri) yapılarak mutasyon bölgesini taşıyan ürünler elde edildi. PCR1 ve PCR2 ürünleri ile

klonlama primerleri kullanılarak yapılan PCR3 de ise mutasyonu taşıyan genin tam uzunluğunda ürünler elde edildi. Bu tekniğin basamakları Şekil 3.5’de gösterilmiştir.



Şekil 3.5: PCR-tabanlı mutagenез tekniğinin basamakları (uyarlanmıştır [132]).

3.2.3.9 shRNA Hazırlama Tekniği

Çalışmada, genlerin susturulması amacıyla, bu genleri hedefleyen shRNA oligolar Whitehead Biyomedikal Araştırma Enstitüsü (<http://sirna.wi.mit.edu/>) siRNA seçim programı kullanılarak tasarlandı. Bu oligolar klonlanacak vektöre (pLKO.1-TRC) göre üretici firmanın önerdiği (Addgene) şekilde sipariş edildi. Temin edilen ileri ve geri oligolar, annealing reaksiyonu kurularak birleştirildi. Oligoların klonlanacağı pLKO.1-TRC vektörüne *EcoRI* ve *AgeI* enzimleriyle restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı ve kesim ürünleri agaroz jelde yürütülerek jelden geri kazanıldı. Klonlamaya hazır hale gelen shRNA oligolarına ve lineer pLKO.1-TRC vektörüne, ligasyon reaksiyonu yapıldı. Ligasyon ürünleri kompetent hücrelere transforme edildi ve seçici besiyerinde koloni oluşumu gözlemlendi. Bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapılarak *EcoRI* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kontrol kesimi yapıldı. Kesim ürünleri agaroz jelde yürütülerek klonlama sonucu doğrulandı.

3.2.4 Hücre Kültürü ile İlgili Teknikler

3.2.4.1 Besiyeri Serumunun Hazırlanması

Kültürdeki hücrelerin büyümesini desteklemek için FCS (Fetal Calf Serum) kullanıldı. FCS ticari olarak, soğuk zincirle taşınıp, temin edildi ve -20°C’de muhafaza edildi. Stok FCS, ilk kullanım öncesinde, bir gece + 4 °C’de tutularak tamamen eritildi ve 56 °C’de 1 saat ısı ile inaktive edilerek hazır hale getirildi. Kullanıma hazır FCS laminar flow kabinde 50 mL’lik steril falkonlara paylaştırıldı ve -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.4.2 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri ortamı olarak DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) kullanıldı. DMEM ticari olarak temin edilip +4°C’de saklandı. DMEM bileşiminde L-Glutamin yoksa, kullanım öncesinde, L-Glutamin (200 mM steril stoğundan) %1 olacak şekilde (son konsantrasyonu ~ 2mM) eklendi. Çalışmada kullanılan hücre hatları (PANC-1 ve HUVEC) için, tam besiyeri olarak, hacimce %10 FCS içeren DMEM kullanıldı. Eğer besiyerinde antibiyotik kullanılacaksa 100X’lik penisilin-streptomisin solüsyonundan son konsantrasyonu 1X olacak şekilde eklendi.

3.2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7: Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
PBS (1X) (Phosphate Buffered Salin)	PBS ticari olarak tablet formunda temin edildi ve önerildiği şekilde (bir tablet 100 mL dH ₂ O’da çözülerek) hazırlandı. Bu çözelti otoklavlanarak steril edildi ve +4°C’de saklandı.
Tripsin-EDTA (TE) Çözeltisi	1X PBS içinde %0,25 (w/v) tripsin ve 0,53 mM EDTA içeren çözelti hazırlandı. Bu çözelti 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek steril edildi ve falkonlara paylaştırılarak -20 °C’de saklandı.
Tripan Mavisi	1X PBS içinde %0,4 (w/v) tripan mavisi çözeltisi hazırlandı. 0,4 g tripan mavisi 80 mL PBS’de çözülerek yavaş yavaş kaynatıldı. Daha sonra oda sıcaklığına soğutulup PBS ile son hacmi 100 mL’ye tamamlandı.

3.2.4.4 Hücre Soyunun Başlatılması

Hücre kültürü çalışmalarında aseptik tekniklere uymaya azami düzeyde dikkat edildi. Çalışmaya başlamadan önce gerekli malzemeler laminar flow kabine %70’lik alkol ile

silinerek alındı. Besiyeri bileşenleri ve diğer çözeltiler 37 °C'deki su banyosunda ılıtılarak kullanıma uygun hale getirildi.

Stok olarak -80 °C'de cryovial tüplerde dondurulmuş halde muhafaza edilen hücre soylarından biri alınıp 37 °C'deki su banyosunda (1-2 dk. bekletilip) hızlıca erimesi sağlandı. Eriyen hücreler, içinde ~ 6 mL tam besiyeri (hacimce %10'luk FCS'li DMEM) bulunan 15 mL'lik falkona aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1.000 rpm'de beş dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti 1-2 mL tam besiyerinde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu (25 cm² ya da 75 cm²'lik) flaska aktarıldı ve tam besiyeri eklenerek flask son hacmine (25 cm² için 5 mL, 75 cm² için 15 mL) tamamlandı. Etiketlenen flasklar, hücrelerin büyüüp çoğalması için 37 °C'deki %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.4.5 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler inverted mikroskopta düzenli aralıklarda incelendi ve flask yüzeyini %80-90 oranında kapladığında pasajlama işlemine geçildi. Öncelikle flask içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı. Hücreleri tutundukları yüzeyden ayırmak amacıyla flaska uygun miktarda (25 cm² için 1 mL, 75 cm² için 3 mL) Tripsin-EDTA (TE) eklenerek flask inkübatöre kaldırıldı. Tripsinizasyonla hücrelerin yüzeyden ayrılması tamamlandığında kullanılan TE'nin 2 katı hacimde tam besiyeri eklenerek tripsin inaktive edildi. Hücre süspansiyonu steril falkona aktarılarak 1.000 rpm'de beş dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücre pelleti tam besiyerinde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu 3-4 flaska eşit olarak paylaştırıldı ve tam besiyeri ile flask son hacmine tamamlandı. Flasklar %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatöre kaldırıldı.

3.2.4.6 Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda tekrar kullanabilmek amacıyla hücre soyları dondurularak saklandı. Bölüm 3.2.4.5'de hücrelerin pasajlanması işleminde açıklandığı gibi sağlıklı bir şekilde büyüyerek flask yüzeyini %80-90 oranında kaplayan hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. Devamında hücreler 2 kez 1X PBS kullanarak yıkandı ve TE eklenerek yüzeyden kaldırıldı. Tam besiyeri ilavesiyle tripsin inaktivasyonu yapıldıktan sonra hücre süspansiyonu 1.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan pellet, 1 mL %10 (v/v) DMSO içeren FCS ile süspansiyon hale getirildi. Hücre süspansiyonu etiketlenmiş cryovial tüpe konuldu ve -80 °C'de dondurularak muhafaza edildi.

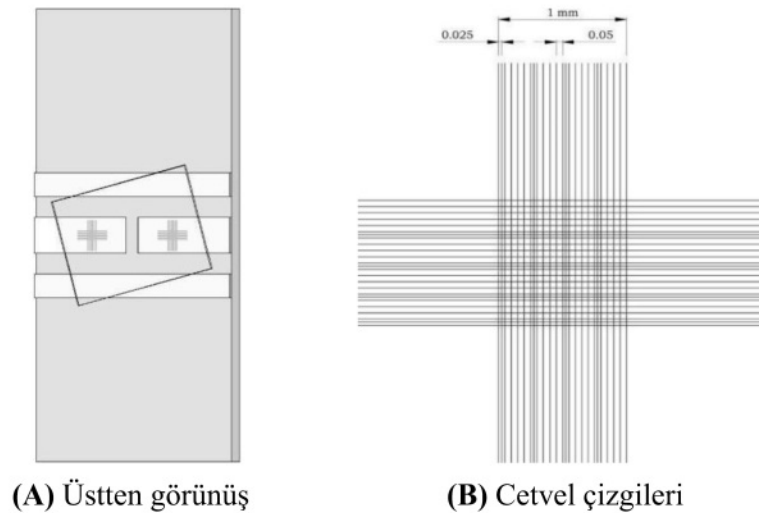
3.2.4.7 Hücre Canlılığının ve Sayısının Belirlenmesi

Hücre kültürü çalışmalarında tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek amacıyla hücrelerin canlılığı ve sayısı belirlendi. Bu amaca uygun olarak canlı hücre sayısı tripan mavisi ve Thoma lamı (bk. Şekil 3.6) kullanılarak tespit edildi. Sağlıklı bir şekilde büyütülüp Bölüm 3.2.4.5’de belirtildiği gibi hazırlanan hücre pelleti, 5-10 mL tam besiyeri ile homojen olacak şekilde süspanse hale getirdi. Bu hücre süspanسیونundan 50 µL alınıp ependorf tüpe konuldu ve üzerine eşit hacimde (2 kat seyreltme oranı) tripan mavisi eklendi. Bu süspanسیون nazıkçe pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı ve 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar pipetaj yapılarak homojenliği sağlanan hücre süspanسیونundan 10 µL alınıp Thoma lamına aktarıldı ve inverted mikroskop altında (20X ya da 40X büyütmede) sayım gerçekleştirildi. Hücreler sayılırken tripan boyasını içine alan mavi hücreler ölü, boyayı içine almayan parlak beyaz hücreler ise canlı kabul edildi. Mikroskop görüntü alanındaki hücreler sayılarak mL’deki toplam hücre ve canlı hücre sayısının hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanıldı [133].

$$\text{Total hücre sayısı (mL’deki)} = \text{Alandaki toplam hücre sayısı} \times 2 \times 10^4 \quad (3.4)$$

$$\text{Canlı hücre sayısı (mL’deki)} = \text{Alandaki canlı hücre sayısı} \times 2 \times 10^4 \quad (3.5)$$

$$\text{Canlılık yüzdesi} = \frac{\text{Alandaki canlı hücre sayısı}}{\text{Alandaki total hücre sayısı}} \times 100 \quad (3.6)$$



Şekil 3.6: Thoma lamı şematik gösterimi.

3.2.4.8 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Sağlıklı bir şekilde büyütülüp birkaç kez pasajlanmış hücre hattının mL'indeki canlı hücre sayısı (bk. Bölüm 3.2.4.7) belirlendi. Bu hücreler, 25 cm²'lik flasklara 2x10⁶ hücre/flask olacak şekilde tam besiyeri ile son hacmi 5 mL'ye tamamlanıp paylaştırıldı. Flasklar, hücrelerin yüzeye tutunması için 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün, flastaki hücrelerin yüzeye tutunması inverted mikroskobunda takip edildi ve tutunma oranı %70-80'e ulaştığında besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez 1X PBS kullanılarak yıkandı ve flasklara %0,1 (w/v) BSA'lı DMEM eklendi. Flasklar, 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatörde, 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra kontrol grubu hariç diğer flasklara, son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde, VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü) sitokini uygulandı. Flasklar tekrar inkübatöre konuldu ve inkübasyon süresinin 1., 3., 6., 24. ve 48. saatlerinde hücreler kaldırılarak pellet elde edildi. Bu pelletler, RNA izolasyonu veya protein ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.4.9 Yolak İnhibisyon Deneylerinin Kurulması

Birkaç kez pasaj yapılarak büyütülen hücre hattının mL'indeki hücre sayısı belirlendi. Bölüm 3.2.4.8'de açıklandığı gibi hücreler 25 cm²'lik flasklara paylaştırıldı ve hücrelerin yüzeye tutunması için 1 gece 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün, %70-80 tutunma oranına ulaşan hücrelerden besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez 1X PBS içinde yıkandı. Flasklara %0,1 (w/v) BSA'lı DMEM eklenip 1 sa. inkübatöre bırakıldı. İnkübasyon sonunda kontrol ve sadece sitokin uygulanacak flasklar hariç diğer flasklara son konsantrasyonları Tablo 3.8'de verilen PD169316, SP600125, PD98059 ve Wortmannin inhibitörleri uygulandı. Flasklar 45 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra kontrol grubu hariç diğer flasklara son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulandı. Flasklar tekrar inkübatöre konuldu ve inkübasyon süresinin 6. saatinde tüm flasklardaki hücreler kaldırılarak pellet elde edildi. Bu pelletler, RNA izolasyonu veya protein ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.8: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitörler ve son konsantrasyonları.

İnhibitörler	Son Konsantrasyon
PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü)	5 µM
SP600125 (JNK inhibitörü)	20 µM
PD98059 (MEK inhibitörü)	10 µM
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	1 µM

3.2.5 Transfeksiyon Çalışmaları ile İlgili Teknikler

Çalışmada plazmit DNA'ları memeli hücre hatlarına geçici olarak aktarmak için transfeksiyon çalışmaları yapıldı.

3.2.5.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyonu ile Geçici Transfeksiyon

Çalışmalarında kullanılacak hücre hattı birkaç kez pasaj yapılarak büyütüldü ve mL'indeki canlı hücre sayısı belirlendikten sonra 25 cm²'lik flasklara, 2x10⁶ hücre/flask olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyondan önce kullanılacak çözeltiler (bk. Tablo 3.9) oda sıcaklığına getirilip çökme olup olmadığı kontrol edildi. 25 cm²'lik flask için son hacimleri 315 µL olan çözelti A (31,5 µL, 2,5 M CaCl₂ ve ~10 µg DNA) ve Çözelti B (2X HeBS) ependorf tüplerde hazırlandı. Farklı flask ve plakalar için gereken çözelti A ve B bileşenleri Tablo 3.10'da verilmiştir. Çözelti A, pastör pipetiyle hava kabarcığı oluşturulan çözelti B'ye damla damla eklendi. Bu transfeksiyon ortamı presipitasyonun oluşması için oda sıcaklığında 30-60 dk. inkübe edildi. Daha sonra DNA:Kalsiyum fosfat presipitasyon kompleksi nazikçe karıştırılarak flasklara damla damla eklendi. Flasklar, ileri-geri yavaşça hareket ettirilip karışımın eşit dağılması sağlandıktan sonra 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatörde 8-16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra transfeksiyon ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez 1X PBS (ya da DMEM) ile yıkanarak flasklara tam besiyeri (hacimce %10'luk FCS'li DMEM) eklendi. Flasklar 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve transfeksiyonun 72. saatine kadar inkübasyona devam edildi. Geçici transfeksiyonun inkübasyon aşamasındaki hücrelere, devamında yapılacak çalışmanın amacına göre farklı işlemler uygulanmıştır.

Tablo 3.9: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
2,5 M CaCl ₂	36,75 g CaCl ₂ (MW: 147,01) 100 mL dH ₂ O'da çözüldü. Çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
2X HEPES-Buffered Saline (2X HeBS) - 50 mM HEPES - 280 mM NaCl - 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,05-7,12)	1,19 g HEPES (MW:238,3), 1,63 g NaCl (MW:58,44) ve 0,02 g Na ₂ HPO ₄ (MW:141,96) ~90 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 7,05'e ayarlanıp hacim 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.10: Kalsiyum fosfat presipitasyonunda kullanılan çözelti bileşenleri.

Flask / Plate	Çözelti A			Çözelti B	Kültür Hacmi
	DNA	2,5 M CaCl ₂	dH ₂ O ile	2X HeBS	
96-well	~ 0,1 µg	0,45 µL	4,5 µL	4,5 µL	200 µL
24-well	~ 0,5 µg (0,3-0,7 µg)	2,25 µL	22,5 µL	22,5 µL	500 µL
12-well	~ 1 µg (0,5-1,2 µg)	4,5 µL	45 µL	45 µL	1 mL
6-well	~ 2 µg (1-3 µg)	9 µL	90 µL	90 µL	2 mL
35 mm	~ 2 µg (1-3 µg)	9 µL	90 µL	90 µL	2 mL
60 mm	~ 7,5 µg (2-10 µg)	27 µL	270 µL	270 µL	5 mL
100 mm	~ 15 µg (6-20 µg)	63 µL	630 µL	630 µL	10 mL
T25 flask	~ 10 µg (4-20 µg)	31,5 µL	315 µL	315 µL	5 mL
T75 flask	~ 20 µg (10-30 µg)	94,5 µL	945 µL	945 µL	15 mL

3.2.5.2 Ticari Transfeksiyon Reaktifi ile Geçici Transfeksiyon

Transfeksiyondan bir gün önce, birkaç kez pasaj yapılarak sağlıklı bir şekilde büyütülmüş hücre hattının mL’indeki canlı hücre sayısı belirlendi. Hücreler transfeksiyon yapılacak kültür kabına optimum sayıda paylaştırılıp 37 °C’deki %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Transfeksiyondan önce ticari transfeksiyon reaktifleri, DNA ve DMEM oda sıcaklığına getirildi. 1 µg plazmit DNA, son konsantrasyonu 0,01 µg/µL olacak şekilde serumsuz DMEM ile karıştırılıp seyreltildi. Her 100 µL’lik seyreltilmiş DNA ortamına 1 µL X-tremeGENE™ HP DNA (veya 2 µL TurboFect™) Transfeksiyon Reaktifi eklenerek hafifçe karıştırıldı. Transfeksiyon reaktifi:DNA karışımı 15 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücrelerin üzerine damla damla eklendi. Kültür kabı hafifçe sallanıp karışımın eşit dağılması sağlandıktan sonra 37 °C’deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve transfeksiyonun 72. saatine kadar inkübasyona devam edildi. Geçici transfeksiyonun inkübasyon aşamasındaki hücrelere, devamında yapılacak çalışmanın amacına göre farklı işlemler uygulanmıştır.

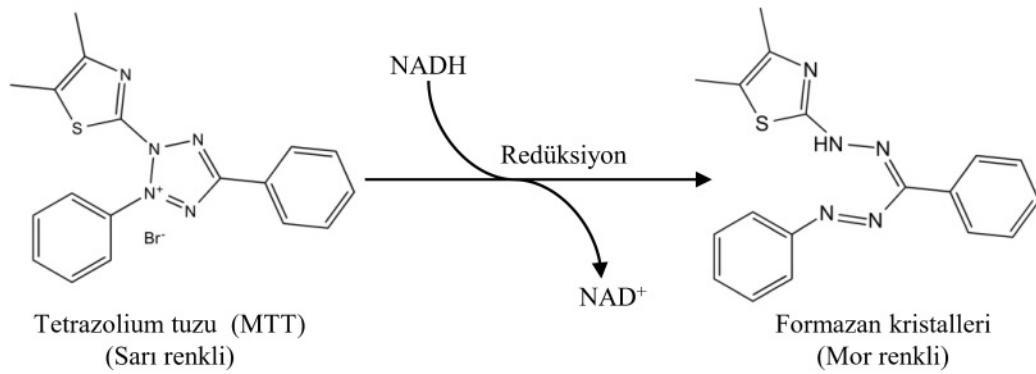
3.2.6 Flow Sitometri Yöntemi

Çalışmada pEGFP-C vektörüne klonlanan genlerin over ekspresyonunu gözlemleyip doğrulamak amacıyla hücrelerdeki yeşil floresan protein (GFP) sinyali flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. Bu amaçla GFP sinyalini taşıyan genlerin Bölüm 3.2.5’de belirtildiği gibi geçici transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde hücrelerden besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandıktan sonra tripsinizasyonla kaldırıldı. Hücre süspansiyonu 1.000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

Geriye kalan hücre pelleti 1X PBS ile yıkanıp tekrar 1X PBS’de süspanse edildi. Bu süspanse hücre örnekleri Guava EasyCyte™ flow sitometri cihazında analiz edildi.

3.2.7 Sitotoksite Deneyi

Hücre canlılığının, proliferasyonunun ve sitotoksitesinin bir indikatörü olan hücre metabolik aktiviteyi ölçmek amacıyla MTT testi kullanıldı. Kolorimetrik olan bu yöntem, sarı renkli tetrazolium tuzunun (MTT) -canlı hücrelerin metabolik aktivitesiyle- mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanır (bk. Şekil 3.7). MTT testinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.11’de verilmiştir.



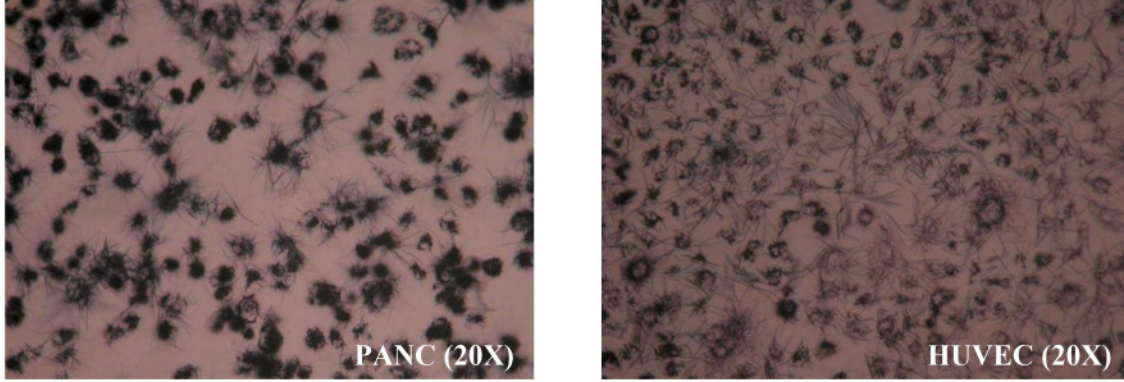
Şekil 3.7: MTT testinde gerçekleşen kimyasal değişim.

Tablo 3.11: MTT testinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
Stok MTT Çözelti (5 mg/mL)	0,25 g MTT tozu, 50 mL 1X PBS’de çözüldü. Bu çözelti, 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve ependorflara paylaştırıldı. Işık almayacak şekilde +4°C’de (uzun dönemli -20 °C’de) saklandı.
4 mM HCl içeren izopropanol	210 µL HCl, son hacmi 500 mL olacak şekilde izopropanole eklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

Çalışmada, 96 kuyucuklu plaka için MTT testinde kullanılacak optimum hücre sayısı belirlendi. Bölüm 3.2.5’de belirtildiği gibi transfeksiyon yapılan hücreler, 96 kuyucuklu plakaya optimum sayıda paylaştırıldı. Plaka 37 °C’deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde MTT testi uygulandı. Bu amaçla hücrelerin bulunduğu her bir kuyuya MTT çözeltisi (son konsantrasyonu 0,5 mg/mL) koyuldu. Hücrelerin MTT’yi metabolize etmesi için 37 °C’deki %5 CO₂ içeren

inkübatörde 4 saat bekletildi. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristalleri (bk. Şekil 3.8) her bir kuyuya 200 µL izopropanol (4 mM HCl içeren) eklenerek çözüldü. Sonrasında örneklerin (550 nm dalga boyunda) spektrofotometrede absorbanası ölçüldü [134]. Örneklerin her biri en az 6 tekrarlı çalışıldı.



Şekil 3.8: Çalışmada kullanılan hücrelerdeki formazan kristallerinin görüntüsü.

Absorbans ölçüm verileri analiz edilirken, örneklerin absorbans değerinden kör olarak kullanılan (hücre içermeyen serumlu ya da serumsuz besiyeri) örneğin absorbans değeri çıkarılarak düzeltilmiş absorbans hesaplandı. Düzeltilmiş absorbans ile örnekteki hücre sayısı doğru orantılı olarak değerlendirildi. Deney grubu örneklerinin kontrol hücrelerinden daha düşük absorbansa sahip olması hücre proliferasyon hızındaki azalmaya tersi durum ise proliferasyon hızındaki artmaya işaret etmektedir. Ayrıca örneklerin düzeltilmiş absorbans değerleri kullanılarak hücrelerin yüzde (%) canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip analiz edildi.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek hücrelerin absorbansı}}{\text{Kontrol hücrelerin absorbansı}} \times 100 \quad (3.7)$$

3.2.8 Migrasyon Deneyi

In vitro hücre migrasyonunu ölçmek amacıyla scratch (çizik) testi yapıldı. Yara iyileşme (wound healing) testi olarak da bilinen scratch testi; tek katmanlı hücre tabakasında bir “çizik” oluşturma, çizici kapatmak için göç eden hücrelerden görüntüler alma ve bu görüntüleri karşılaştırma esasına dayanır. Çalışmada scratch testi yapmak amacıyla Bölüm 3.2.5’de belirtildiği gibi transfeksiyon yapılan hücreler, tripsinizasyonla yüzeyden kaldırılıp sayıldı ve 12 kuyucuklu plakaya 25×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Hücrelerin tüm yüzeyi kaplayıp tek katmanlı bir tabaka oluşturması için 16-24 saat inkübe

edildi. Her kuyu için standart olacak şekilde steril 10 µL'lik beyaz pipet ucuyla kuyucuğun ortasına çizik atıldı. Çizme işlemi sırasında ayrılan hücreleri uzaklaştırmak için hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandı ve kuyulara tam besiyeri konuldu. 12 kuyucuklu plaka inkübatöre konulmadan önce kuyucuklar 0. saate inverted mikroskop altında görüntülenip fotoğraflandı. İnkübasyonun 1., 3., 6., 24. 48. saat gibi zaman aralıklarında çizik kapanana kadar kuyucuklar tekrar görüntülenip fotoğraflandı. Fotoğraflar ImageJ programındaki MRI Wound Healing Tool eklentisi ile analiz edildi [135]. Hücrelerin göç etme oranları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Hücre göçü (\%)} = \frac{(0. \text{ saat çizik alanı} - \text{İlgili saatin çizik alanı})}{0. \text{ saat çizik alanı}} \times 100 \quad (3.8)$$

3.2.9 Koloni Formasyon Deneyi

Hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini ölçmek amacıyla koloni formasyon testi yapıldı. Klonojenik test olarak da bilinen koloni formasyon testi, tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme yeteneğini incelemek için kullanılan *in vitro* kantitatif bir tekniktir. Koloni formasyon testi için 6 kuyucuklu plakada kullanılacak optimum hücre sayısı belirlendi. Daha sonra Bölüm 3.2.5'de belirtildiği gibi transfeksiyonu yapılan hücreler 6 kuyucuklu plakaya optimum sayıda paylaştırıldı. Plaka 37 °C'deki %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve inkübasyonun 72. saatinde transfeksiyon işlemi tekrar edildi. Hücrelerin koloni oluşturma durumu inverted mikroskop altında takip edildi. Yeterli koloni yoğunluğuna ulaşıldığında (ortalama 7-10 gün sonra) hücrelerden tam besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile yıkandı. Kolonileri sabitlemek için hücrelerin üzerini kaplayacak kadar %100 metanol eklendi ve 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Metanol uzaklaştırılıp hücreler dH₂O ile yıkandı, kolonileri boyamak için birkaç damla %0,5 (w/v) kristal viyole çözeltisi eklendi ve 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra hücrelerdeki fazlalık boya çıkana kadar kuyucuklar suyla yıkandı. 6 kuyucuklu plaka kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilip 1 gece kurutulduktan sonra kuyucuklar görüntülenip fotoğraflandı. CellCounter programı kullanılarak kuyucukların tüm alanındaki koloni sayısı belirlendi ve sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi.

3.2.10 Floresan Çalışmaları ile İlgili Teknikler

Floresan çalışmaları sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.12'de verilmiştir.

Tablo 3.12: Floresan çalışmalarında kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
% 4 (w/v) PFA (Paraformaldehit) Çözeltisi	~ 80 mL 1X PBS ısıtmalı manyetik karıştırıcıda 55 °C'ye getirildi ve üzerine 4 g paraformaldehit eklenip karıştırıldı. 10 N NaOH çözeltisinden (~ 200 µL) berrak çözelti oluşana kadar damla ilave edildi. Çözelti oda sıcaklığına getirildi ve pH'ı 7,2'ye ayarlanıp son hacmi 1X PBS ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 0,45 µm filtreden geçirilip ependorf tüplere paylaştırıldı. Tüpler ışık almayacak şekilde -20 °C'de saklandı.
DAPI Boyası (300 nM)	14,3 mM (5mg/mL) DAPI stok çözeltisinden 2,1 µL alınıp 97,9 µL 1X PBS ile karıştırıldı. Bu 300 µM'lik ara dilüsyon, 1:1.000 oranında 1X PBS'de seyreltilerek 300 nM DAPI boyası hazırlandı.

3.2.10.1 Floresan Mikroskobunda GFP Analizi

Hücrelerde genlerden ifade edilen proteinlerin lokalizasyonunu belirlemek için GFP (yeşil floresan protein) analizi tekniği kullanıldı. Bu teknikte pEGFP-C1 vektörüne klonlanan genlerin protein ürünleri, GFP'nin C-terminaline füzyon olarak ifade olmaktadır. Bu floresan etiketli proteinlerin sinyali floresan mikroskop altında görüntülenerek hücresel lokalizasyonu tespit edildi. Bu amaca uygun olarak Bölüm 3.2.5.2'de açıklandığı gibi pEGFP-C1 vektöründeki genler hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 24. saatinde hücreler tripsinizasyonla yüzeyden kaldırılıp sayıldı ve kuyucuklarına steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş 24 kuyucuklu plakaya 125×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Plaka, hücrelerin yüzeye tutunması için inkübatöre kaldırıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde hücrelerden tam besiyeri uzaklaştırılıp hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelerin üstüne 250 µL %4 (w/v) paraformaldehit çözeltisi eklenip, 15 dk. oda sıcaklığında fiksasyon yapıldı. Fiksatif ortam uzaklaştırılıp hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelerin çekirdeğini boyamak için üzerini kaplayacak kadar 300 nM DAPI boyası eklenip 1-5 dk. karanlık ortamda inkübe edildi. Ortamdan DAPI uzaklaştırılıp hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı ve yuvarlak lameller mikroskop incelemesine hazırlandı. Bu amaçla kuyucukların tabanındaki yuvarlak lameller dikkatle çıkarıldı ve üzerine floresan sinyalin solmasını engelleyen ticari antifade reaktifi damlatılmış lamlara - hücreler arada kalacak şekilde- ters çevrilerek kapatıldı. Lamellerin kenarları saydam oje ile sabitlendi ve kuruması için oda sıcaklığındaki karanlık ortamda 24 sa. bekletildi. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Floresan görüntüler ImageJ programında analiz edildi.

3.2.10.2 İmmünofloresan (IFC) Deneyi

İmmünofloresan, antikorların floresan bir boya ile etiketlenip antijen-antikor kompleksinin floresan mikroskopta görüntülendiği, antijen-antikor reaksiyonuna dayanan, bir tekniktir. Bu amaçla Bölüm 3.2.4.5’de açıklandığı gibi birkaç kez pasaj yapılarak büyütülmüş hücre hatlarının mL’indeki canlı hücre sayısı (bk. Bölüm 3.2.4.7) belirlendi. Hücreler, kuyucuklarına steril yuvarlak lameller yerleştirilen 24 kuyucuklu plakaya 125×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Plaka, hücrelerin yüzeye tutunması için 1 gece (16 sa.) 37°C ’deki %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün Bölüm 3.2.5’de belirtildiği gibi transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde hücrelerden tam besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon için hücrelere $250\ \mu\text{L}$ %4 (w/v) paraformaldehit çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi. Fiksatif ortam uzaklaştırılıp hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelere, zarlarını zayıflatmak için $250\ \mu\text{L}$ %0,1 (v/v) Triton X-100 içeren PBS eklendi ve on dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı. Hücrelere $250\ \mu\text{L}$ %1 (w/v) BSA içeren PBS eklenip 1 sa. oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama yapıldı. Hücreler iki kez 1X PBS ile 5 dk. boyunca yıkandı. Hücrelere $100\ \mu\text{L}$ primer antikor (1/250 oranında %1 BSA içeren PBS ile seyreltilmiş PSMD4 antikor) eklenerek nemlendirilmiş kutuda (humidity chamber) 1 gece $+4^\circ\text{C}$ ’de inkübasyon yapıldı. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırılıp hücreler iki kez 1X PBS ile 5 dk. boyunca yıkandı. Bundan sonraki işlemlere oda sıcaklığında ve karanlık ortamda devam edildi. Hücrelere $100\ \mu\text{L}$ sekonder antikor (1/400 oranında %1 BSA içeren PBS ile seyreltilmiş Alexa Fluor™ 568 goat anti-mouse antikor) eklenerek nemlendirilmiş kutuda 1 sa. oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor uzaklaştırılıp hücreler üç kez 1X PBS ile 5 dk. boyunca yıkandı. Yıkama sonunda hücrelerin üzerini kaplayacak kadar $300\ \text{nM}$ DAPI boyası eklenip 1-5 dk. karanlık ortamda inkübe edildi. Daha sonra hücreler üç kez 1X PBS ile yıkandı ve yuvarlak lameller mikroskop incelemesine hazırlandı. Bu amaçla kuyucukların tabanındaki yuvarlak lameller dikkatle çıkarıldı ve üzerine floresan sinyalin solmasını engelleyen ticari antifade reaktifi damlatılmış lamlara -hücreler arada kalacak şekilde- ters çevrilerek kapatıldı. Lamellerin kenarları saydam oje ile sabitlendi ve kuruması için oda sıcaklığındaki karanlık ortamda 24 sa. bekletildi. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu kullanılarak görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. Floresan görüntüler ImageJ programında analiz edildi.

3.2.10.3 Floresan Miktarının Belirlenmesi

Floresan çalışmalarında hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu altında 40X ya da 100X büyütmede görüntülenerek farklı bölgelerin 5-10 fotoğrafı alındı. Görüntülerdeki floresan miktarı ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla her seferinde görüntüdeki bir hücre seçilerek alan, integre yoğunluk ve gri değer ortalaması ölçüldü. Ayrıca her görüntüdeki otofloresansı normalleştirmek için hücre olmayan 3 arka plan alanı ölçümü alındı. Düzeltilmiş Toplam Hücre Floresansı (CTCF: Corrected Total Cell Fluorescence) hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı [136]. Her hücrenin floresan yoğunluğu Microsoft® Excel programında hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip analiz edildi.

$$\text{CTCF} = \text{İntegre yoğunluk} - (\text{Seçilen alan} \times \text{Arka plan okumaları ort. floresansı}) \quad (3.9)$$

3.2.11 Salınan Sistem Lusiferaz ve SEAP Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmada PSMD4 genine ait promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay kiti kullanılarak belirlendi. Bu amaçla promotor parçalarının klonlandığı pMetLuc-reporter vektörü ve pSEAP2-kontrol vektörü Bölüm 3.2.5’de bahsedildiği gibi hücrelere birlikte transfeksiyonu yapıldı. Ayrıca transfeksiyonun etkinliğini belirlemek amacıyla pMetLuc-kontrol ve pMetLuc-reporter vektörleri hücrelere pSEAP2-kontrol vektörüyle birlikte transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. saatinde hücrelerden alınan besiyeri örneklerinden lusiferaz ve SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) aktivitesi ölçüldü. Salınan lusiferaz ve SEAP sisteminin basamakları EK I’da verilmiştir.

Lusiferaz aktivitesini belirlemek için 10X substrat solüsyonu, substrat reaksiyon tamponu ile 1X olacak şekilde seyreltildi. Daha sonra 384 kuyucuklu plakaya besiyeri örneğinden 9 µL koyulup üzerine 1 µL 1X substrat/reaksiyon tamponu koyuldu. Aktivite sonuçları hızlıca luminometre cihazında ölçüldü.

SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) aktivitesini belirlemek için 5X dilisyon tamponu dH₂O ile 1X’e seyreltildi. Hücre besiyeri örneklerinden 5’er µL 384 kuyucuklu plakaya konuldu. Örneklerin üzerine 15 µL 1X dilisyon tamponu eklendi ve plaka alüminyum folyoya sarılıp 65 °C’deki su banyosunda 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plaka oda sıcaklığına getirmek için 2-3 dakika buz üzerinde tutuldu. Daha sonra her bir kuyuya SEAP substrat

solüsyonundan 20'şer µL ilave edildi. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra luminometrede ölçüm alındı.

Lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçüm sonuçları değerlendirilirken her bir örneğin lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine bölünerek relative lusiferaz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip analiz edildi.

3.2.12 RNA ile İlgili Teknikler

RNA çalışmalarında ortam ve malzemelerdeki RNaz'ların inaktive olması için hacimce %0,1 DEPC'li su kullanıldı. Ayrıca çalışmalarda kullanılan tamponlar %0,1'lik DEPC'li su ile hazırlandı. Hacimce %0,1'lik DEPC'li su hazırlamak için 1 mL DEPC (dietil pirokarbonat) son hacmi 1 L olacak şekilde dH₂O içine eklenerek iyice karıştırıldı. 37 °C'de 12 sa. inkübe edildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.12.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için -80 °C'de muhafaza edilen hücre pelletleri buz üzerine alınarak çözüldü ve Thermo Scientific GeneJET™ RNA izolasyon kitinin önerdiği şekilde izolasyon yapıldı. Başlamadan önce lizis tamponuna β-merkaptoetanol (her 1 mL lizis tamponu için 20 µL 14,3 M β-merkaptoetanol) eklendi. Hücre örneğine 600 µL lizis tamponu eklenip 10 sn. vorteks yapıldı. Hücre lizati insülin iğnesinden geçirilerek homojen hale getirildi ve üzerine 360 µL soğuk (%96-100) etanol eklenip pipetaj yapıldı. Etiketlenen saflaştırma kolonuna bu lizattan 700 µL aktarıldı ve kolon 1 dk. 12.000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve hücre lizati tamamen bitene kadar kolona aktarılıp santrifüje devam edildi. Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilip 700 µL yıkama tamponu 1 eklendi ve 1 dk. 12.000 g'de santrifüjlendi. Toplama tüpü boşaltılıp kolona 600 µL yıkama tamponu 2 eklendi ve 1 dk. 12.000 g'de santrifüjlendi. Toplama tüpü boşaltılıp kolona son kez 250 µL yıkama tamponu 2 eklendi ve kolon 2 dk. 12.000 g'de santrifüjlendi. Toplama tüpü son kez boşaltılıp kolon boş olarak 1 dk. 12.000 g'de santrifüj edildi. Kolon steril RNaz-free ependorf tüpe yerleştirildi. Kolona 40-45 µL steril dH₂O eklenerek iki dakika inkübasyona bırakıldı. Kolon 1 dk. 12.000 g'de santrifüj edilerek elüsyon alındı. İzole edilen RNA miktarı belirlendikten sonra örnekler -80 °C'de saklandı.

3.2.12.2 RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometrik 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans ölçümü ile belirlendi. Bu amaçla RNA örneklerinden 2'şer μL ve kör olarak ise 2 μL dH_2O $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ plakaya konuldu. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak RNA miktarı ve saflığı belirlendi [130]. Bu veriler aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı (ng}/\mu\text{L)} = A_{260} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L} \times (10 \text{ mm}/0,49 \text{ mm}) \quad (3.10)$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280} \quad (3.11)$$

3.2.12.3 RNA Formaldehit-Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA'ların kalitesini incelemek için FA agaroz jel elektroforezi yapıldı. RNA örnekleri, RNaz'ların degradasyonuna maruz kaldığından ortam ve malzemelerdeki RNaz'lar inaktive edildi. Bu amaçla, cam malzemeler hacimce %0,1 DEPC'li suda 12 saat bekletildikten sonra otoklavlandı. Ayrıca tank ve aparatları, %0,5 (w/v) SDS solüsyonunda yıkanıp %0,1'lik DEPC'li suyla durulandıktan sonra saf etanolden geçirildi ve etüvde kurumaya bırakıldı. Çalışmada kullanılan çözeltiler Tablo 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.13: Formaldehit agaroz jel elektroferezinde kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşimi ve Hazırlanışı
10X FA Tamponu - 0,2 M MOPS - 0,05 NaAc - 0,01 M EDTA (pH 7,0)	41,9 g MOPS (MW:209,26), 6,8 g NaAc (MW: 136,08) ve 20 mL 0,5 M'lık EDTA (pH 8,0) çözeltisi ~900 mL %0,1'lik DEPC'li suda çözüldü. pH'ı 7,0'ye ayarlanıp son hacim DEPC'li suyla 1 L'ye tamamlandı. Bu çözelti ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında saklandı.
1X FA Tamponu (0,25 M FA içeren)	100 mL 10X FA tamponu ve 20 mL %37'lik (12,3 M) FA karıştırıldı ve son hacim DEPC'li suyla 1 L'ye tamamlandı.

%1'lik formaldehit agaroz jel hazırlamak için 0,5 g agaroz 5 mL 10X FA tamponunda çözüldü ve %0,1'lik DEPC'li suyla 50 mL'ye tamamlandı. Karışım mikrodalgada kaynatılıp 50 °C'ye soğutulduktan sonra %37'lik (12,3 M) formaldehitten 900 μL eklenip karıştırıldı. Jele son konsantrasyonu 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde etidyum bromür (Et-Br) eklendi ve jel, tarakları önceden yerleştirilen elektroferez kasetine döküldü. Polimerleşme sağlandıktan sonra taraklar çıkarıldı ve kaset tanka yerleştirildi. Elektroferez tankı 0,25 M formaldehit içeren 1X FA tamponuyla dolduruldu. Örnekler 2X yükleme boyasıyla

karıştırıldı ve 70 °C’de 10 dakika bekletilerek ısı ile denatüre edildi. Denatüre örnekler buz üzerine soğutulduktan sonra jele yüklendi ve 80 voltta 40 dk. yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğraflandı.

3.2.12.4 Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR tekniğinde, izole edilen RNA’lara, iki basamaklı işlem uygulandı. İlk basamakta RNA’dan cDNA sentezi, Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonuyla gerçekleştirildi. Sonraki basamakta ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ilk basamakta sentezlenen cDNA ve gene özgü primerler kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu yapıldı.

3.2.12.5 Reverse Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu ile cDNA Sentezi

İzole edilen RNA’ların miktarı belirlenip kalite kontrolü yapıldıktan sonra Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonuyla her bir örnekten 1 µg kalıp RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. RT reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve yapılan işlemler Tablo 3.14’de gösterilmiştir. Hazırlanan cDNA’lar -20 °C’de (uzun dönemli -80 °C’de) muhafaza edildi.

Tablo 3.14: RT reaksiyonu bileşenleri ve yapılan işlemler.

Bileşenler	Miktar
Kalıp-RNA	- (1 µg)
Oligo-dT-primer (0,5 µg/µL)	1 µL
dH ₂ O	Son hacim 12,5 µL
▶ Beş dakika 65 °C’de inkübasyon yapıldı.	
▪ <i>İnkübasyon sonunda sırasıyla aşağıdaki bileşenler eklendi.</i>	
Reaksiyon tampon (5X)	4 µL
RiboLock RNaz inhibitör (20 U/µL)	0,5 µL
dNTP karışım (10 mM)	2 µL
Reverse transkriptaz (200 U/µL)	1 µL
Toplam hacim	= 20 µL
▪ <i>Bileşenler nazikçe karıştırıldı ve tüplere kısa süreli santrifüj yapıldı.</i>	
▶ 42 °C’de 60 dk. ve 72 °C’de 10 dk. inkübasyon yapıldı.	

3.2.12.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cDNA Kalite Kontrolü

Reverse Transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile sentezlenen cDNA’ların ve gene özgü ekspresyon primerlerinin kullanıldığı PCR gerçekleştirildi. Çalışmada Tablo 3.15’de verilen PSMD4 genine özgü ekspresyon primerleri ve iç kontrol (normalizasyon) amaçlı kullanılan insan beta-2-mikroglobulin (Hβ-2-M) geni ekspresyon primerleri kullanılarak

PCR yapıldı. PCR’da kullanılan bileşenler Tablo 3.16’da ve döngü şartları Tablo 3.17’de verilmektedir. PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi.

Tablo 3.15: PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleri.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5’→3’)	%GC	T _m	Ürün
PSMD4 ileri	GAAGGTGGCAAGATGGTGTGGAAA	48	56 °C	380 bç
PSMD4 geri	TCCTTCTCATTGTCCTCCACTGGGCT	53,8		
H β -2-M ileri	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC	55	60 °C	315 bç
H β -2-M geri	CATGTCTCGATCCCACTTAACT	45,5		

Tablo 3.16: PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerlerinin PCR bileşenleri.

Bileşenler	▼ PSMD4 Primerleri ▼ (*100 pmol/ μ L stoktan)	▼ H β -2-M Primerleri ▼ (*50 pmol/ μ L stoktan)
	Miktar	Miktar
cDNA	1 μ L	1 μ L
dNTP karışım (10 mM)	1 μ L	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L	2 μ L
Taq tamponu (10X)	5 μ L	5 μ L
İleri primer*	1 μ L	1 μ L
Geri primer*	1 μ L	1 μ L
dH ₂ O	38,5 μ L	38,5 μ L
Taq polimeraz (5 U/ μ L)	0,5 μ L	0,5 μ L
Toplam	= 50 μ L	= 50 μ L

Tablo 3.17: PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerlerinin PCR döngü şartları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	2 dk.
		94 °C	1 dk.
2	30	58 °C	30 sn.
		72 °C	30 sn.
3	1	72 °C	10 dk.

3.2.12.7 Real-Time PCR

Çalışmada genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesini kantitatif olarak belirlemek amacıyla real-time PCR yapıldı. Sentezlenen (bk. 3.2.12.4) cDNA’ların her birine en az 3 tekrarlı olacak şekilde PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleri (bk. Tablo 3.15)

kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi. Bu amaçla Tablo 3.18’de bileşenleri verilen şekilde hazırlanan örnekler 96 kuyucuklu beyaz plakaya hava kabarcığı kalmayacak şekilde konuldu. Daha sonra plakanın üzeri saydam jelatin ile iyice kapatıldı. Tablo 3.19’da verilen döngü koşullarında Light Cycler® 480 (Roche) cihazı kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3.18: Real-time PCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar (µL)
cDNA	1
RealQ Plus 2X Master Mix Green	6,25
İleri primer (10 pmol/µL)	0,5
Geri primer (10 pmol/µL)	0,5
dH ₂ O	4,25
Toplam	= 12,5 µL

Tablo 3.19: Real-time PCR döngü şartları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	1	95 °C	10 dk.
Amplifikasyon	40	95 °C	30 sn.
		55 °C	30 sn.
		72 °C	30 sn.
Erime Eğrisi	1	95 °C	5 sn.
		65 °C	1 dk.
Soğutma	1	40°C	30 sn.

Elde edilen sonuçlar Livak [137] yöntemine göre analiz edildi. En az 3’er tekrarlı çalışılan PSMD4 geni ve normalizasyon (iç kontrol) amaçlı H β -2-M geninin Ct (Cycle threshold) değerlerinin ortalamaları hesaplandı. H β -2-M geni Ct ortalamasından PSMD4 geni Ct ortalaması çıkartıldı ve sonuç değerinin 2 tabanındaki kuvveti alındı. Çalışmada kontrol olarak kullanılan gruplar kendine bölündü ve “1” birim kabul edildi. Deney grupları ise kontrol grubu sonucuna bölünerek 1’in katları şeklinde değerler hesaplandı. Bu sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip analiz edildi.

Çalışmada ayrıca EMT (Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm) ve apoptoz süreçleriyle ilişkili genlerin (bk. Tablo 3.20) ekspresyon primerleri kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi.

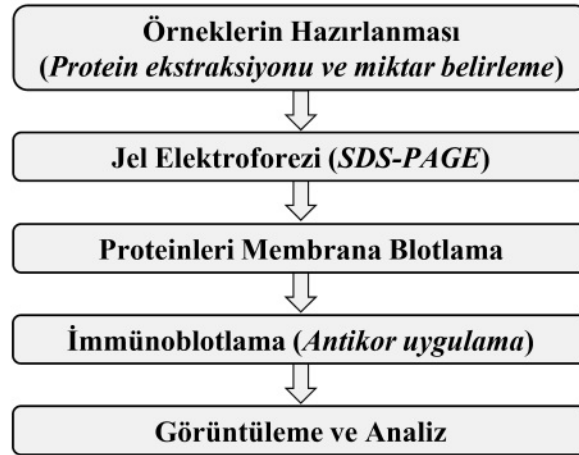
Tablo 3.20: EMT ve apoptoz süreçleriyle ilişkili genlerin ekspresyon primerleri.

Genler	Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5'→3')	%GC	T _m (°C)
EMT ilişkili	E-Cadherin İleri	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG	52,2	57
	E-Cadherin Geri	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG	54,5	56
	Vimentin İleri	AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA	54,5	56
	Vimentin Geri	ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT	54,5	56
	Twist İleri	GCCAGGTACATCGACTTCCTCT	54,5	56
	Twist Geri	TCCATCCTCCAGACCGAGAAGG	59,1	58
	Osteopontin İleri	CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG	47,8	55
	Osteopontin Geri	GCACCATTCAACTCCTCGCTTTC	52,7	57
Apoptoz ilişkili	Bax İleri	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	45	50
	Bax Geri	TCCTCTGCAGCTCCATGTTA	50	52
	Bcl-2 İleri	GAGGATTGTGGCCTTCTTTG	50	52
	Bcl-2 Geri	ACAGTTCCACAAAGGCATCC	50	52

3.2.13 Protein ile İlgili Teknikler

3.2.13.1 Western Blot Yöntemi ile Protein Analizi

Çalışmada genlerin protein düzeyindeki ekspresyon seviyesini belirlemek için Western blot yöntemi kullanıldı. Bu tekniğin akış şeması Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9: Western blot yönteminin akış şeması.

Western blot yöntemiyle protein analizi çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve bileşimleri Tablo 3.21'de verilmektedir.

Tablo 3.21: Western blot analizinde kullanılan çözeltiler.

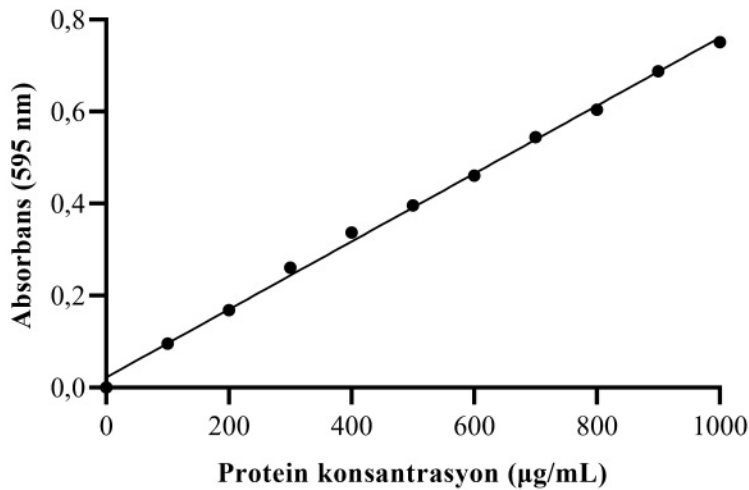
Çözelti	Bileşimi - Hazırlanışı
RIPA Tamponu	Son konsantrasyonunda; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %0,1 (w/v) sodyum deoksikolat, %0,1 (w/v) SDS ve %1 (v/v) Triton X-100 bulunan çözelti hazırlanır. Son hacmine göre proteaz inhibitörü eklendi ve 15 mL'lik falkonlara paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.
Bradford Reaktifi	0,1 g Coomassie brilliant blue (G-250), 50 mL %95'lik etil alkol içinde çözüldü ve 100 mL %85 (w/v) fosforik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacim dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti iki kez filtre kağıdından geçirilip ışık almayan bir şişede +4°C'de saklandı.
Ayrırma (Alt) Jel Tamponu	% 0,4 (w/v) SDS içeren 1,5 M Tris-base (pH 8,8): 18,17 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS ~80 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 8,8'e ayarlanıp hacim 100 mL tamamlandı. +4°C'de saklandı.
Yığıma (Üst) Jel Tamponu	% 0,4 (w/v) SDS içeren 0,5 M Tris-base (pH 6,8): 6 g Tris-base (MW:121,14) ve 0,4 g SDS ~80 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 6,8'e ayarlanıp hacim 100 mL tamamlandı. +4°C'de saklandı.
Yürütme Stok Tamponu (10X)	0,25 M Tris-base ve 1,92 M glisin içeren çözelti (pH 8,3): 30,3 g Tris-base (MW:121,14) ve 144,4 g glisin (MW:75,07) ~700 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 8,3'e ayarlanıp son hacmi 1 L'ye tamamlandı.
%10 (w/v) SDS Çözeltisi	10 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) dH ₂ O'da çözülerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
Yürütme Tamponu (1X)	100 mL 10X yürütme stok tamponu ve 10 mL %10 (w/v) SDS çözeltisi karıştırılıp hacim 1 L'ye tamamlandı. Son konsantrasyon: 25 mM Tris-base, 92 mM glisin ve %0,1 SDS (w/v) (pH 8,3).
Transfer Tamponu	100 mL 10X yürütme stok tamponu, 200 mL metanol ile karıştırılıp son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı. Çözeltiye 500 µL %10 (w/v) SDS eklendi ve -20 °C'de soğutulularak kullanıldı.
10X Stok TBS (Tris-Buffered Saline)	0,2 M Tris-base ve 1,5 M NaCl içeren çözelti (pH 7,5): 24,22 g Tris-base (MW:121,14) ve 87,66 g NaCl (MW:58,44) ~ 700 mL dH ₂ O'da çözüldü. pH 7,5'e ayarlanıp son hacim 1 L'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.
1X TBST Çözeltisi	1X TBS'de %0,1 (v/v) Tween-20 içeren çözelti: 100 mL 10X stok TBS ile 1 mL Tween-20 karıştırdı ve son hacim dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı.
Bloklama Tamponu	%5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBST: 50 mL 1X TBST çözeltisi içinde 2,5 g yağsız süt tozu çözünerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
Jel Boyama Çözeltisi	0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, 50 mL metanolde çözüldü ve 10 mL asetik asit eklenerek karıştırıldı. Son hacmi dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlandı.
Jelden Boya Giderici Çözelti	Hacimce; %5 metanol, %7,5 asetik asit ve %87,5 dH ₂ O ile hazırlandı.
Ponceau Boyası	0,1 g ponceau-S, 100 mL % 5 (v/v) asetik asit çözeltisinde çözüldü.

3.2.13.2 Hüresel Proteinlerin Ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilen hücre pelletleri buz üzerine alınarak çözüldü. Protein degradasyonunu engellemek için tüm işlemler ya buz üzerinde ya da +4 °C'de gerçekleştirildi. Başlamadan önce -20 °C'de saklanan RIPA tamponu (bk. Tablo 3.21) +4 °C'de bekletilerek eritildi. Miktarı kullanılacak hücre sayısına göre optimize edilen RIPA tamponu, ependorf tüpteki pellet üzerine eklendi ve hücreler pipetajla süspansiyon edildi. Tüplere, ultrasonik su banyosunda buzlu su üzerinde, 30-60 sn. sonikasyon yapılarak lizise devam edildi. Hücre lizati, horizontal çalkalayıcıda buz üzerinde 15 dk. inkübe edildikten sonra 13.500 rpm'de (+4 °C'de) on dk. santrifüjlendi. Sonrasında süpernatant, soğutulmuş ependorf tüpe dikkatlice alındı ve örnekteki protein miktarı belirlendi. Örnekler -80 °C'de saklandı.

3.2.13.3 Proteinlerin Kantitatif Belirlenmesi

Örneklerdeki protein miktarı Bradford yöntemiyle kantitatif olarak belirlendi [138]. Tablo 3.21'de belirtildiği şekilde hazırlanan Bradford reaktifi ve bir seri (100-1000 µg/mL) BSA standart çözeltisi kullanılarak standart eğri hazırlandı. Bu amaçla standart BSA çözeltilerinin her birinden, 96 kuyucuklu plakaya en az 3 tekrarlı olacak şekilde, 5'er µL konuldu. Ayrıca 5 µL dH₂O kör olarak konuldu. Protein miktarı belirlenecek örneklerden ise 5'er µL koyuldu. Daha sonra her bir kuyucuğun üzerine 250 µL Bradford reaktifi eklendi ve 10 dk. karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede, 595 nm dalga boyunda, absorbans ölçüldü. Standart BSA çözeltilerindeki protein miktarına karşılık gelen absorbans değerlerine göre standart eğri oluşturuldu (bk. Şekil 3.10). Standart eğri üzerinden örneklerin absorbansına karşılık gelen protein miktarı belirlendi.



Şekil 3.10: Bradford yöntemi BSA standart eğrisi.

3.2.13.4 SDS-PAGE

Çalışmada hücrelerden ekstrakte edilen proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayırmak için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) kullanıldı. SDS-PAGE tekniği negatif yüklü proteinlerin elektrik alanı varlığında poliakrilamid jelde yürütülmesi esasına dayanır. Bu amaçla öncelikle Tablo 3.21’de verilen çözeltiler hazırlandı ve çalışmada kullanılacak aparat ve cam malzemeler dH₂O ile yıkanıp %70’lik etanol ile temizlendi. Cam levhalar kurularak jel döküm standına yerleştirildi ve jel dökmeye hazır hale getirildi.

SDS-PAGE çalışmasında farklı oranlara sahip (%10’luk ayırma jeli ve %4’lük yığma jeli) jeller hazırlandı ve kesintili olarak döküldü. Öncelikle bileşenleri Tablo 3.22’de verilen %10’luk ayırma jeli (alt jel) hazırlanarak üstten 2-3 cm boşluk kalana kadar cam levhaların arasına hava kabarcığı oluşturmada döküldü. Hemen ardından jel yüzeyinin düzgün oluşması için %90’lık izopropanol (veya dH₂O) eklendi. Jel, polimerize olması için 30 dk. bekletildikten sonra yüzeyindeki izopropanol dikkatle döküldü ve kurutma kağıdı ile ortam kurulandı. Ardından Tablo 3.22’de bileşenleri verilen %4’lük yığma jeli (üst jel) hazırlanarak yığma jelinin üzerine döküldü. Hemen ardından cam levhaların üst kısmına kuyuları oluşturacak tarak dikkatle takıldı. Yığma jeli, polimerleşmesi için 30 dk. bekletildikten sonra tarak dikkatle çıkarıldı ve kuyular dH₂O ve 1X yürütme tamponu ile yıkandı. Cam levhalar jel kasetine yerleştirilip elektrofrez tankına yerleştirildi ve levhaların arası 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.

Tablo 3.22: SDS-PAGE jellerinin bileşenleri ve hazırlanma oranları.

Bileşenler	%10 Ayırma Jeli (2 jel için miktarlar)	%4 Yığma Jeli (2 jel için miktarlar)
Ayırma (Alt) Jel Tamponu	2,5 mL	-
Yığma (Üst) Jel Tamponu	-	2,5 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%40 37.5/1)	2,5 mL	625 µL
dH ₂ O	5 mL	3,05 mL
% 10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Protein miktarı belirlenen örnekler jele yüklemek için hazırlandı. Bu amaçla en az miktarda protein bulunduran örneğin 20 µL’deki miktarı referans alındı ve diğer örnekler de bu miktarda olacak şekilde ependorf tüplere konuldu. Her bir örneğin üzerine 5 µL

yükleme boyası (90 µL ticari 4X Laemmli örnek tamponu ve 10 µL β-merkaptoetanol karıştırılıp hazırlandı) eklendi. Örnekler son hacmi 25 µL olacak şekilde yığıma jel tamponu eklendi. Örneklerdeki proteinler 95 °C’de beş dakika bekletilerek denatüre edildi. Jeldeki ilk kuyuya 5 µL büyüklük belirteci (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) yüklendi. Diğer kuyulara ise boyanıp denatüre edilen protein örnekleri yüklendi. Elektroforez tankının alt kısmına kullanılan jel sayısına göre 1X yürütme tamponu konuldu. Jeldeki örnekler ilk olarak 90 voltta 15 dk. (mavi örnek çizgisi ayırma jeline gelene kadar) daha sonra 120 voltta 1,5-2 sa. (mavi örnek çizgisi ayırma jeli tabanına 1 cm gelene kadar) yürütüldü.

3.2.13.5 SDS Jeldeki Proteinlerin Membrana Blotlanması

SDS jelindeki proteinlerin transferi için Bio-Rad Trans Blot sistemi ve PVDF (Millipore™) membran kullanıldı. SDS-PAGE işleminin hemen ardından cam levhaların arasındaki jel çıkarılıp yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan ayırma jeli, dengelenmesi için soğuk transfer tamponu (bk. Tablo 3.21) içinde 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Ayrıca transferde kullanılan aparat, kağıt (Whatman 3 MM) ve süngerler de transfer tamponunda bekletildi. Ayırma jeli ile aynı boyutta (8,5 x 5,2 cm) kesilen PVDF membran 1 dk metanolde bekletilip aktive edildi ve soğuk transfer tamponuna alındı. Daha sonra sandviç hazırlama işlemine geçildi. Bu amaçla transfer kaseti arasına (-) kutuptan başlayarak (siyah tabanın üstüne) sırasıyla, sünger-kağıt-jel-membran-kağıt-sünger olacak şekilde yerleştirildi. İşlem sırasında hava kabarcığı kalmaması için silindirik aparatla katmanların üzerinden geçildi. Sandviç transfer kasetine dikkatle sıkıştırıldıktan sonra soğuk transfer tamponuyla dolu olan tanka yerleştirildi ve + 4 °C’de 1 gece (16 sa.) 15 voltta elektroforetik transfere bırakıldı.

3.2.13.6 Proteinlere Antikor Uygulanması (İmmünoblotlama)

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membran spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloklandı. Bu amaçla membran, 20 mL bloklama tamponu (bk. Tablo 3.21) içinde oda sıcaklığında 1 sa. horizontal çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra bloklama tamponu uzaklaştırıldı ve membran 5’er dakikalık sürelerle üç kez 1X TBST (bk. Tablo 3.21) ile yıkandı. Membranın PSMD4 ve β-aktin proteinlerini içeren kısımları ayrı ayrı primer antikorlarla (bloklama tamponunda seyreltilen 1/1000 PSMD4 antikor ve 1/5000 β-aktin antikor) +4 °C’de 1 gece döner hareketli çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran 5’er dakikalık sürelerle üç kez 1X TBST ile yıkandı ve sekonder antikorla

(1/5000 mouse β -aktin antikoru) 1 sa. oda sıcaklığında döner hareketli çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran son olarak 5'er dakikalık sürelerle üç kez 1X TBST ile yıkandı ve görüntülemeye geçildi.

3.2.13.7 Görüntüleme ve Analiz

Spesifik antikorlarla bağlanarak işaretlenmiş membrandaki proteinleri görüntülemek için (PierceTM) ECL Western blot substratı kullanıldı. Üreticinin önerdiği şekilde hazırlanan ECL substrat ile membran muamele edilip 1 dk. karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından membran UVP BioSpectrumTM görüntüleme sisteminde görüntülenip fotoğraflandı.

Membran fotoğraflarındaki protein bantları, ImageJ programında densitometrik olarak analiz edildi [135]. Deney ve kontrol gruplarında normalizasyon amacıyla β -aktin proteini de çalışıldı. PSMD4 ve β -aktin analiz sonuçları oranlanarak GraphPad programında grafiklendirildi.

3.2.14 İstatistiksel Analiz

Tekrarlı çalışılan deney verileri GraphPad (v9.4.1.681) programında one-way ANOVA testiyle analiz edildi ve p değeri 0,05 küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [139]. Kıyaslanan grupların p değeri grafik üzerinde asteriks (*) ile işaretlendi. Eğer $p < 0,05$ ise (*) ile, $p < 0,01$ ise (**) ve $p < 0,001$ ise (***) ile gösterildi.

4. BULGULAR

4.1 Alt Klonlama Çalışmaları

4.1.1 Klonlama Primeri Tasarımı

PSMD4 geni, insanda 1. kromozomun uzun (q) kolunun 21.3 lokasyonunda bulunmaktadır. NCBI veri tabanında kaydedilmiş 2 farklı varyantı bulunmaktadır (bk. EK A.1 ve A.2).

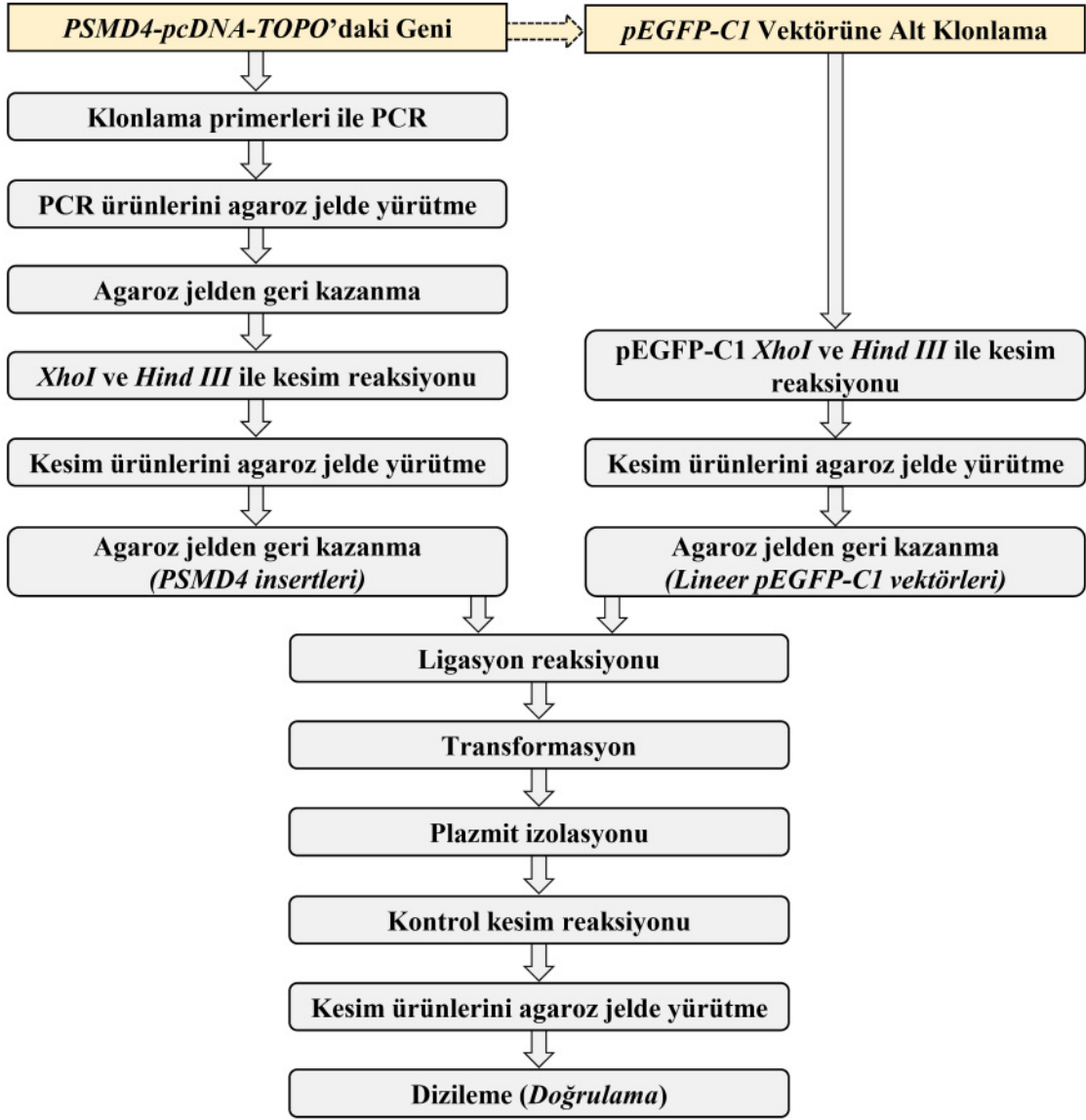
PSMD4 geninin pEGFP-C1 vektörüne klonlanması amacıyla genin, transkript varyant 2 (NM_002810.4) mRNA nükleotit dizisi kullanılarak Bölüm 3.2.3.2’de belirtildiği gibi primerler tasarlandı. Öncelikle ilgili gen bölgesinin restriksiyon haritalaması yapılarak (bk. EK C) geni kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlendi. pEGFP-C1 vektörünün kesim bölgesinde bulunan ancak gen dizisini kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlendi. Bu enzimlerin hedef dizileri okuma çerçevesini kaydırmayacak şekilde primer dizilerine yerleştirildi. Tablo 4.1’de gösterilen ileri klonlama primerine *XhoI* kesim bölgesi, geri primerine ise *HindIII* kesim bölgesi eklenmiştir. Ayrıca primerlerin T_m, saç tokası, %GC ve NCBI analizleri yapılarak uygunluğu kontrol edilmiştir.

Tablo 4.1: PSMD4 klonlama primerleri.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5’→3’)	%GC	T _m
İleri klonlama	AACTCGAGAGATGGTGGTGGAAAGCA <i>XhoI</i> kesim bölgesi; 5’...C [↓] TCGAG...3’	46	76 °C
Geri klonlama	AAAAGCTTTCACCTTCTGTCTTCCTC <i>HindIII</i> kesim bölgesi; 5’... A [↓] AGCTTT...3’	38	72 °C

4.1.2 PSMD4 Genini pEGFP-C1 Vektörüne Alt Klonlama

Deneysel çalışmada, floresan metod ile PSMD4 geni proteinlerinin over ekspresyonunun ve hücresel lokalizasyonunun belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaca uygun olarak pcDNA-3.3 TOPO vektöründeki PSMD4 geni, alt klonlama ile pEGFP-C1 vektörüne aktarıldı. Alt klonlama çalışmasının basamaklarını özetleyen akış diyagramı Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



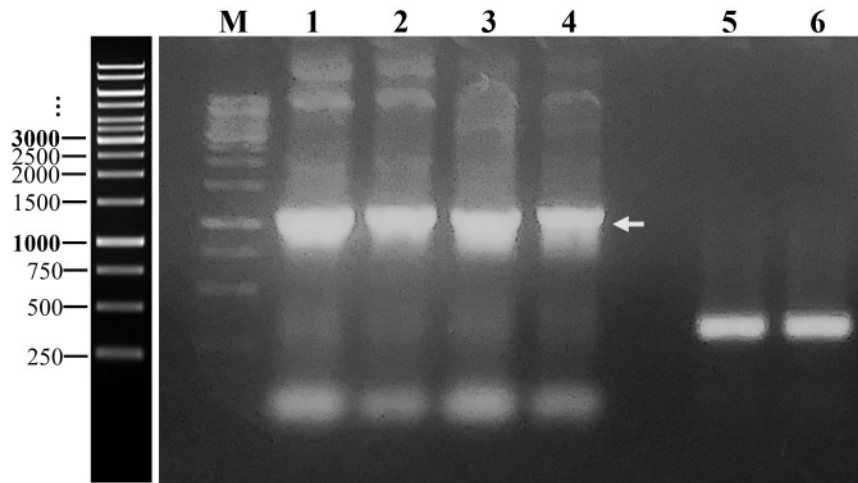
Şekil 4.1: PSMD4-pcDNA-3.3-TOPO vektöründeki geni pEGFP-C1 vektörüne alt klonlama basamakları.

Öncelikle PSMD4 genini içeren plazmit ve Bölüm 4.1.1 belirtilen şekilde tasarlanan primerler kullanılarak Bölüm 3.2.3.3’de açıklandığı gibi PCR gerçekleştirildi. PCR bileşenleri Tablo 4.2’de, döngü koşulları Tablo 3.4’de verilmektedir. Pozitif kontrol olarak H β -2-M geni primerleri kullanıldı.

Tablo 4.2: PSMD4 geni alt klonlama PCR bileşenleri.

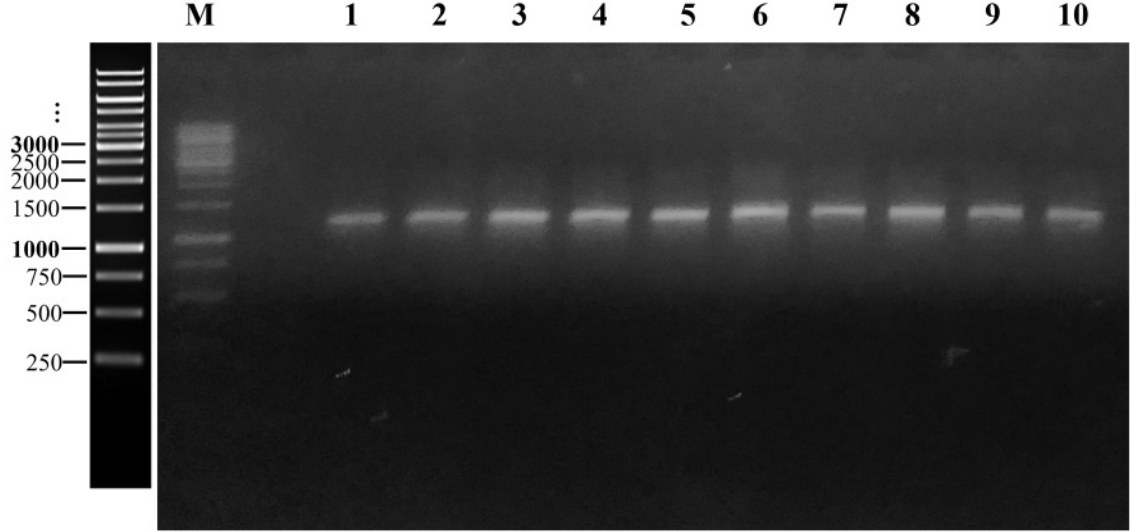
Bileşenler	▼ PSMD4 Klonlama Primerleri (*100 pmol/μL stoktan)	▼ Hβ-2-M Primerleri (*50 pmol/μL stoktan)
	Miktar	Miktar
Kalıp DNA	1 μL	1 μL
dNTP karışım (10 mM)	1 μL	1 μL
MgCl ₂ (25 mM)	2 μL	2 μL
Taq tamponu (10X)	5 μL	5 μL
İleri primer*	1 μL	1 μL
Geri primer*	1 μL	1 μL
dH ₂ O	38,5 μL	38,5 μL
Taq polimeraz (5 U/μL)	0,5 μL	0,5 μL
Toplam	= 50 μL	= 50 μL

PCR ürünleri Bölüm 3.2.3.4’de belirtildiği gibi DNA agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğraflandı (bk. Şekil 4.1).

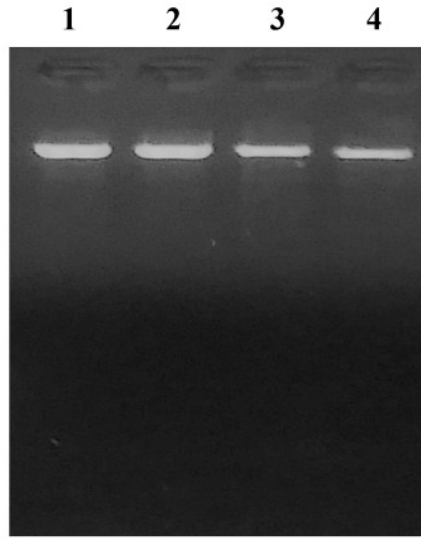


Şekil 4.2: Klonlama PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
(M: marker, 1-4 PSMD4 geni, 5-6 pozitif kontrol)

Şekil 4.2’de görülen 1, 2, 3 ve 4 numaralı okla işaretlenmiş ~ 1150 bp’lik parlak bantlar (Bölüm 3.2.3.5’de açıklandığı şekilde) agaroz jelden geri kazanıldı. Geri kazanılan ürünlere Bölüm 3.2.3.6’da açıklandığı gibi restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı. Kesim reaksiyonunda *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ve optimum çalıştıkları ortak tampon kullanıldı. Benzer şekilde pEGFP-C1 vektörü de *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer hale getirildi. Her iki kesimin ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV altında görüntülenerek fotoğraflandı (bk. Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3: Klonlama PCR kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
(M: 1 kb marker, 1-10: kesim ürünleri)

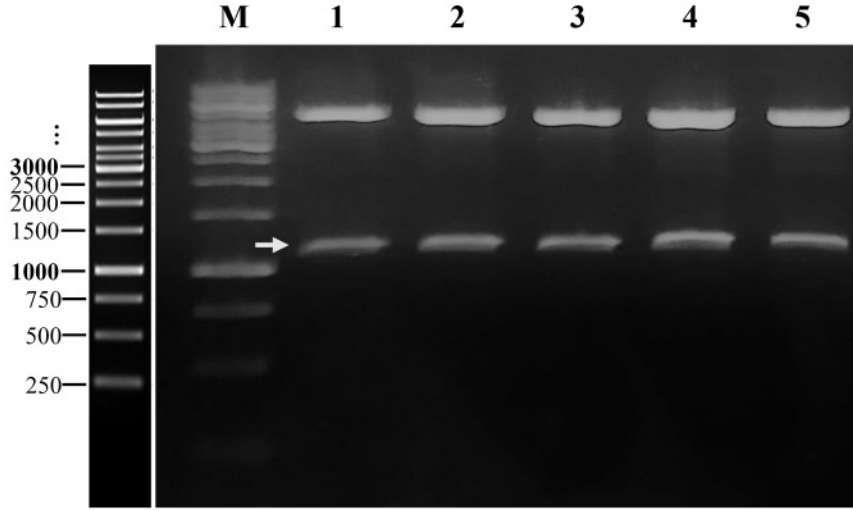


Şekil 4.4: pEGFP-C1 vektörü kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Şekil 4.3’de görülen 1-10 numaralı bantlar, Bölüm 3.2.3.5’de açıklandığı şekilde agaroz jelden geri kazanılarak PSMD4 insertleri elde edildi. Benzer şekilde Şekil 4.4’deki 1-4 numaralı pEGFP-C1 vektörü kesim ürünleri de jelden geri kazanılarak lineer vektör elde edildi.

Bölüm 3.2.3.7’de belirtildiği gibi PSMD4 insertlerini lineer hale getirilen pEGFP-C1 vektörüne bağlamak için ligasyon kuruldu. Ligasyon ortamı bileşenleri Tablo 3.6’da

gösterilmektedir. 1 gece (16 sa.) +16 °C'de inkübasyondan sonra Bölüm 3.2.2.3'de açıklandığı gibi ligasyon ürünleri kompetent hücrelere transforme edildi. Transformasyondan sonra gözlenen kolonilerin olası rekombinant olanları araştırıldı. Bu amaçla bu kolonilerden ön kültür hazırlanıp plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu plazmitlere *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kuruldu ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi (bk. Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Alt klonlama kontrolü için restriksiyon kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, 1-5. koloni kesim ürünleri)

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi tüm kolonilerden izole edilen plazmitlerin restriksiyon kesimi sonucu PSMD4 geni büyüklüğüne (1134 bp) yakın bantlar elde edildi ve kolonilerin rekombinant plazmidi taşıdığı doğrulandı. Ayrıca plazmitler ilave doğrulamalar için Sentebiolab firmasına dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları Bioedit programında hizalandı ve PSMD4 dizisiyle blast yapılarak karşılaştırıldı (bk. EK D).

Rekombinant olduğu doğrulanan koloniden Bölüm 3.2.2.4'de belirtildiği şekilde gliserol stok hazırlandı ve bu stoklar -80 °C'de muhafaza edildi. Ayrıca bu stoklardan transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere büyük ölçekte plazmit izolasyonu (bk. Bölüm 3.2.2.7) yapıldı. İzole edilen plazmitler restriksiyon endonükleaz kesimiyle tekrar doğrulandı ve -20 °C'de saklandı.

4.2 Yönlendirilmiş Mutageniz Çalışmaları

4.2.1 Yönlendirilmiş Mutageniz için Primer Tasarımı

Gen bankalarında insan PSMD4 geni tarandığında bu genin iki farklı transkript varyantı olduğu görülmektedir. Varyant 2 (PSMD4) 377 amino asitlik izoform 2 proteinini, varyant 1 (angiosidin) ise 380 amino asitlik izoform 1 proteinini kodlamaktadır. Bu varyantların mRNA-nükleotit ve protein-amino asit dizileri EK A.1 ve A.2’de verilmiştir. PSMD4 ve angiosidin gen dizileri karşılaştırıldığında (bk. EK B); angiosidin, PSMD4 geninden 9 nükleotitlik (5’...-AGGTGAAAG-...3’) fazlalık bölge içermektedir.

Çalışmada, PSMD4 geninden mutageniz ile angiosidin genini elde etmek için 9 nükleotitlik (5’-AGGTGAAAG-3’) bölgeyi içeren Tablo 4.3’de gösterilen primerler tasarlandı. Bu primerlerin T_m, saç tokası, %GC ve NCBI analizleri yapılarak uygunluğu kontrol edildi.

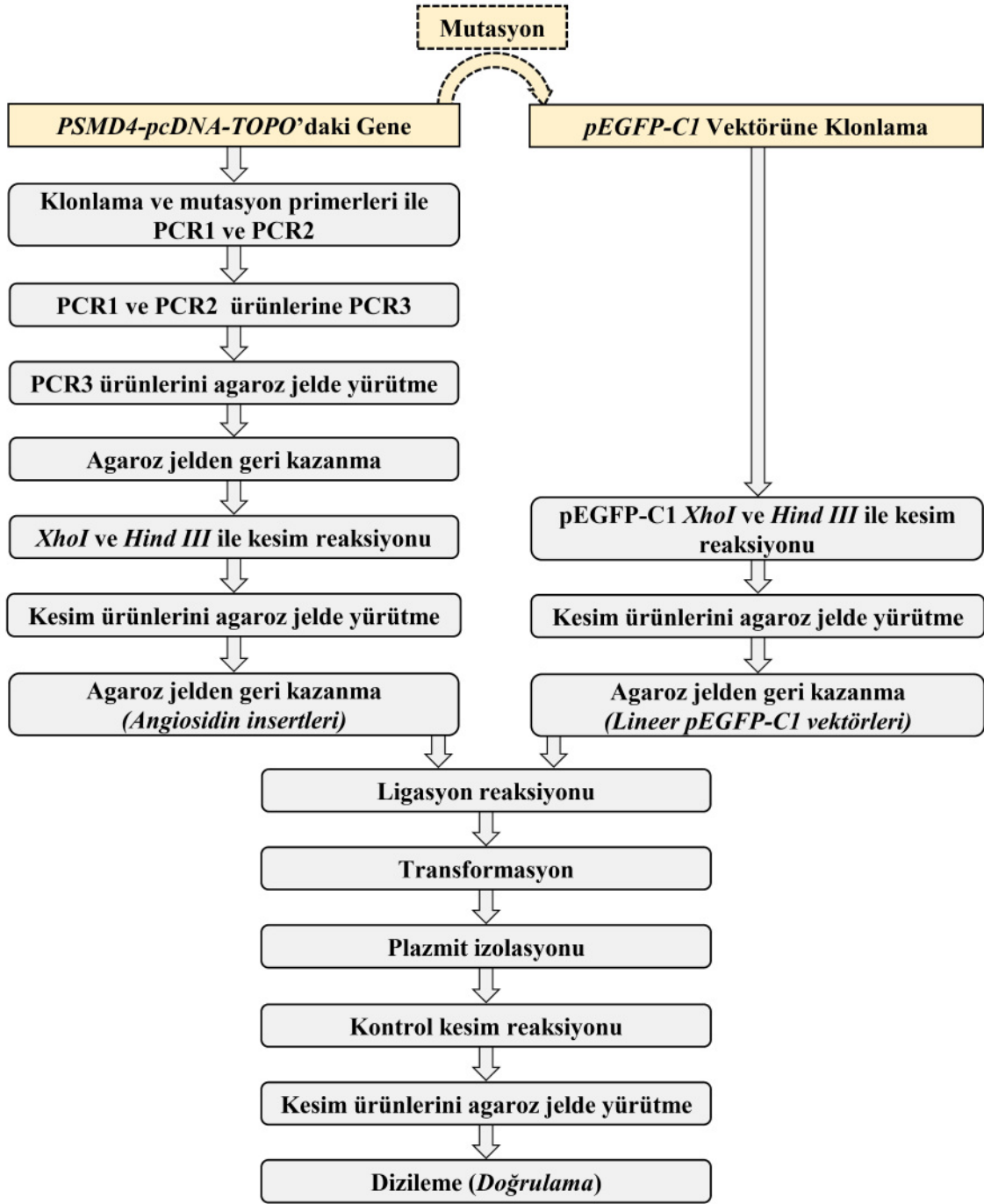
Tablo 4.3: Mutageniz primerleri.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi (5’→3’)	%GC	T _m
İleri mutasyon	TGGGACTGAAGGTGAAAGAGACTCAGACG	52	88 °C
Geri mutasyon	CGTCTGAGTCTCTTTCACCTTCAGTCCCA	52	88 °C

4.2.2 Angiosidin Genini Mutageniz ile Elde Ederek pEGFP-C1 Vektörüne Klonlama

Mutageniz çalışmalarında ilk olarak Stratagene QuickChange™ Site-Directed mutageniz kiti modifiye edilerek kullanıldı ancak istenilen mutant gen ürünü elde edilemedi. Daha sonraki çalışmalara farklı bir strateji olan PCR tabanlı mutageniz ile devam edildi [131].

PCR tabanlı mutageniz ve devamındaki klonlama çalışmasının basamaklarını özetleyen akış diyagramı Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6: PSMD4-pcDNA-3.3-TOPO vektöründeki PSMD4 geninin mutasyona uğratılarak pEGFP- C1 vektörüne alt klonlanmasının basamakları.

PCR tabanlı mutagenез çalışmasında Bölüm 3.2.3.8’de belirtildiği farklı amaçlarla üç PCR gerçekleştirildi. Öncelikle PSMD4 geninin kalıp olarak kullanıldığı, geri mutasyon ve ileri klonlama primerleriyle PCR1 ve ileri mutasyon ve geri klonlama primerleriyle PCR2 gerçekleştirildi. PCR1 ve PCR2 bileşenleri Tablo 4.4’de, döngü koşulları ise Tablo 4.5’de verilmektedir. Pozitif kontrol olarak H β -2-M geni primerleri kullanılmıştır.

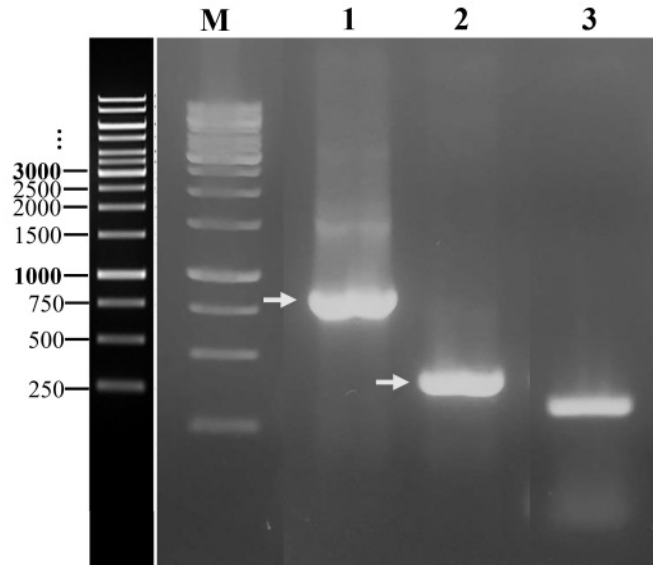
Tablo 4.4: PCR1 ve PCR2 bileşenleri.

Bileşenler	▼ PCR1 ▼	▼ PCR2 ▼
	(*İleri klonlama ve geri mutasyon primeleri ile)	(*Geri klonlama ve ileri mutasyon primeleri ile)
	Miktar	Miktar
Kalıp DNA (50 ng/μL)	1,5 μL	1,5 μL
dNTP karışım (10 mM)	1 μL	1 μL
MgCl ₂ (25 mM)	2 μL	2 μL
Taq tamponu (10X)	5 μL	5 μL
İleri primer*	1 μL	1 μL
Geri primer*	1 μL	1 μL
dH ₂ O	38 μL	38 μL
Taq polimeraz (5 U/μL)	0,5 μL	0,5 μL
Toplam	= 50 μL	= 50 μL

Tablo 4.5: PCR1 ve PCR2 döngü şartları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	3 dk.
2	30	94 °C	1 dk.
		55 °C	1 dk.
		72 °C	1 dk.
3	1	72 °C	10 dk.

PCR1 ve PCR2 ürünleri Bölüm 3.2.3.4’de belirtildiği gibi DNA agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğraflandı (bk. Şekil 4.7).



Şekil 4.7: PCR1 ve PCR2 ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
(M: marker, 1: PCR1, 2: PCR2, 3: pozitif kontrol)

Kullanılan primere göre; PCR1’de 793 nükleotitlik hedef bölgenin, PCR2’de ise 400 nükleotitlik hedef bölgenin çoğalması gerektiği biyoinformatik analizle belirlendi (bk. EK E). Şekil 4.7’de görülen PCR1 ve PCR2 bantlarının çoğalması hedeflenen bölgelerle uyum gösterdiği tespit edilmiştir.

PCR1 ve PCR2 ürünlerinin kalıp olarak kullanıldığı PCR3 gerçekleştirildi. PCR3 bileşenleri Tablo 4.6’da ve döngü koşulları ise Tablo 4.7’de verilmiştir. Pozitif kontrol olarak H β -2-M primerleri kullanıldı.

Tablo 4.6: PCR3 bileşenleri.

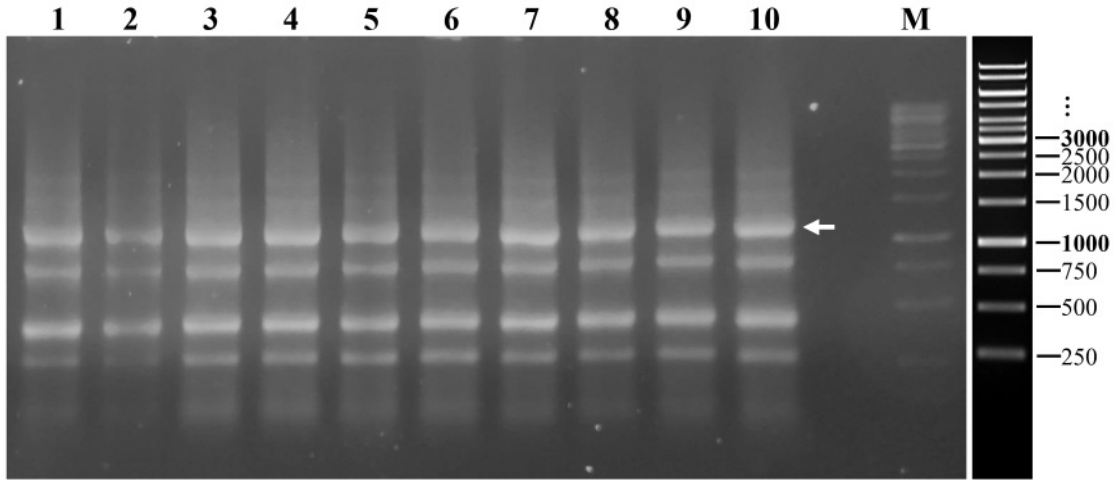
▼ PCR3 ▼ (X 5 Tüp) (*İleri ve geri klonlama primeleri ile)	
Bileşenler	Miktar
PCR1 ürünü	1 μ L
PCR2 ürünü	1 μ L
dNTP karışım (10 mM)	1 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ L
Taq tamponu (10X)	5 μ L
İleri primer*	1 μ L
Geri primer*	1 μ L
dH ₂ O	37,5 μ L
Taq polimeraz (5 U/ μ L)	0,5 μ L
Toplam	= 50 μL

Tablo 4.7: PCR3 döngü şartları.

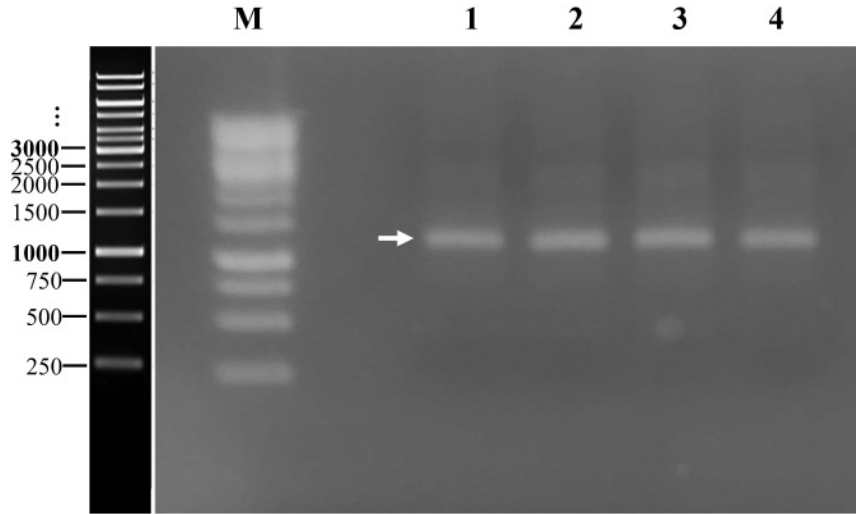
Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 °C	3 dk.
2	30	94 °C 55 °C 72 °C	30 sn. 1 dk. 1 dk.
3	1	72 °C	10 dk.

PCR3 ürünleri Bölüm 3.2.3.4’de belirtildiği gibi DNA agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jel, UV görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğraflandı. Şekil 4.8’deki 1.-10. kuyular arasındaki ~ 1150 bp büyüklüğündeki ok ile gösterilen parlak bantlar Bölüm 3.2.3.5’de açıklandığı şekilde agaroz jelden geri kazanıldı. Geri kazanılan ürünlere Bölüm 3.2.3.6’da belirtildiği gibi restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı. Kesim reaksiyonunda *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ve optimum çalıştıkları ortak tampon kullanıldı.

Restriksiyon endonükleaz kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve UV altında görüntülenerek fotoğraflandı (bk. Şekil 4.9).



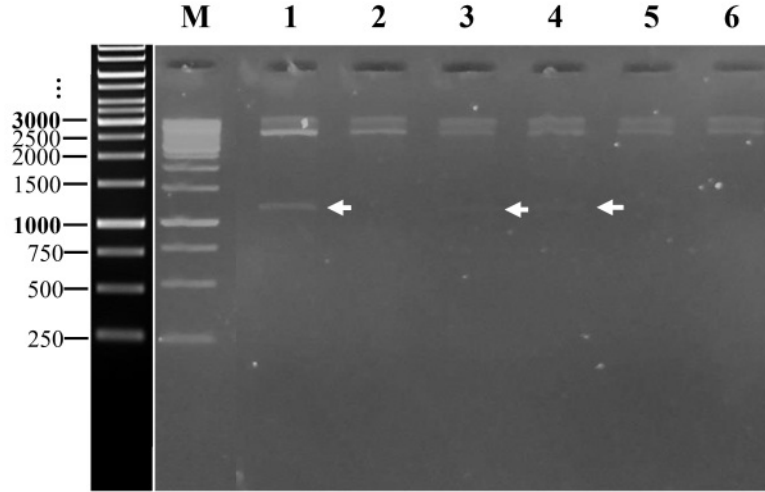
Şekil 4.8: PCR3 ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
(M: 1 kb marker, 1.-10. PCR3 ürünleri)



Şekil 4.9: PCR3 kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
(M: 1 kb marker, 1.-4. PCR3 kesim ürünleri)

Şekil 4.9’de görülen 1.-4. kuyular arasındaki parlak bantlar Bölüm 3.2.3.5’de belirtildiği şekilde agaroz elektroforez jelinden geri kazanılarak olası mutasyonu taşıyan angiosidin insertleri elde edildi. Bölüm 3.2.3.7’de belirtildiği gibi angiosidin insertlerini lineer pEGFP-C1 vektörüne bağlamak için ligasyon kuruldu. Ligasyon ürünleri Bölüm 3.2.2.3’de belirtildiği gibi kompetent hücrelere transforme edildi.

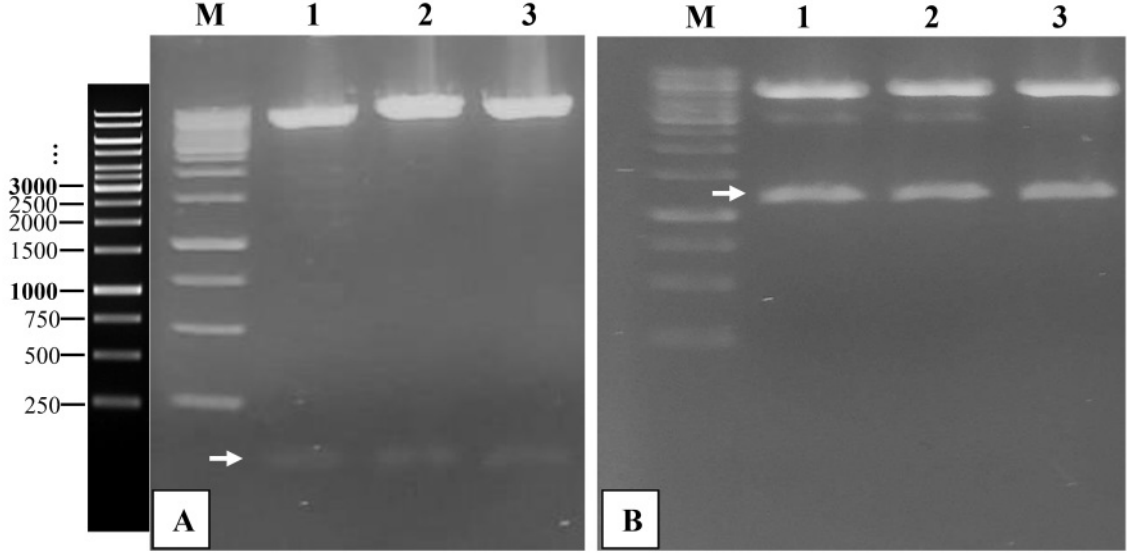
Transformasyondan sonra gözlenen 6 koloninin rekombinant olma durumu araştırıldı. Bu amaçla bu kolonilerden ön kültür hazırlanıp plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu plazmitlere *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kuruldu ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi (bk. Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Mutasyon klonlamasının kontrolü için kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, 1-6. koloni kesim ürünleri)

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 1. 3. ve 4. kolonilerden izole edilen plazmitlerin kesimi sonucu angiosidin geni büyüklüğüne (1143 bp) yakın bantlar elde edildi ve bu kolonilerin rekombinant ve olası mutasyonu taşıdığı düşünüldü.

Klonlamanın doğru pozisyonda gerçekleştiğini kontrol etmek için restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı. Bu amaçla geni 1035 bp'lik bölgesinden kesen *BamHI* restriksiyon enzimi tercih edildi. Bu enzim aynı zamanda genin yerleştiği bölgeden 40 baz çifti uzaklıktaki (vektörün dizisi referans alındığında 1390 bp) bir bölgeden vektörü kesmektedir. Genin 1143 nükleotit dizisi dikkate alındığında eğer klonlama doğru pozisyonda olmuşsa kesim sonucunun yaklaşık 200 baz çiftlik bant göstermesi gerekmektedir. Eğer klonlama yanlış pozisyonda gerçekleşmiş ise yaklaşık 1100 bp'lik bant görülmesi beklenmektedir. 1. 3 ve 4. kolonilerden elde edilen plazmitlere Bölüm 3.2.3.6'da belirtildiği gibi *BamHI* enzimiyle kesim reaksiyonu kuruldu ve kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi (bk. Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Mutasyon klonlaması doğrulanması için kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, sırasıyla 1. 3 ve 4. koloni için; A; BamHI kesim ürünleri, B; XhoI ve HindIII kesim ürünleri)

Şekil 4.11’da (A) da görüldüğü gibi *BamHI* kesim ürünleri yaklaşık 200 bp bölgede bant verdiği için klonlamanın doğru pozisyonda olduğu tespit edilmiştir. Mutasyonun doğrulanması amacıyla 1. koloniden izole edilen plazmitler Sentebiolab firmasına dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları Bioedit programında hizalandı ve PSMD4 gen dizisiyle blast yapılarak mutasyonu taşıdığı tespit edildi (bk. Şekil 4.12).

Rekombinant olan bu kolonilerden Bölüm 3.2.2.4’de açıklandığı gibi gliserol stok hazırlandı ve stoklar -80 °C’de muhafaza edildi. Ayrıca bu stoklardan transfeksiyon çalışmaları için Midi-NucleoBond Xtra™ kiti kullanılarak Bölüm 3.2.2.7’de açıklandığı şekilde büyük ölçekte plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler kesim reaksiyonu ile tekrar doğrulandı ve -20 °C’de saklandı.

PSMD4	53	ATGGAGACTTCTTACCCACCAGGCTGCAGGCCAGCAGGATGCTGTCAACATAGTTTGTC	112
Mut_F	1	ATGGAGACTTCTTACCCACCAGGCTGCAGGCCAGCAGGATGCTGTCAACATAGTTTGTC	60
PSMD4	113	ATTCAAAGACCCGAGCAACCCTGAGAACAACGTGGGCCTTATCACACTGGCTAATGACT	172
Mut_F	61	ATTCAAAGACCCGAGCAACCCTGAGAACAACGTGGGCCTTATCACACTGGCTAATGACT	120
PSMD4	173	GTGAAGTGCTGACCACACTCACCCAGACACTGGCCGTATCCTGTCCAAGCTACATACTG	232
Mut_F	121	GTGAAGTGCTGACCACACTCACCCAGACACTGGCCGTATCCTGTCCAAGCTACATACTG	180
PSMD4	233	TCCAACCCAAGGGCAAGATCACCTTCTGCACGGGCATCCGCGTGGCCCATCTGGCTCTGA	292
Mut_F	181	TCCAACCCAAGGGCAAGATCACCTTCTGCACGGGCATCCGCGTGGCCCATCTGGCTCTGA	240
PSMD4	293	AGCACCGACAAGGCAAGAATCACAAGATGCGCATCATTGCCTTTGTGGGAAGCCAGTGG	352
Mut_F	241	AGCACCGACAAGGCAAGAATCACAAGATGCGCATCATTGCCTTTGTGGGAAGCCAGTAG	300
PSMD4	353	AGGACAATGAGAAGGATCTGGTGAAACTGGCTAAACGCCTCAAGAAGGAGAAAGTAAATG	412
Mut_F	301	AGGACAATGAGAAGGATCTGGTGAAACTGGCTAAACGCCTCAAGAAGGAGAAAGTAAATG	360
PSMD4	413	TTGACATTATCAATTTTGGGGAAGAGGAGGTGAACACAGAAAAGCTGACAGCCTTTGTAA	472
Mut_F	361	TTGACATTATCAATTTTGGGGAAGAGGAGGTGAACACAGAAAAGCTGACAGCCTTTGTAA	420
PSMD4	473	ACACGTTGAATGGCAAAGATGGAACCGGTTCTCATCTGGTGACAGTGCCTCCTGGGCCCA	532
Mut_F	421	ACACGTTGAATGCCAAAGATGGAACCGGTTCTCATCTGGTGACAGTGCCTCCTGGGCCCA	480
PSMD4	533	GTTTGGCTGATGCTCTCATCAGTTCTCCGATTTTGGCTGGTGAAGGTGGTGCCATGCTGG	592
Mut_F	481	GTTTGGCTGATGCTCTCATCAGTTCTCCGATTTTGGCTGGTGAAGGTGGTGCCATGCTGG	540
PSMD4	593	GTCTTGGTGCCAGTGACTTTGAATTTGGAGTAGATCCCAGTGCTGATCCTGAGCTGGCCT	652
Mut_F	541	GTCTTGGTGCCAGTGACTTTGAATTTGGAGTAGATCCCAGTGCTGATCCTGAGCTGGCCT	600
PSMD4	653	TGGCCCTTCGTGTATCTATGGAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGGAGGAGGAGCCGGCGGG	712
Mut_F	601	TGGCCCTTCGTGTATCTATGGAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGGAGGAGGAGCCGGCGGG	660
PSMD4	713	CAGCTGCAGCTTCTGCTGCTGAGGCCGGGATTGCTACGACTGGGACTGA-----AG	763
Mut_F	661	CAGCTGCAGCTTCTGCTGCTGAGGCCGGGATTGCTACGACTGGGACTGAAGGTGAAAGAG	720
PSMD4	764	ACTCAGACGATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCCAGCAAGAGTTTGGCCGCACTGGGC	823
Mut_F	721	ACTCAGACGATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCCAGCAAGAGTTTGGCCGCACTGGGC	780
PSMD4	824	TTCTGACCTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGATTGC-TTATGCCATGCAGATGTCC	882
Mut_F	781	TTCTGACCT-AGCAGTATGACTGAG--AGAGCAGATTGCTTTATGCCATGCAGATGTCC	837
PSMD4	883	CT-GCAGGGAGC-AGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAGACATTGATGCCAGCTCAGCTA	940
Mut_F	838	CTTGCAAGAAGCCAGAGTTTG-C-AGGCGGA-TCAGCAGACAT-GATG-CAGCTCAGCTA	892
PSMD4	941	TGGACACATCTGAGCCAG-CC-AAGGA 965	
Mut_F	893	TGG-CA-ATC-GAGCTAGGCCTAAGGA 916	

Şekil 4.12: Yönlendirilmiş mutagenез dizi sonuçlarının karşılaştırılması.

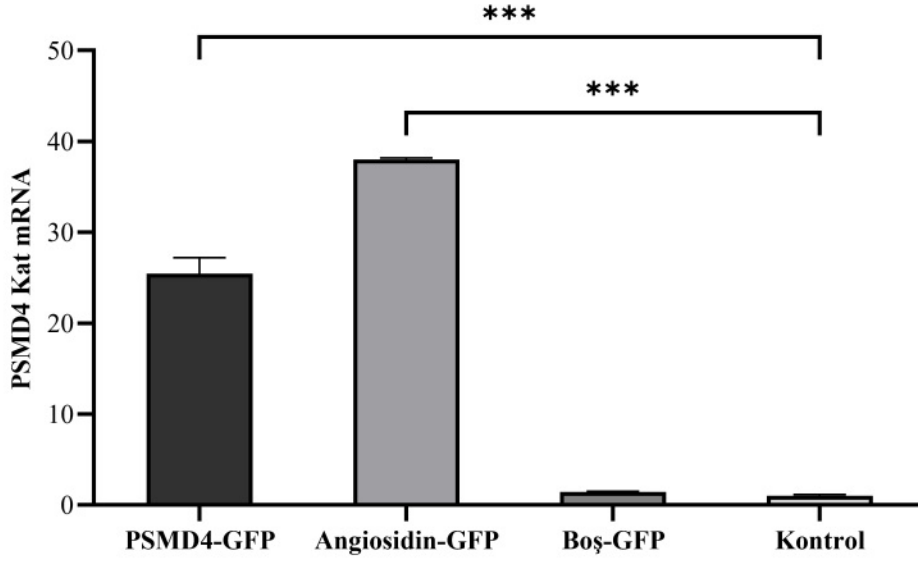
4.3 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Aşırı Ekspresyonu

Çalışmada pEGFP-C1 vektörüne klonlanan PSMD4 ve angiosidin genleri Bölüm 3.2.5’de belirtildiği şekilde transfeksiyonla PANC-1 ve HUVEC hücrelerine aktarıldı. PSMD4 ve angiosidin genlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonu mRNA ve protein düzeyinde yapılan çalışmalarla belirlendi.

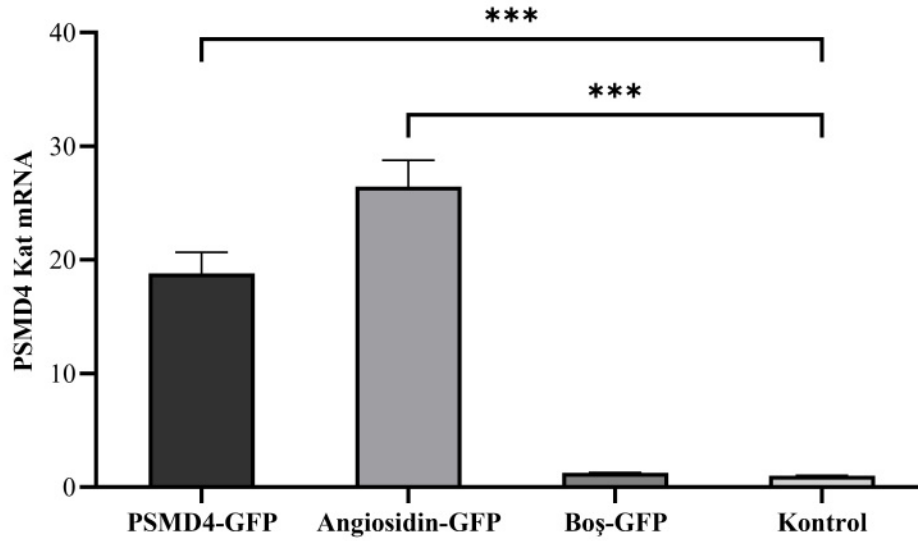
4.3.1 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Over Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunu gerçekleştirmek için transfeksiyon çalışması yapıldı. Bu amaçla birkaç kez pasaj yapılarak sağlıklı bir şekilde büyütülen PANC-1 ve HUVEC hücre hatları, 25 cm²’lik flasklara, 2x10⁶ hücre/flask olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün PSMD4-GFP, angiosidin-GFP ve boş-GFP vektörleri Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği gibi kalsiyum fosfat presipitasyonu ile hücrelere transfekte edildi. Kontrol grubu olarak bir flaska transfeksiyon yapılmamıştır.

PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunu mRNA düzeyinde belirlemek amacıyla transfeksiyonun 36. saatinde hücreler TE ile yüzeyden kaldırılarak pellet haline getirildi. Hücre pelletlerinden Bölüm 3.2.12.1’de belirtildiği şekilde RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinin miktarı ve saflığı belirlendikten sonra Bölüm 3.2.12.5’de belirtildiği şekilde RT reaksiyonu ile cDNA sentezi yapıldı ve elde edilen cDNA’ların kalite kontrolü (bk. Bölüm 3.2.12.6) gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.12.7’de açıklandığı gibi bu cDNA’lar ile PSMD4 genlerine özgü ekspresyon primerleri kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi. Aynı zamanda bu cDNA’lar ile normalizasyon amaçlı H β -2-M ekspresyon primerleri de çalışıldı. Real-time PCR’da cDNA örneklerinin her biri üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar, Livak metoduna göre değerlendirilip, GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testi ile analizi yapıldı (bk. Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.13: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun mRNA seviyesinde gösterilmesi. (*p* değerleri: < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***))

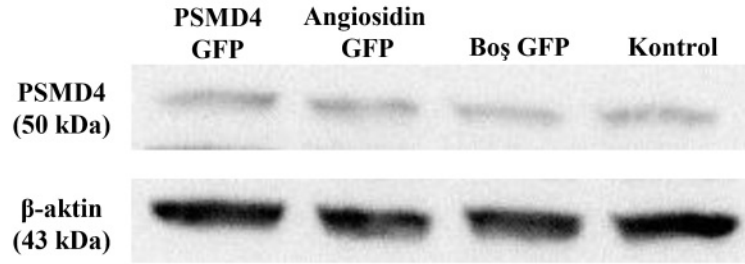


Şekil 4.14: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun mRNA seviyesinde gösterilmesi. (*p* değerleri: < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***))

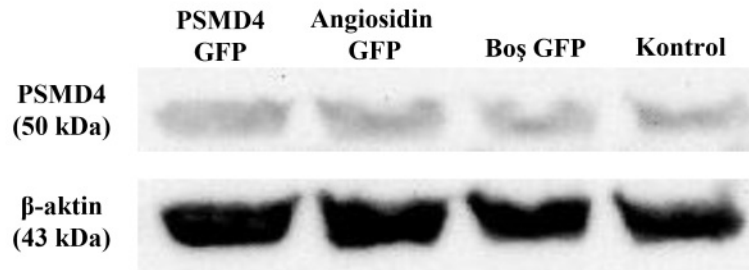
PANC-1 için Şekil 4.13’de, HUVEC için Şekil 4.14’de verilen grafiklere göre kontrol grubuyla kıyaslandığında; PSMD4 ve angiosidin genleriyle transfekte edilen grupların mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, Boş-GFP ile transfekte edilen grupta ise istatistiksel olarak mRNA seviyesinde anlamlı bir fark olmadığı bulundu.

4.3.2 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Over Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Belirlenmesi

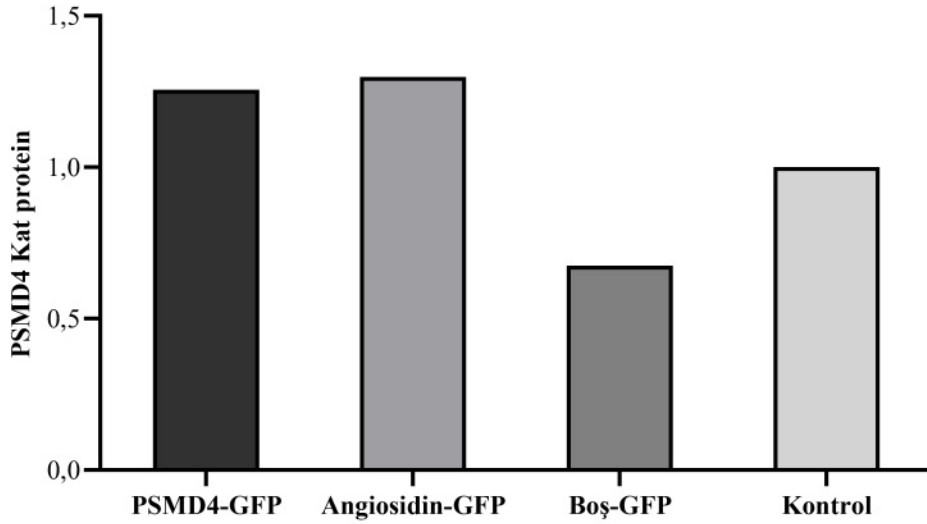
PANC-1 ve HUVEC hücrelerine Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde PSMD4-GFP, angiosidin-GFP ve boş-GFP vektörleri transfekte edildi. PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunu Western blot ile protein düzeyinde belirlemek için transfeksiyonun 36. saatinde hücreler kaldırılarak pellet haline getirildi. Hücre pelletlerinden Bölüm 3.2.13.2’de belirtildiği şekilde RIPA tamponuyla proteinler ekstrakte edildi. Protein miktarı belirlenen örnekler, Bölüm 3.2.13.4’de açıklandığı şekilde jelle yüklenerek SDS-PAGE’de yürütüldü. Elektroforezden sonra jeldeki proteinler PVDF membrana aktarıldı (bk. Bölüm 3.2.13.5). Daha sonra membran, PSMD4 proteinlerine özgü antikorlarla muamele edilerek işaretlendi ve ECL Western blot substratı kullanılarak UVP görüntüleme sisteminde fotoğraflandı. Benzer şekilde membran β -aktin proteinlerine özgü antikorlarla işaretlenerek görüntülendi. Şekil 4.15 ve 4.16’da gösterilen PSMD4 ve β -aktin protein bantlarının ImageJ programında densitometrik analizi yapıldı. PSMD4 sonuçları β -aktin ile normalize edilerek GraphPad programında grafiklendirildi (bk. Şekil 4.17 ve 4.18).



Şekil 4.15: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun protein bantları.

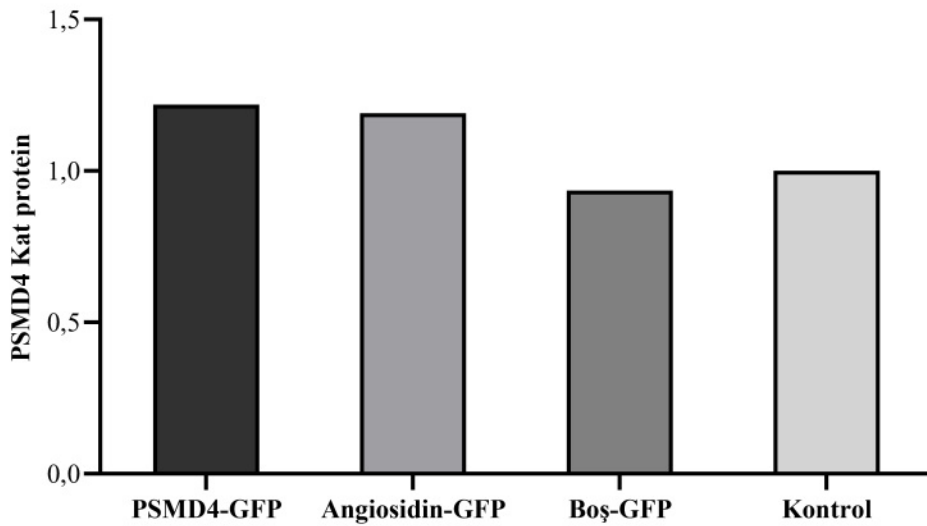


Şekil 4.16: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun protein bantları.



Şekil 4.17: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun protein seviyesinde gösterilmesi.

PANC-1 hücreleri için Şekil 4.17’de gösterilen grafik incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla PSMD4 ve angiosidin genlerinin protein seviyesi sırasıyla 1,25 ve 1,30 kat artmaktadır. Boş-GFP ile transfekte edilen grupla kıyaslandığında ise sırasıyla 1,86 ve 1,92 kat artış gözlenmektedir.



Şekil 4.18: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun protein seviyesinde gösterilmesi.

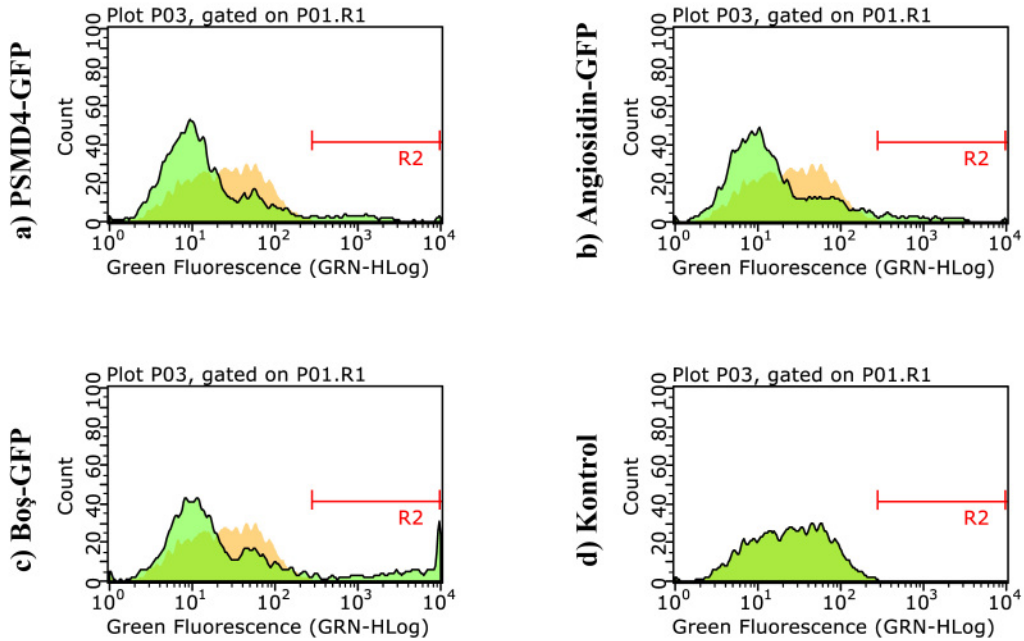
Şekil 4.18’de HUVEC hücreleri için verilen grafik incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla PSMD4 ve angiosidin genlerinin protein seviyesi sırasıyla 1,21 ve 1,20 kat artmaktadır. Boş-GFP ile transfekte edilen grupla kıyaslandığında ise sırasıyla 1,30 ve 1,27 kat artış gözlenmektedir.

4.3.3 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Over Ekspresyonunun Flow Sitometriyle Belirlenmesi

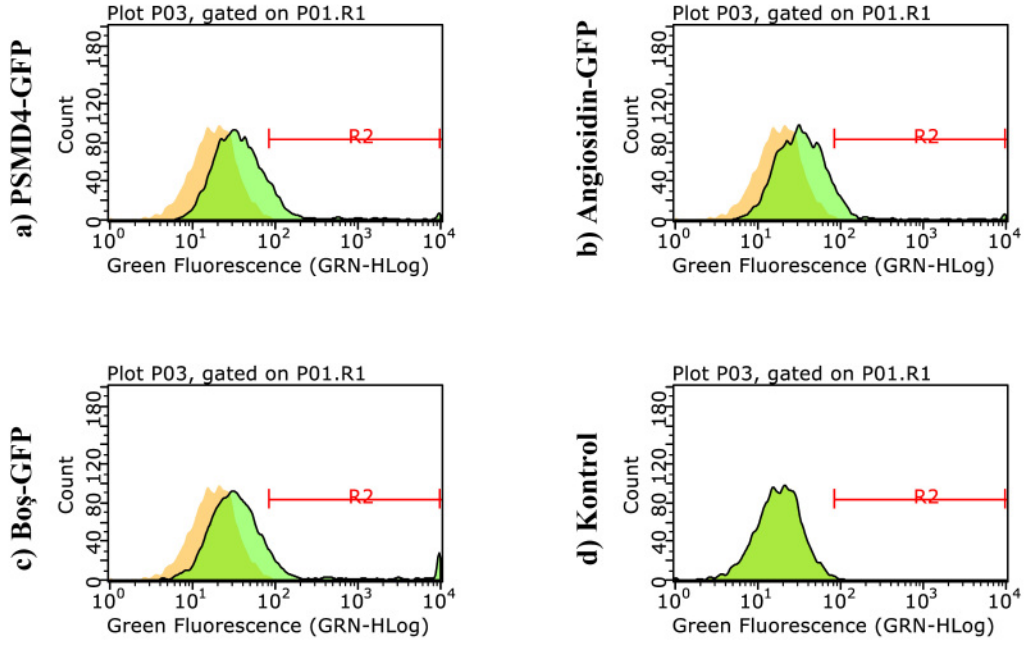
Çalışmada yeşil floresan protein (GFP) sinyali veren vektöre (pEGFP-C1) klonlanan PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonu Bölüm 3.2.6’da belirtildiği şekilde flow sitometri yöntemiyle belirlendi.

Öncelikle PSMD4-GFP, angiosidin-GFP ve boş-GFP vektörleri PANC-1 ve HUVEC hücrelerine Bölüm 3.2.5.2’de açıklandığı şekilde TurboFect™ transfeksiyon reaktifi kullanılarak aktarıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde hücrelerden tam besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra tripsinizasyonla yüzeyden kaldırıldı. Hücre süspansiyonu 1.000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Hücre pelleti tekrar 1X PBS ile yıkandı ve 1X PBS’de süspansiyon edilerek Guava EasyCyte™ flow sitometri cihazında ölçüm alındı.

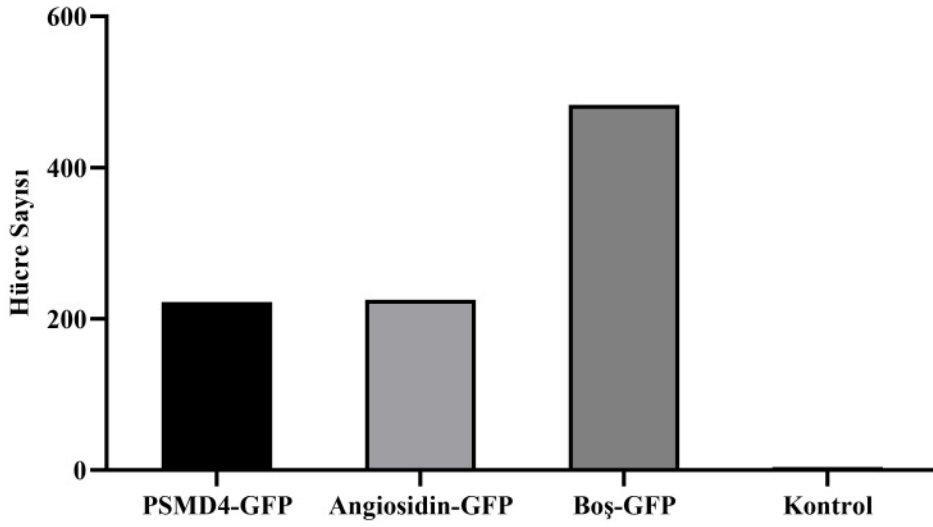
Hücrelerdeki GFP sinyalinin floresan yoğunluğunu gösteren histogramlar Şekil 4.19 ve 4.20’de verilmiştir. Bu histogramların analiz verileri GraphPad programında grafiklendirildi. PANC-1 için Şekil 4.21’de, HUVEC için Şekil 4.22’de verilen grafiklere göre GFP sinyali taşıyan vektörle transfekte edilen hücrelerde bu sinyal tespit edilmiştir.



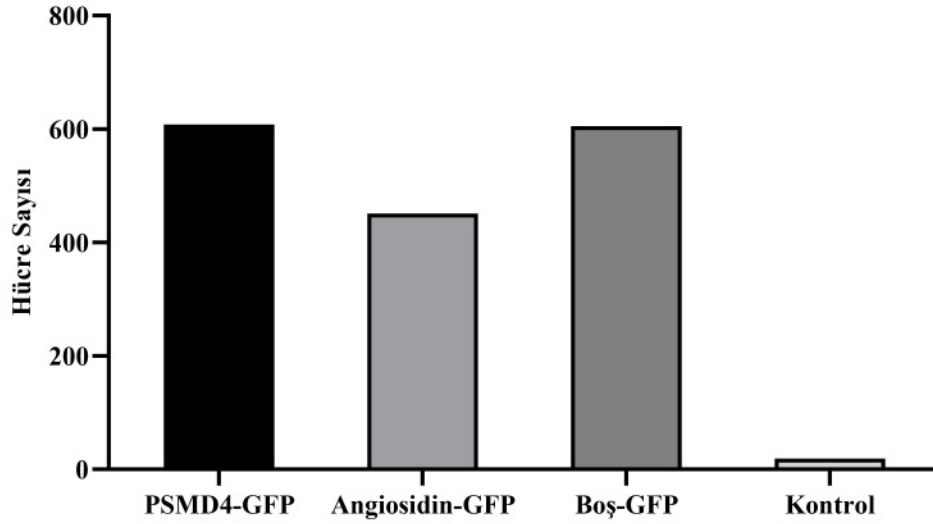
Şekil 4.19: PANC-1 hücrelerindeki GFP ekspresyon sinyali histogramları.



Şekil 4.20: HUVEC hücrelerindeki GFP ekspresyon sinyali histogramları.



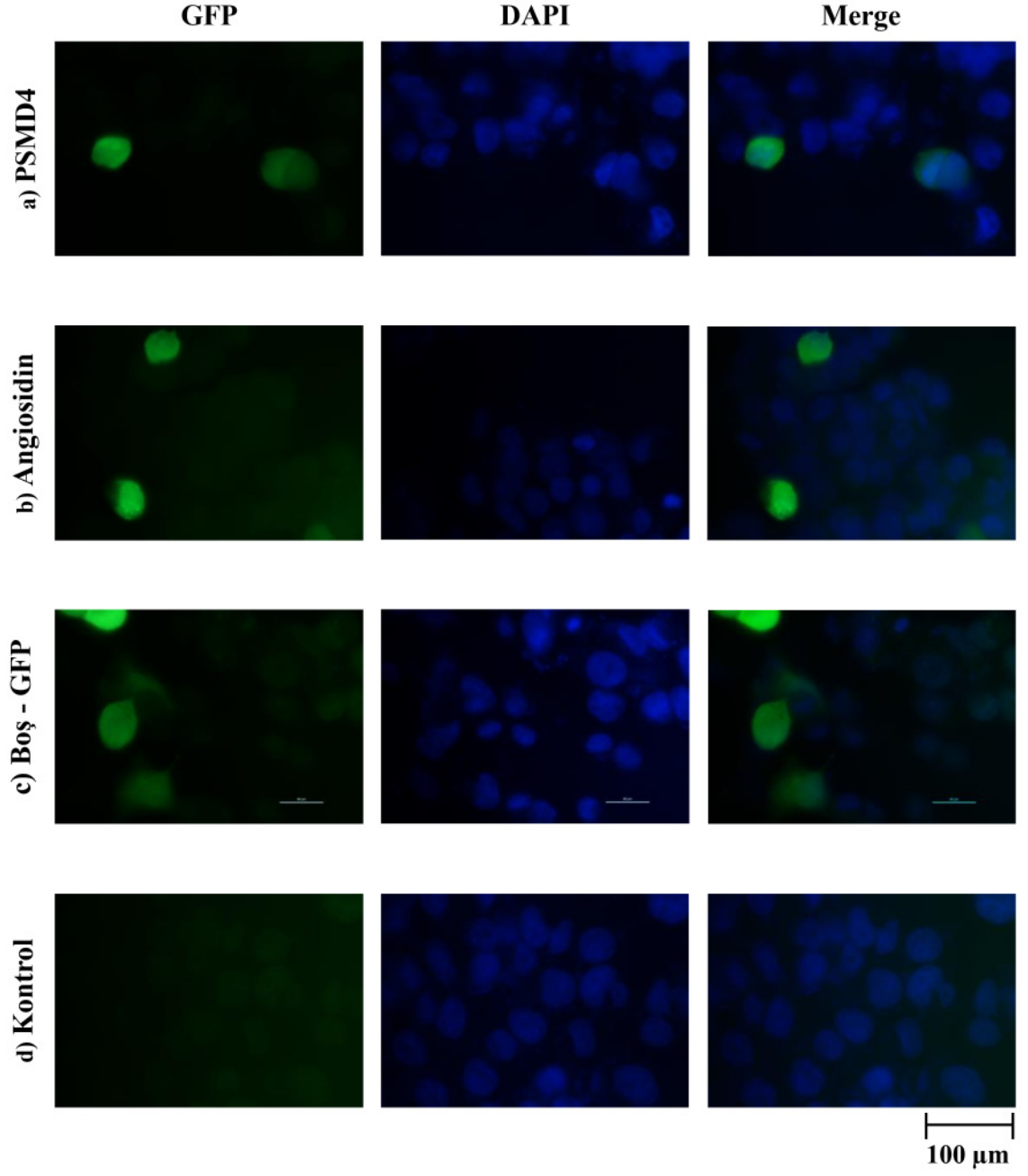
Şekil 4.21: Transfekte PANC-1 hücrelerindeki GFP sinyalinin flow sitometri analizi.



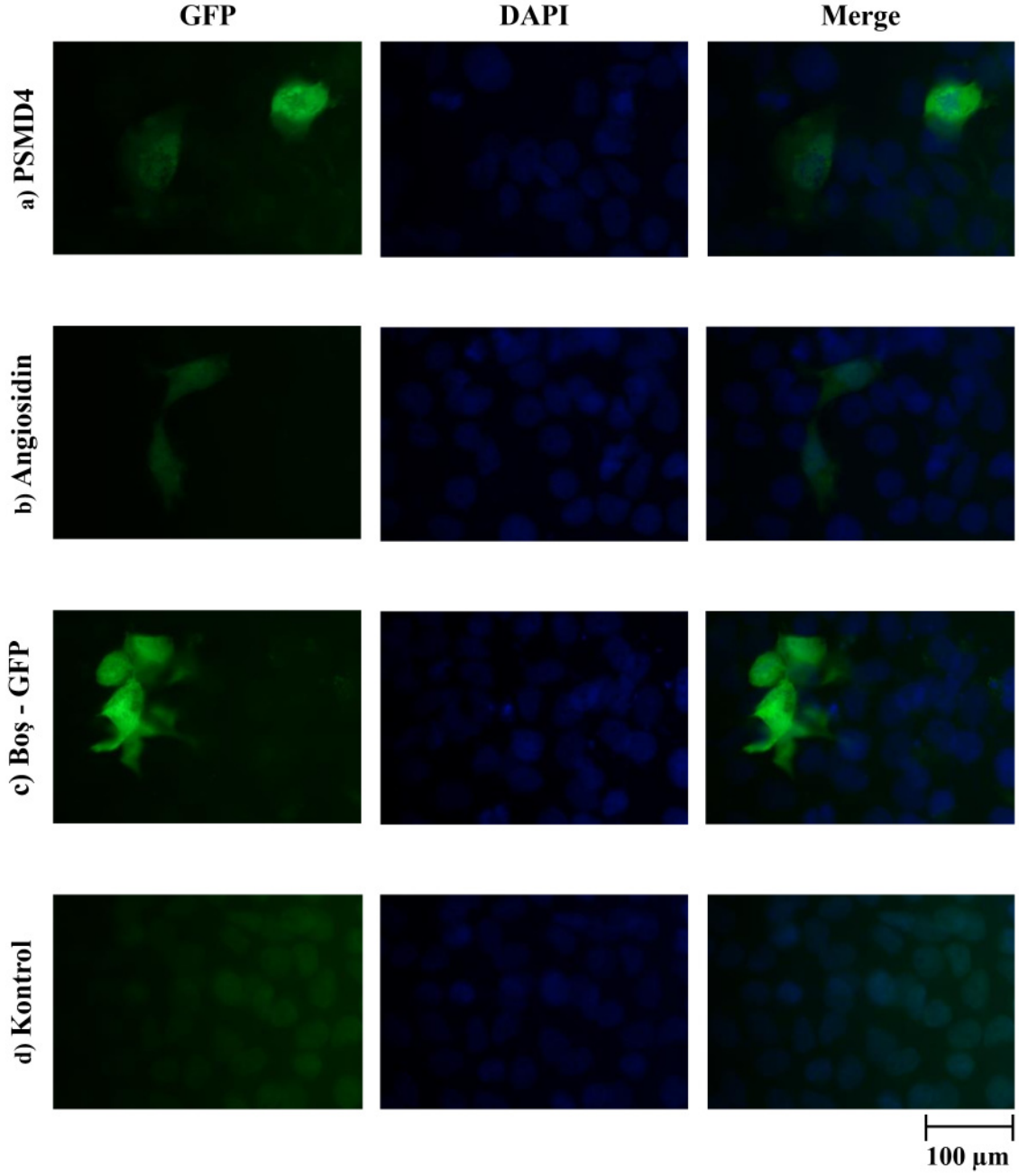
Şekil 4.22: Transfekte HUVEC hücrelerindeki GFP sinyalinin flow sitometri analizi.

4.4 PSMD4 ve Angiosidin Proteinlerinin Hücresel Lokalizasyonunun Floresans ile İncelenmesi

Çalışmada PSMD4 ve angiosidin gen ürünlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki lokalizasyonunu belirlemek için Bölüm 3.2.10.1’de belirtildiği şekilde GFP analizi yapıldı. Bu amaçla pEGFP-C1 vektörüne klonlanan PSMD4 ve angiosidin genlerinin Bölüm 3.2.5.2’de açıklandığı gibi PANC-1 ve HUVEC hücrelerine transfeksiyonu yapılarak over ekspresyonu sağlandı. Çalışmada boş pEGFP-C1 vektörü ile transfekte edilen ve transfeksiyon işlemi yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde hücre örnekleri mikroskop incelemesine hazırlandı. Besiyeri uzaklaştırılan hücreler 1X PBS ile yıkandı ve fiksasyon işlemi yapılarak yuvarlak lamellere sabitlendi. Daha sonra kuyucuklara DAPI boyası uygulanarak hücrelerin çekirdekleri boyandı. Kuyucuklardaki yuvarlak lameller dikkatle çıkarıldı ve üzerine ticari antifade reaktifi damlatılmış lamlara ters çevrilerek kapatıldı. Hazırlanan hücre preparatları floresan mikroskop altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi (Şekil 4.23 ve 4.24).

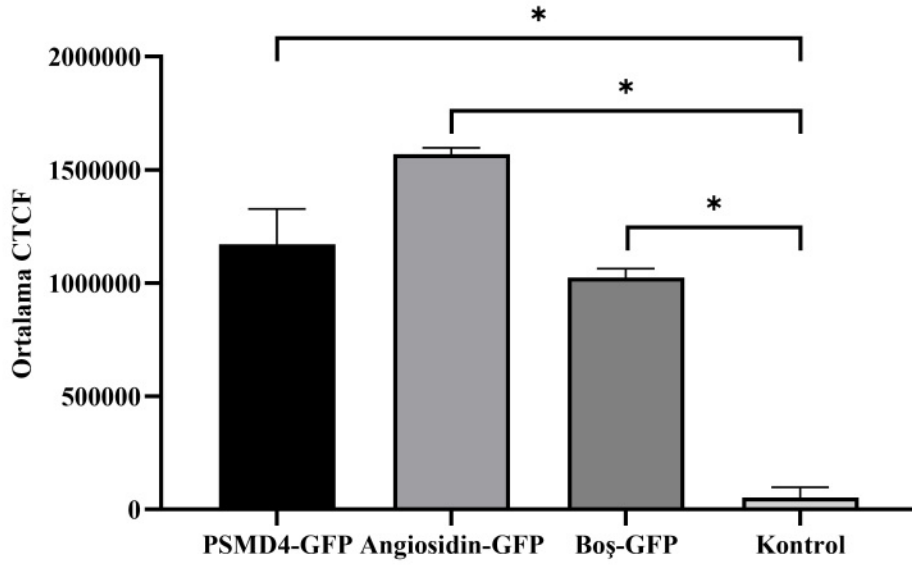


Şekil 4.23: PANC-1 hücrelerinde GFP etiketli PSMD4 ve angiosidin proteinlerinin hüresel lokalizasyonu.

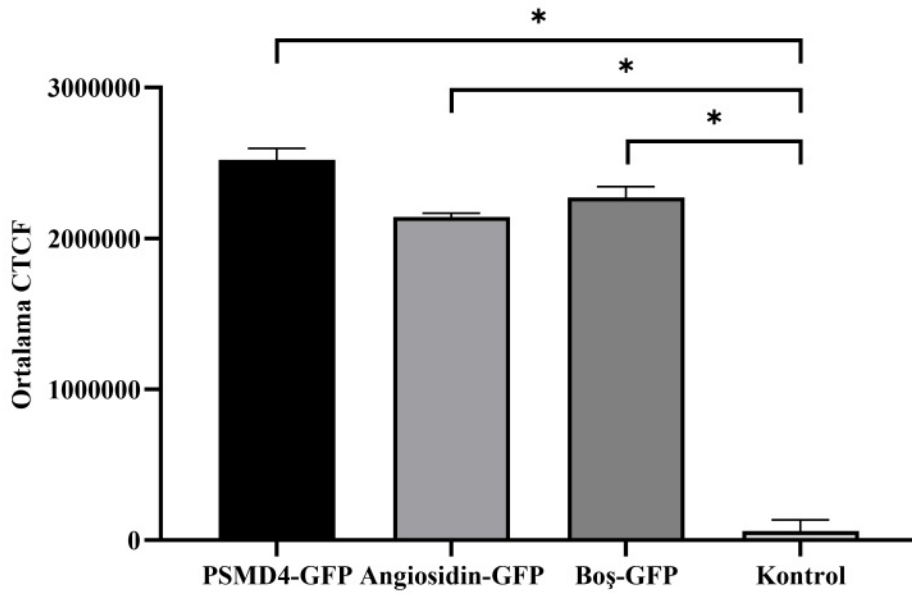


Şekil 4.24: HUVEC hücrelerinde GFP etiketli PSMD4 ve angiosidin proteinlerinin hücresel lokalizasyonu.

Bir kısmı Şekil 4.23 ve 4.24’de gösterilen floresan görüntüler ImageJ programında analiz edilerek floresan miktarı belirlendi. Bölüm 3.2.10.3’de belirtilen şekilde her seferinde görüntüden bir hücre seçilerek alan, integrale yoğunluk ve gri değer ortalaması ölçüldü. Ayrıca normalleştirme amacıyla her görüntüden üç arka plan alanı ölçüldü. Düzeltilmiş toplam hücre floresansı (CTCF) hesaplandı [136] ve sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip one-way ANOVA testiyle analiz edildi (bk. Şekil 4.25 ve 4.26).



Şekil 4.25: PANC-1 hücrelerindeki GFP sinyal yoğunluğu. ($p < 0,05$ (*) ile gösterildi.)



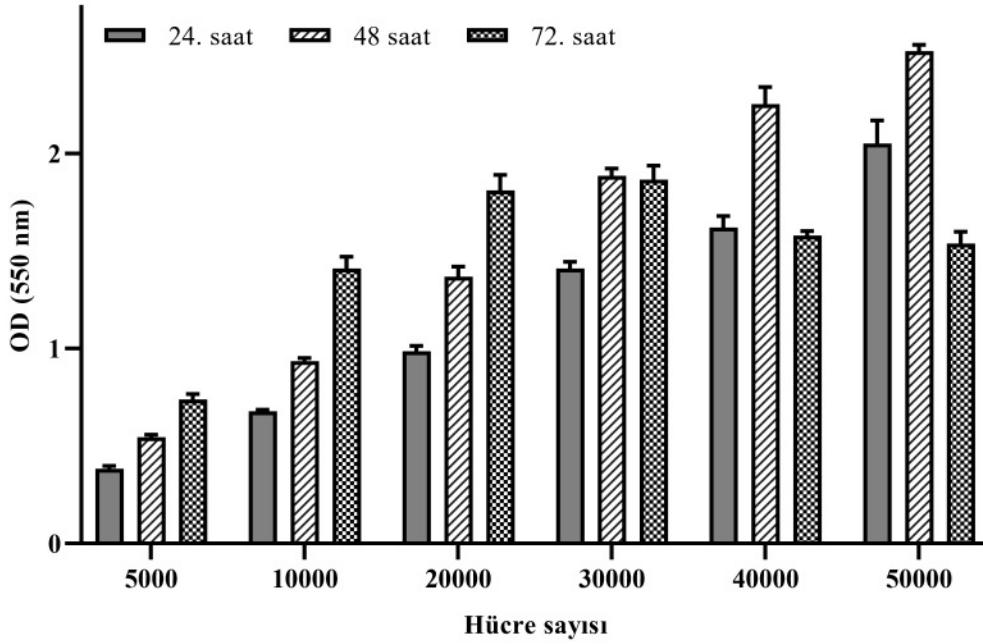
Şekil 4.26: HUVEC hücrelerindeki GFP sinyal yoğunluğu. ($p < 0,05$ (*) ile gösterildi.)

4.5 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücresel Düzeydeki Etkilerinin Belirlenmesi

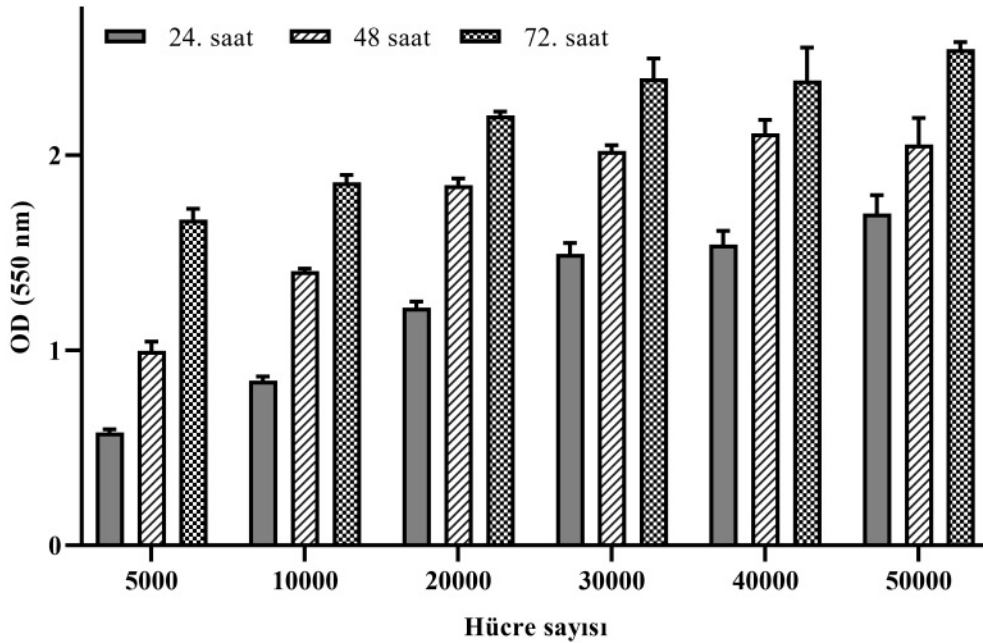
Çalışmada PSMD4 ve angiosidin genlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerine transfeksiyonu yapılarak over ekspresyonu yapıldı. Over ekspresyonu yapılan genlerin hücrelerin canlılığına, göç etme ve koloni oluşturma yeteneklerine etkisi belirlendi.

4.5.1 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücre Sitotoksitesine Etkisinin İncelenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde over ekspresyonu yapılan genlerin hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlendi. Öncelikle teste kullanılacak optimum hücre sayısı belirlendi. Bu amaçla yapılan ön çalışma sonuçlarına göre (bk. Şekil 4.27 ve 4.28) PANC-1 ve HUVEC hücreleri için 20×10^3 hücre/kuyu kullanılmasının uygun olduğu belirlendi.

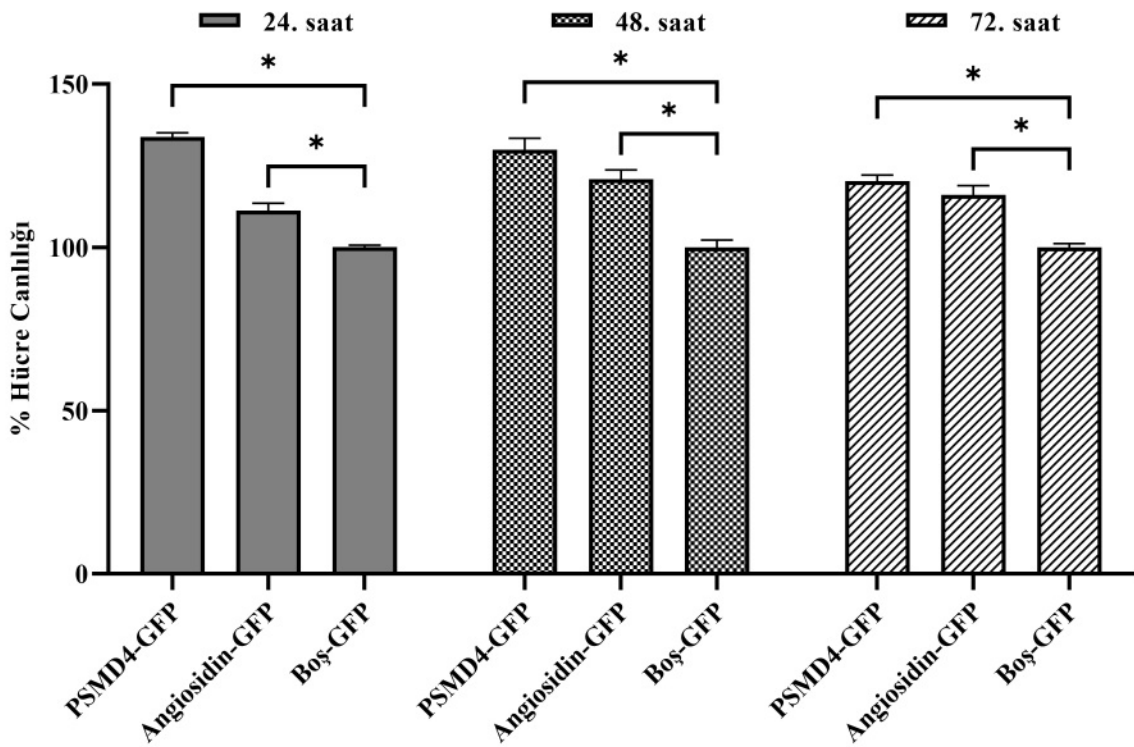


Şekil 4.27: MTT testi için PANC-1 hücrelerinde optimum sayının belirlenmesi.



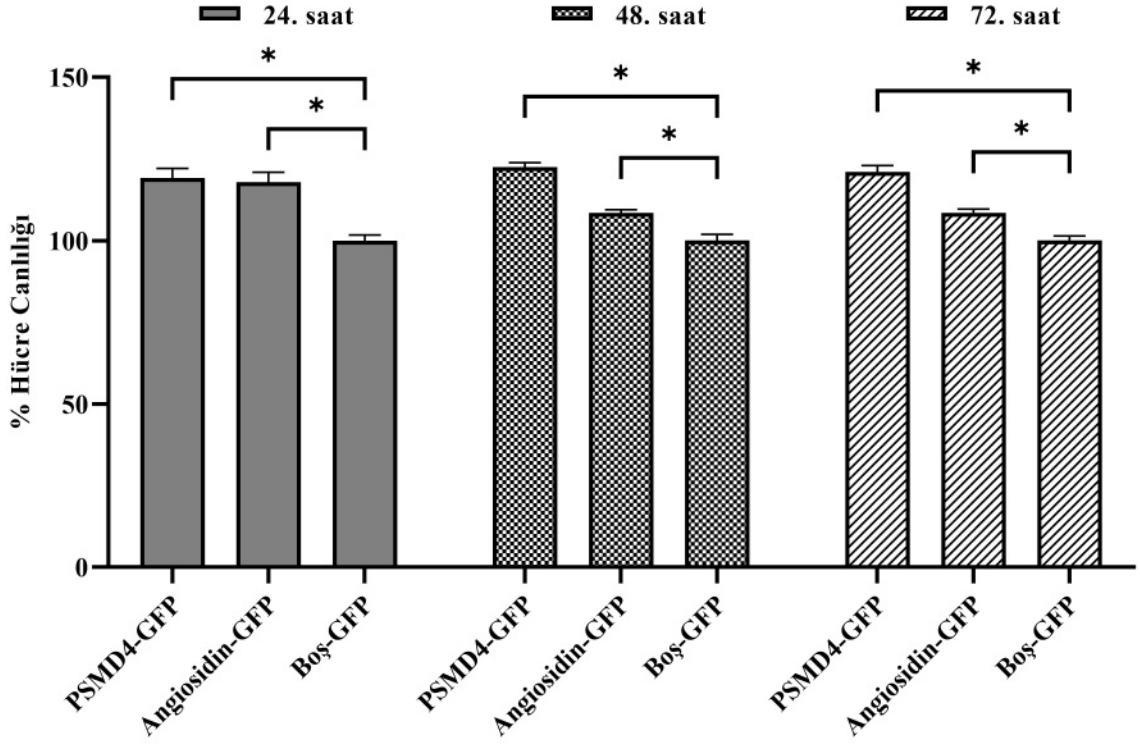
Şekil 4.28: MTT testi için HUVEC hücrelerinde optimum sayının belirlenmesi.

PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun hücre canlılığına etkisini belirlemek için PANC-1 ve HUVEC hücreleri 96 kuyucuklu plakaya kuyucukta 20×10^3 hücre olacak şekilde paylaştırıldı ve 16 sa. inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün Bölüm 3.2.5.2’de belirtilen şekilde PSMD4 ve angiosidin genleri hücelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 24, 48. ve 72. saatlerinde Bölüm 3.2.7’de açıklandığı şekilde MTT testi yapıldı. Her deney grubundaki örnekler en az 6 tekrarlı çalışıldı. Örneklerin spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Elde edilen değerler kullanılarak hücrelerin yüzde (%) canlılığı hesaplandı. Sonuçlar, GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testiyle analiz edildi.



Şekil 4.29: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun zamana bağlı hücre canlılığına etkisinin MTT analizi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

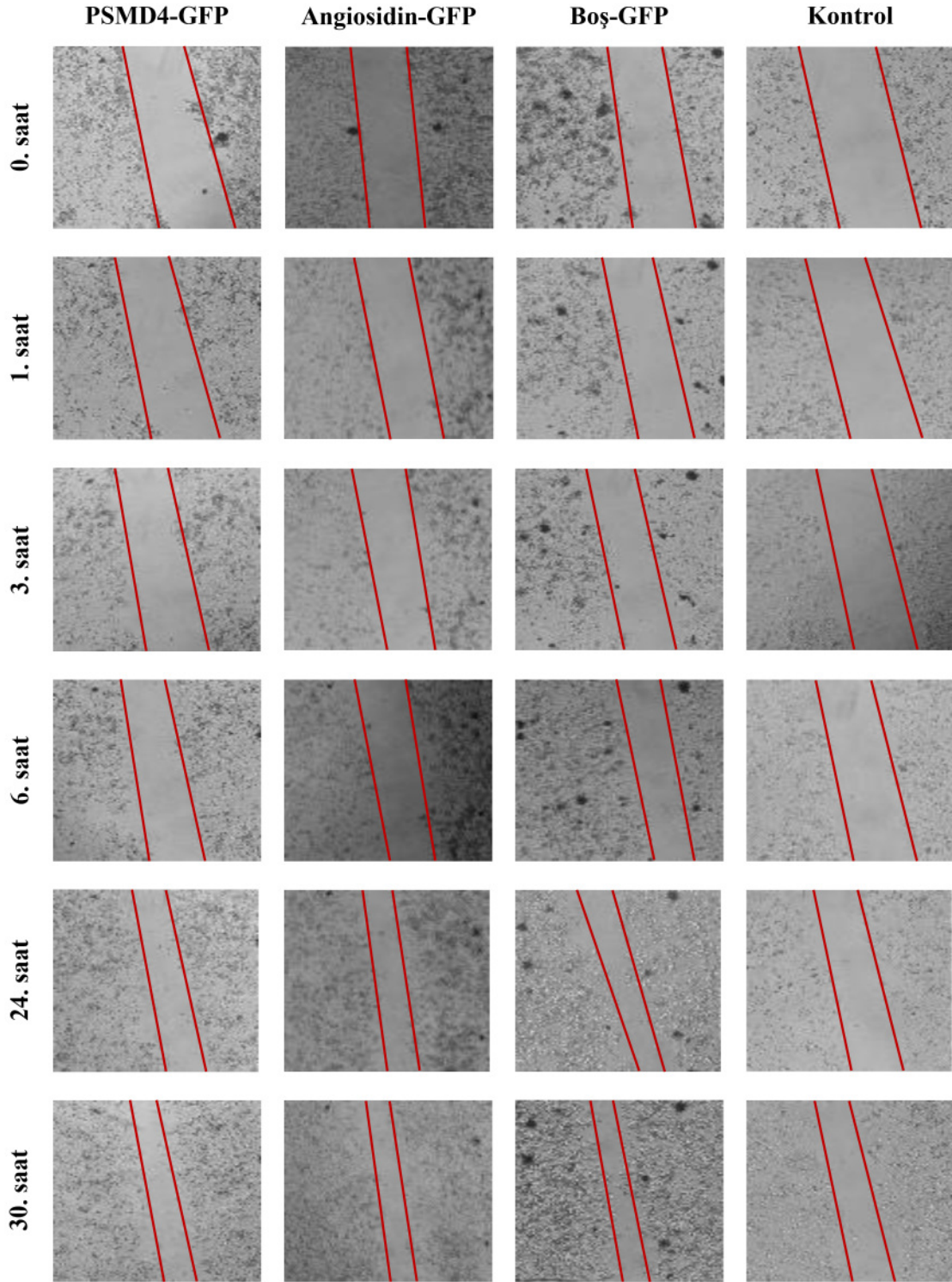
PANC hücreleri için Şekil 4.29’daki grafiğe göre kontrol grubuna kıyasla PSMD4 ve angiosidin genleriyle transfekte edilen gruplarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir artış görüldü. Şekil 4.30’da HUVEC hücreleri için verilen grafiğe göre ise PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun yapıldığı gruplarda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir artış tespit edildi.



Şekil 4.30: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun zamana bağlı hücre canlılığına etkisinin MTT analizi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

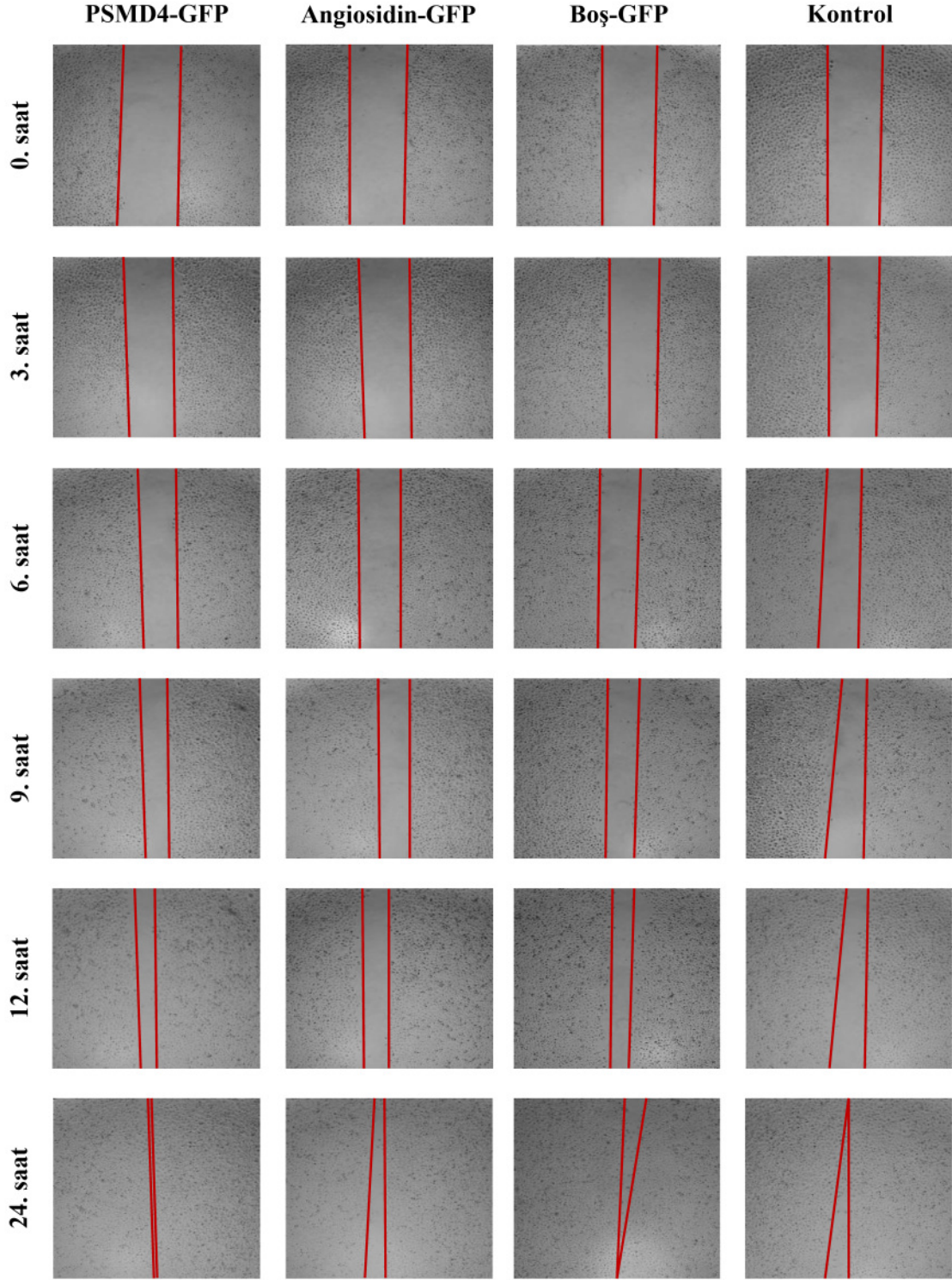
4.5.2 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücre Migrasyonuna Etkisinin İncelenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde over ekspresyonu yapılan PSMD4 ve angiosidin genlerinin hücre göçüne etkisini araştırmak için Bölüm 3.2.8’de belirtildiği şekilde scratch testi yapıldı. Bu amaçla PSMD4 ve angiosidin genleriyle transfeksiyonu yapılan hücreler 12 kuyucuklu plakaya 25×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi kaplayıp tek katmanlı bir tabaka oluşturması için 16-24 sa. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra $10 \mu\text{L}$ ’lik steril pipet ucu yardımıyla kuyudaki hücrelerin ortasına çizik atıldı ve 0. saat için hücreler inverted mikroskopta görüntülenip fotoğraflandı. Devamındaki inkübasyonun belirli zaman aralıklarında hücrelerin göç ederek çizici kapatması tekrar görüntülenip fotoğraflandı. PANC-1 için Şekil 4.31’de, HUVEC için Şekil 4.32’de verilen farklı zaman aralıklarına ait scratch testi görüntüleri ImageJ programı (MRI Wound Healing Tool eklentisi) ile analiz edildi. Hücrelerin göç etme oranları hesaplandı ve GraphPad programında grafiklendirildi (bk. Şekil 4.33 ve 4.34).



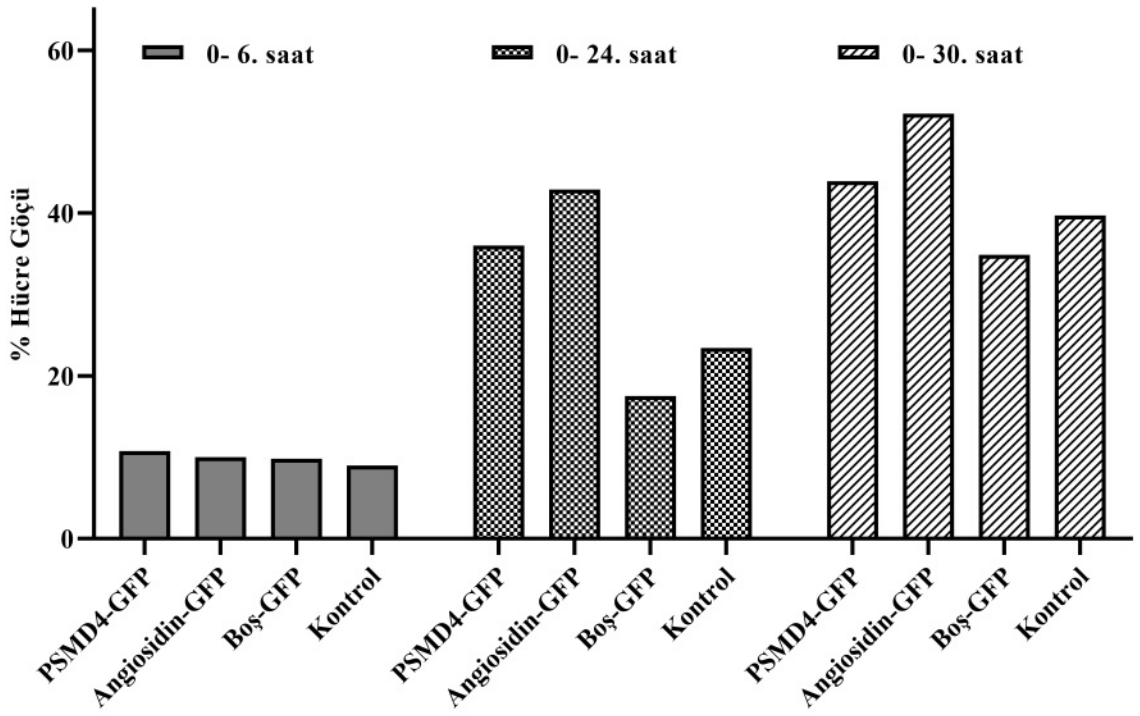
Şekil 4.31: PANC-1 için farklı zaman aralıklarına ait scratch testi görüntüleri.

PANC-1 hücre hattı için PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun yapıldığı gruplarda kontrol gruplarına kıyasla hücrelerin göç etme yeteneğinde bir artış olduğu gözlemlendi (bk. Şekil 4.33).

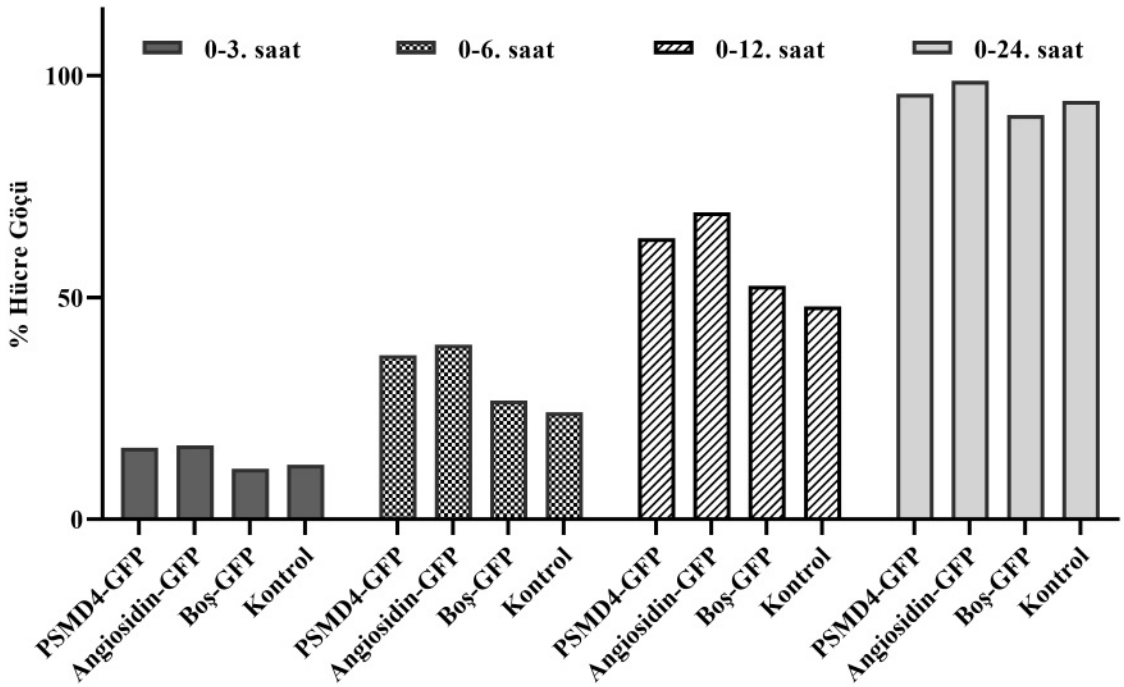


Şekil 4.32: HUVEC için farklı zaman aralıklarına ait scratch testi görüntüleri.

HUVEC hücre hattı için PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun yapıldığı gruplarda kontrol gruplarına kıyasla hücrelerin göç etme yeteneğinde bir artış olduğu tespit edildi (bk. Şekil 4.34).



Şekil 4.33: PANC-1 hücre hattında yapılan over ekspresyonunun hücre göçüne etkisi.

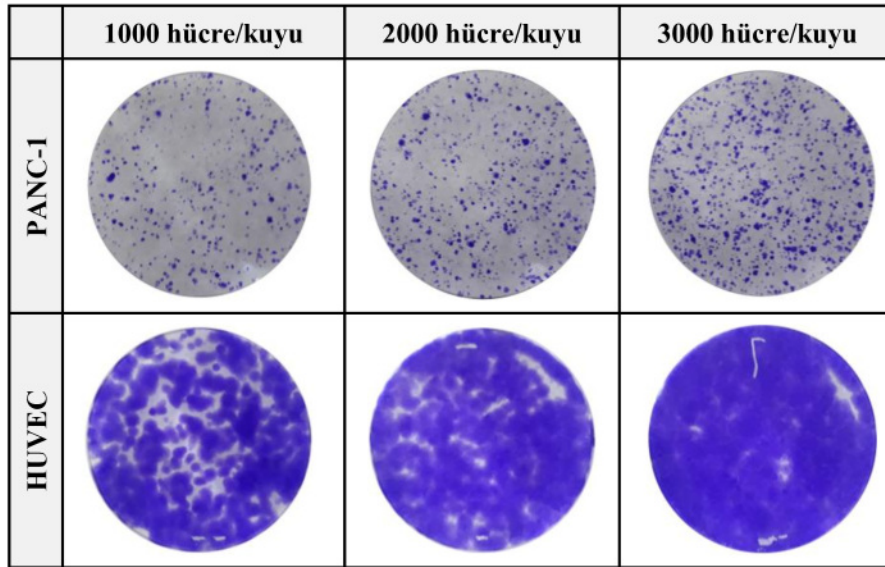


Şekil 4.34: HUVEC hücre hattında yapılan over ekspresyonunun hücre göçüne etkisi.

4.5.3 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun Hücrelerin Koloni

Oluşturma Yeteneğine Etkisinin İncelenmesi

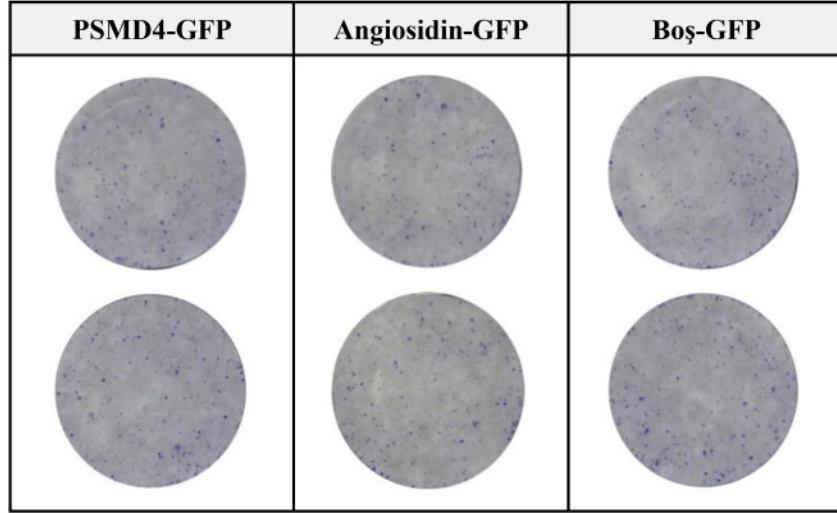
PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında over ekspresyonu yapılan PSMD4 ve angiosidin genlerinin hücrelerin koloni oluşturma yeteneğine etkisini belirlemek amacıyla koloni formasyon testi yapıldı. Öncelikle 6 kuyucuklu plaka için kullanılacak optimum hücre sayısı belirleme çalışması yapıldı (bk. Şekil 4.35). PANC-1 hücreleri için 1000 hücre/kuyu, HUVEC hücreleri içinse 500 hücre/kuyu kullanılmasının uygun olduğu tespit edildi.



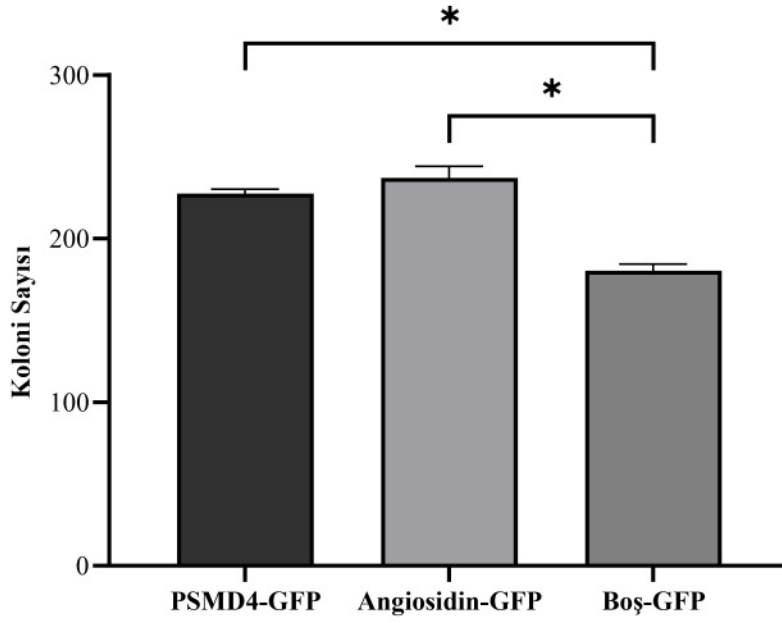
Şekil 4.35: Koloni formasyon testi için optimum hücre sayısının belirlenmesi.

Bölüm 3.2.9’da belirtildiği gibi PANC-1 ve HUVEC hücrelerine koloni formasyon testi gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.5.1’de açıklandığı şekilde PSMD4 ve angiosidin genleri ile transfeksiyonu yapılan hücreler en az 3 tekrarlı olacak şekilde 6 kuyucuklu plakaya optimum sayıda paylaştırıldı ve inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyonun 72. saatinde transfeksiyon işlemi tekrar edildi. Kuyucuklarda yeterli yoğunlukta koloni oluşumu görüldüğü zaman (ilk transfeksiyondan ~7-10 gün sonra) tam besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 1X PBS ile yıkandı. Koloniler metanol ile sabitlendikten sonra kristal viyole çözeltilisiyle boyandı. Kuyucuklardaki fazlalık boya uzaklaştırılıp ortam kurutulduktan sonra koloniler görüntülenip fotoğraflandı.

PANC-1 için Şekil 4.36’da, HUVEC için Şekil 4.38’de verilen görüntülerdeki koloniler CellCounter programı kullanılarak sayıldı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testiyle analiz edildi (bk. Şekil 4.37 ve 4.39).

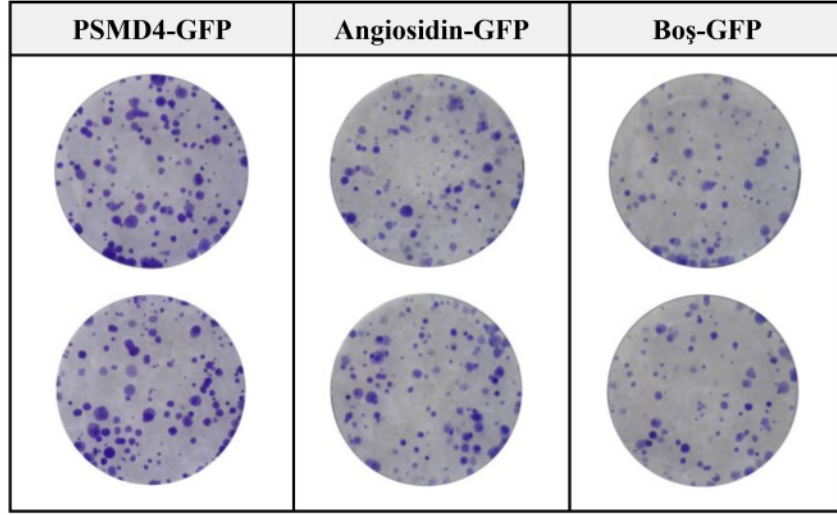


Şekil 4.36: PANC-1 için koloni formasyon görüntüleri.

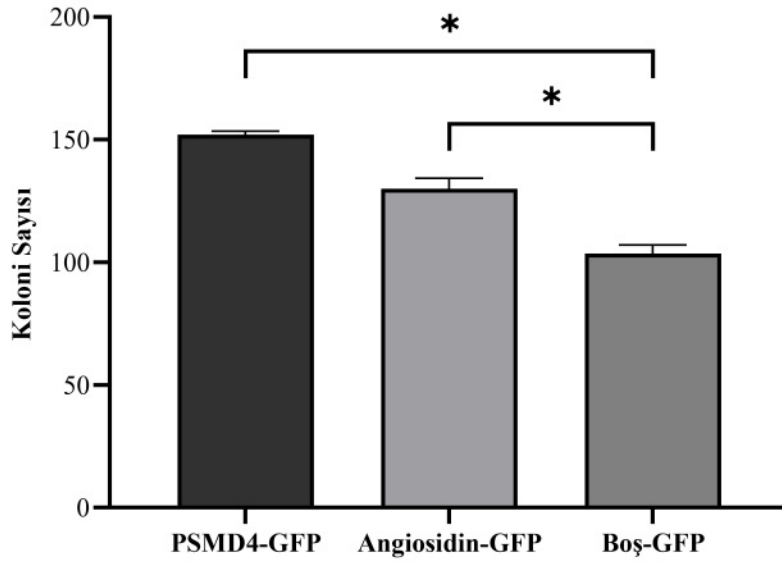


Şekil 4.37: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun koloni oluşumuna etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

PANC-1 hücreleri için Şekil 4.37’de gösterilen grafik incelendiğinde PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun yapıldığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla koloni oluşum yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi.



Şekil 4.38: HUVEC için koloni formasyon görüntüleri.



Şekil 4.39: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun koloni oluşumuna etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

HUVEC hücreleri için Şekil 4.39’da verilen grafik incelendiğinde PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun yapıldığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla koloni oluşum yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi.

4.5.4 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Over Ekspresyonunun EMT ve Apoptoz

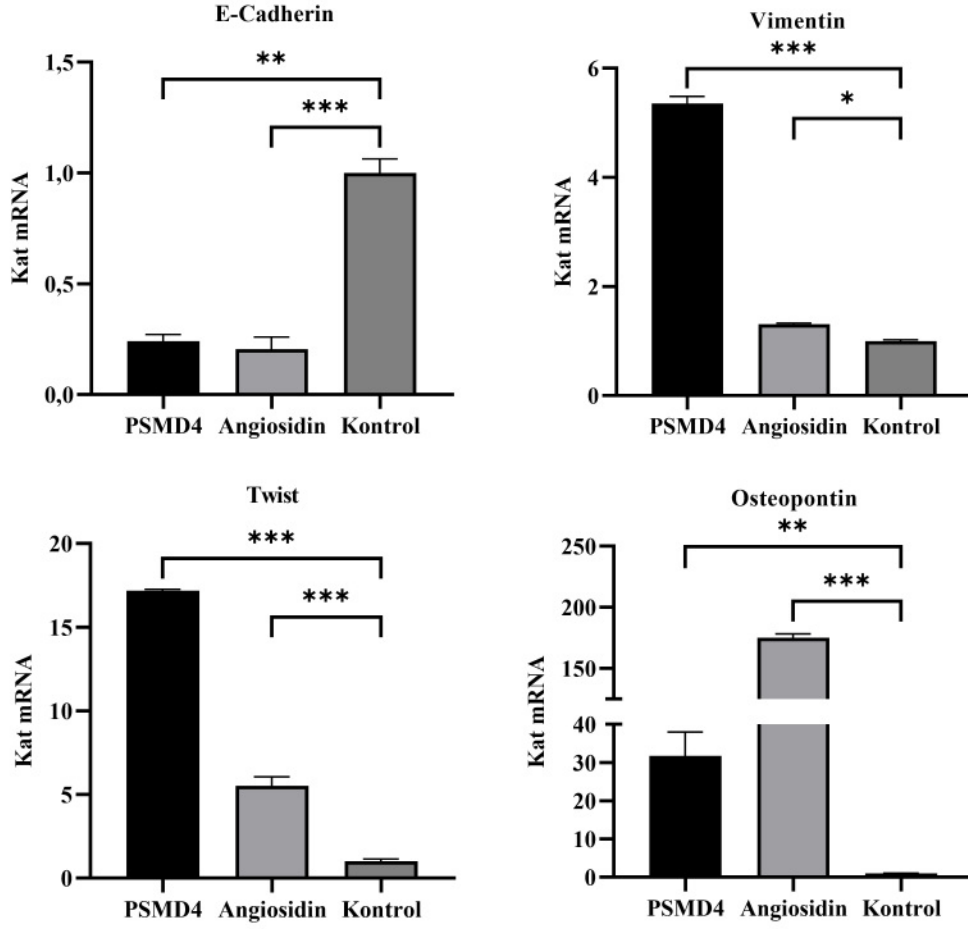
Süreçleriyle İlişkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında PSMD4 ve angiosidin genlerin over ekspresyonu yapıldığında hücrelerin göç etmesinde, koloni oluşturmasında ve canlılığında bir artış gözlemlendi. Bu hücresel değişikliklerinin EMT (Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm) ve apoptoz süreçleriyle ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu yapılan hücrelerde EMT ve apoptoz süreciyle ilişkili bazı genlerin mRNA düzeyindeki seviyesi real-time PCR ile belirlendi.

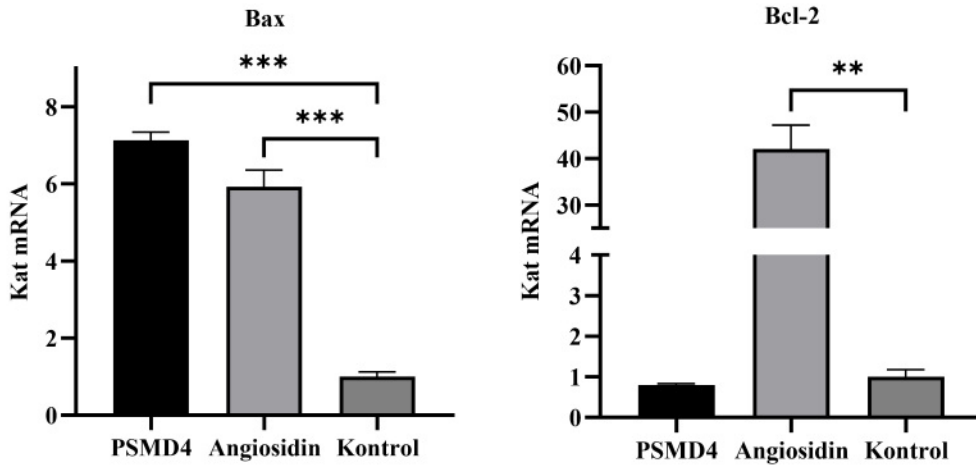
Öncelikle PANC-1 ve HUVEC hücrelerine Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde PSMD4 ve angiosidin genleri transfeksiyonla aktarıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde hücreler kaldırılarak pellet haline getirildi ve hücre pelletlerinden Bölüm 3.2.12.1’de açıklandığı gibi RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinin miktarı ve saflığı belirlendikten sonra RT reaksiyonu ile cDNA sentezi yapıldı (bk. Bölüm 3.2.12.5). Bu cDNA’lar ile Tablo 3.20’de verilen EMT ve apoptoz süreçleriyle ilişkili genlerin ekspresyon primerleri kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi. Aynı zamanda bu cDNA’lar ile normalizasyon amaçlı H β -2-M ekspresyon primerleri de çalışıldı. Real-time PCR’da her bir cDNA örneği en az 3 tekrarlı çalışılmıştır. Sonuçlar, Livak metoduna göre değerlendirilip GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testi ile analiz edildi.

PANC-1 hücre hattındaki over ekspresyonun EMT ilişkili genlere etkisi incelendiğinde (bk. Şekil 4.40) kontrol grubu hücrelerine kıyasla PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu yapılan hücrelerde E-cadherin geninin mRNA seviyesinde azalış olduğu osteopontin, vimentin ve twist genlerinin mRNA seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulundu.

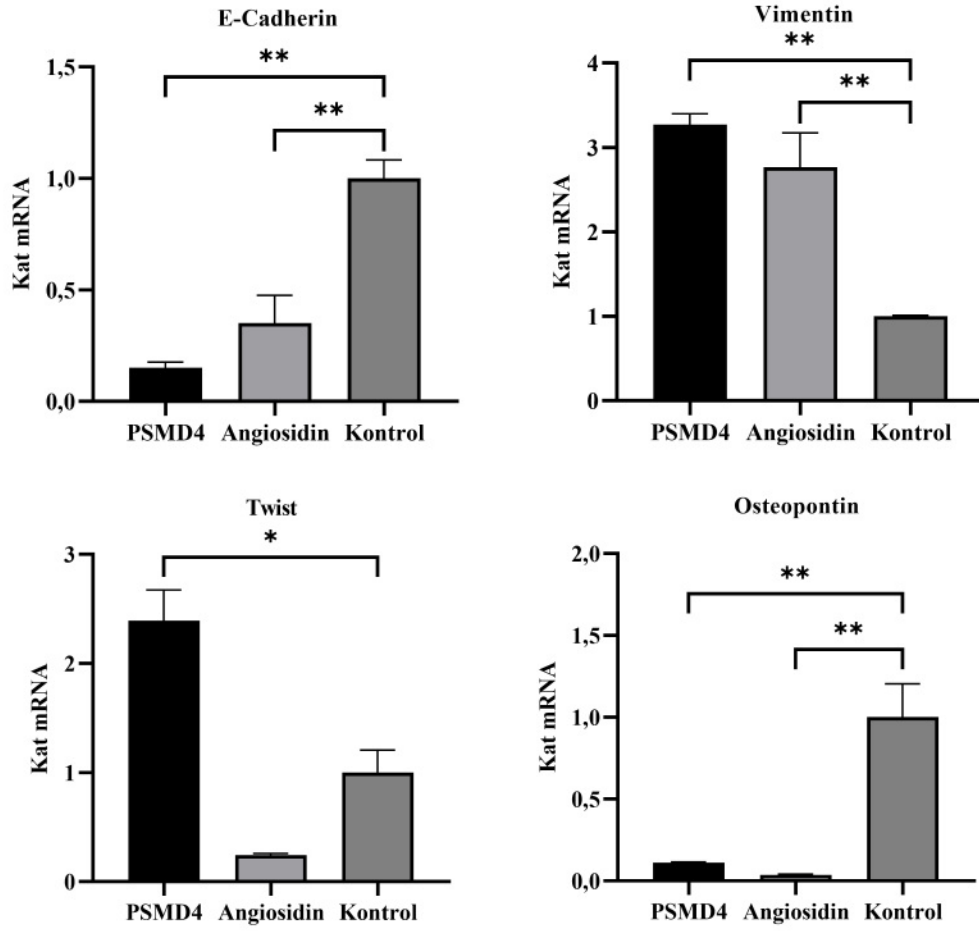
PANC-1 hücre hattındaki over ekspresyonun apoptoz ilişkili genlere etkisi incelendiğinde (bk. Şekil 4.41) kontrol grubu hücrelerine kıyasla PSMD4 over ekspresyonu yapılan hücrelerde sadece Bax geni mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Angiosidin over ekspresyonu yapılan hücrelerde ise Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi.



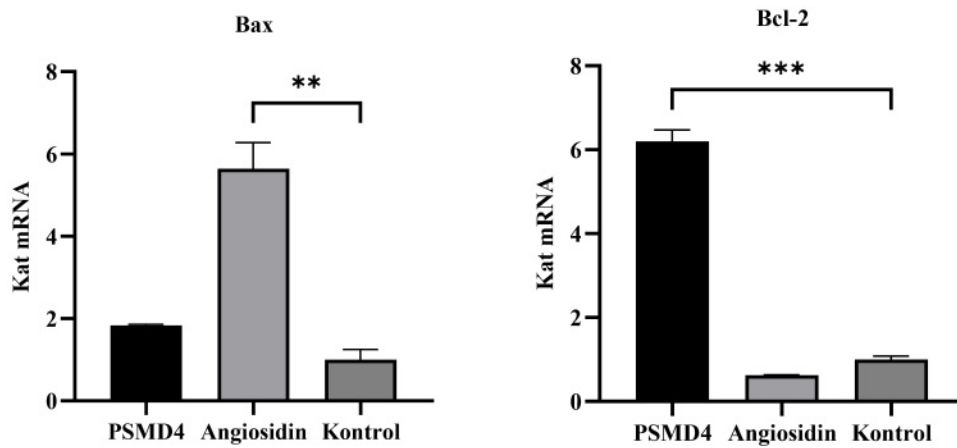
Şekil 4.40: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun EMT ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi. ($p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***))



Şekil 4.41: PANC-1 hücrelerindeki over ekspresyonun apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi. ($p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***))



Şekil 4.42: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun EMT ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi. ($p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***))



Şekil 4.43: HUVEC hücrelerindeki over ekspresyonun apoptoz ilişkili genlere etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi. ($p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***))

HUVEC hücre hattındaki over ekspresyonun EMT ilişkili genlere etkisi incelendiğinde (bk. Şekil 4.42) kontrol grubu hücrelerine kıyasla PSMD4 over ekspresyonu yapılan hücrelerde E-cadherin ve osteopontin genlerinin mRNA seviyesinde azalış ($p<0,05$) olduğu vimentin ve twist genlerinin mRNA seviyesinde ise artış ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. Angiosidin over ekspresyonu yapılan hücrelerde ise E-cadherin ve osteopontin genlerinin mRNA seviyesinde azalış ($p<0,05$) olduğu vimentin geninin mRNA seviyesinde ise artış ($p<0,05$) olduğu belirlendi.

HUVEC hücre hattındaki over ekspresyonun apoptoz ilişkili genlere etkisi incelendiğinde (bk. Şekil 4.43) kontrol grubu hücrelerine kıyasla PSMD4 over ekspresyonu yapılan hücrelerde sadece Bcl-2 geninin mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Angiosidin over ekspresyonu yapılan hücrelerde ise sadece Bax geninin mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi.

4.6 PSMD4 Geninin Susturulma Çalışmaları

4.6.1 shRNA Oligolarının Tasarımı

PSMD4 ve angiosidin genlerini susturmak amacıyla siRNA seçim programı (<http://sirna.wi.mit.edu/>) kullanılarak bu genlere uygun hedef diziler (21-mer) belirlendi. Bu dizilerin % GC ve NCBI analizleri yapılarak uygunluğu kontrol edildi. Üretici firmanın (Addgene) önerdiği şekilde bu dizileri (anlamlı ve karşı anlamlı) pLKO.1-TRC vektörüne klonlamaya uygun hale getirmek için aşağıdaki (koyu renkli) oligolar eklendi. Tasarlanan shRNA oligoları Tablo 4.8’de verilmiştir.

İleri oligo: 5' **CCGG**—21bç anlamlı—**CTCGAG**—21bç karşı anlamlı—**TTTTTG** 3'

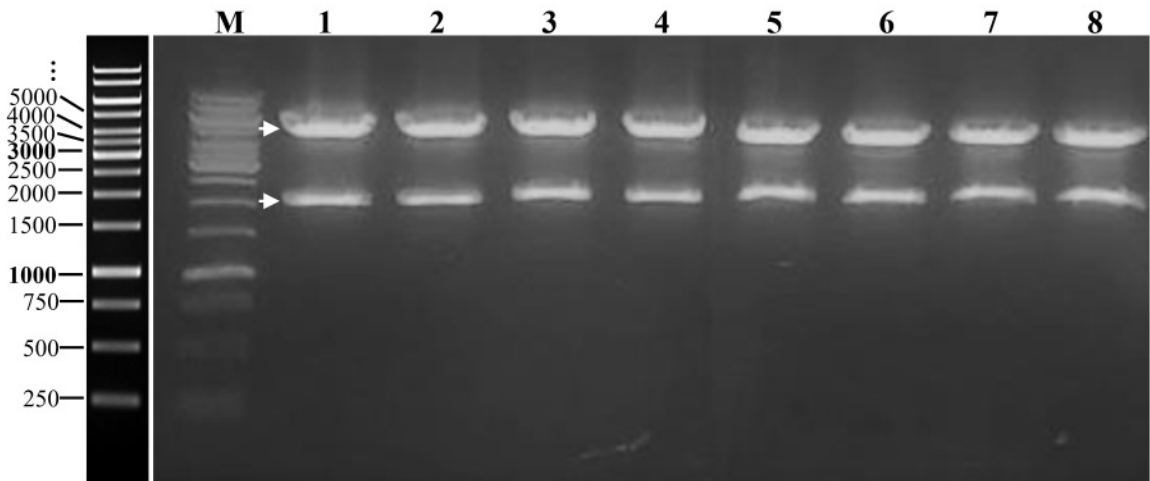
Geri oligo: 5' **AATTCAAAAA**—21bç anlamlı—**CTCGAG**—21bç karşı anlamlı 3'

Tablo 4.8: PSMD4 ve angiosidin genleri için tasarlanan shRNA oligoları.

Oligo	Nükleotit Dizisi (5'→3') [Hedef diziler koyu rankle gösterilmiştir.]	
PSMD4	İleri	CCGG GTGGAGGACAATGAGAAGGATCCTCGAGGATCCTTCTCATTGTCCTCCACTTTTTG
	Geri	AATTCAAAAA GTGGAGGACAATGAGAAGGATCCTCGAGGATCCTTCTCATTGTCCTCCAC
Angiosidin	İleri	CCGGAGGTGAAAGAGACTCAGACGACTCGAGTCGTCTGAGTCTCTTTTCACCTTTTTTG
	Geri	AATTCAAAAA AGGTGAAAGAGACTCAGACGACTCGAGTCGTCTGAGTCTCTTTTCACCT

4.6.2 shRNA Oligoların pLKO.1-TRC Vektörüne Klonlanması

PSMD4 ve angiosidin genleri için ticari olarak temin edilen ileri ve geri shRNA oligoları 20 pmole sulandırıldı. Öncelikle genlerin shRNA oligoları annealing reaksiyonu ile tavlama birleştirildi. Bu amaçla PCR tüplerine 5'er µL ileri ve geri shRNA oligoları, 5 µL 10X NEB Buffer 2 ve 35 µL dH₂O konuldu. Tüpler PCR cihazında 95 °C'de 4 dakika ve 75 °C'de 10 dakikaya inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında 2-3 saat soğumaya bırakıldı. Birleştirilen shRNA oligoları ile *EcoRI* ve *AgeI* restriksiyon enzimleri ile kesilip linear hale getirilen pLKO.1-TRC vektörüne ligasyon reaksiyonu kuruldu. Ligasyon ortamına: birleştirilen shRNA oligolarından 2 µL, linear pLKO.1-TRC vektöründen 3 µL, 10X T4 DNA ligaz tamponundan 2 µL ve 1 µL T4 DNA ligaz (5 U/µL) konuldu ve son hacim dH₂O ile 20 µL'ye tamamlandı. 1 gece (16 sa.) +16 °C'de inkübasyondan sonra Bölüm 3.2.2.3'de açıklandığı gibi ligasyon ürünleri kompetent hücrelere transforme edildi. Transformasyondan sonra gözlenen kolonilerin olası rekombinant olanları araştırmak için bu kolonilerden ön kültür hazırlandı ve plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu plazmitlere *EcoRI* ve *NcoI* restriksiyon enzimleriyle Bölüm 3.2.3.6'da açıklandığı gibi kesim reaksiyonu kuruldu. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntüledi (bk. Şekil 4.44).



Şekil 4.44: shRNA oligo- pLKO.1 klonlamasının kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, 1-4: PSMD4-shRNA, 5-8: angiosidin-shRNA)

Şekil 4.44'da görüldüğü gibi tüm kolonilerden izole edilen plazmitlerin restriksiyon kesimi sonucu büyüklüğü 2 kb ve 5 kb olan bantlar elde edildi. Böylece kolonilerin rekombinant plazmiti taşıdığı doğrulandı. Ayrıca plazmitler ilave doğrulama için dizilemeye gönderildi.

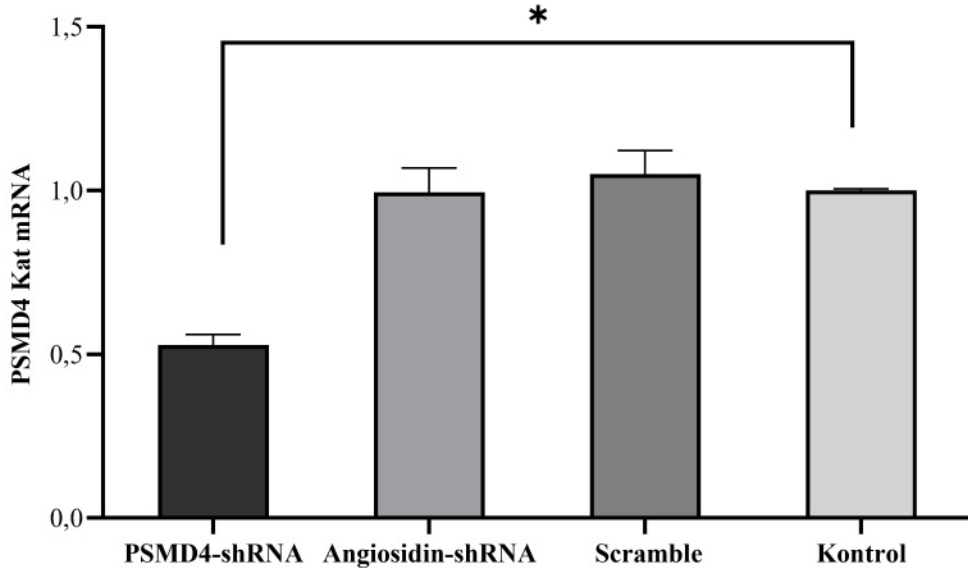
Rekombinant olduğu doğrulanan kolonilerin Bölüm 3.2.2.4’de belirtildiği gibi gliserol stokları hazırlandı ve bu stoklar -80 °C’de muhafaza edildi. Ayrıca bu stoklardan transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere Bölüm 3.2.2.7’de açıklandığı şekilde büyük ölçekte plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler restriksiyon endonükleaz kesimiyle tekrar doğrulandı ve -20 °C’de saklandı.

4.7 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin Susturulması

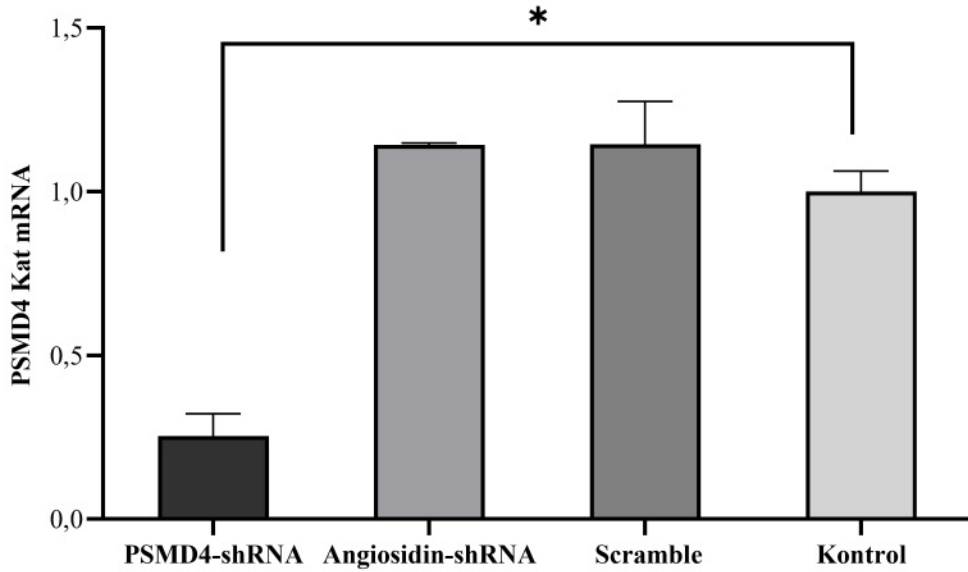
Çalışmada pLKO.1-TRC vektörüne klonlanan PSMD4 ve angiosidin shRNA oligoları, Bölüm 3.2.5’de belirtildiği şekilde transfeksiyonla PANC-1 ve HUVEC hücrelerine aktarıldı. PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki PSMD4 ve angiosidin genlerinin susturulması mRNA ve protein düzeyinde yapılan çalışmalarda belirlendi.

4.7.1 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücre Hatlarında Susturulmasının mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 ve angiosidin genlerini susturmak amacıyla öncelikle transfeksiyon çalışması yapıldı. Bu amaçla birkaç kez pasaj yapılarak büyütülen PANC-1 ve HUVEC hücreleri 25 cm²’lik flasklara, 2x10⁶ hücre/flask olacak şekilde paylaştırılıp bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün PSMD4-shRNA, angiosidin-shRNA ve scramble-shRNA vektörleri Bölüm 3.2.5.2’de belirtilen şekilde ticari transfeksiyon reaktifi kullanılarak hücrelere aktarıldı. PSMD4 ve angiosidin genlerinin susturulmasını mRNA düzeyinde belirlemek amacıyla transfeksiyonun 48. saatinde hücreler yüzeyden kaldırılarak pellet haline getirildi. Bölüm 3.2.12.1’de açıklandığı şekilde hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinin miktarı ve saflığı belirlendikten sonra RT reaksiyonu ile cDNA sentezi yapıldı (bk. Bölüm 3.2.12.5). Bölüm 3.2.12.7’de belirtildiği gibi bu cDNA’lar ile PSMD4 genlerine özgü ekspresyon primerleri kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi. Aynı zamanda bu cDNA’lar ile normalizasyon amaçlı H β -2-M ekspresyon primerleri de çalışıldı. Real-time PCR’da cDNA örneklerinin her biri üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar, Livak metoduna göre değerlendirilip GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testi kullanılarak analiz edildi (bk. Şekil 4.45 ve Şekil 4.46).



Şekil 4.45: PANC-1 hücre hattında gen susturulmasının mRNA seviyesinde gösterilmesi. (*p* değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)



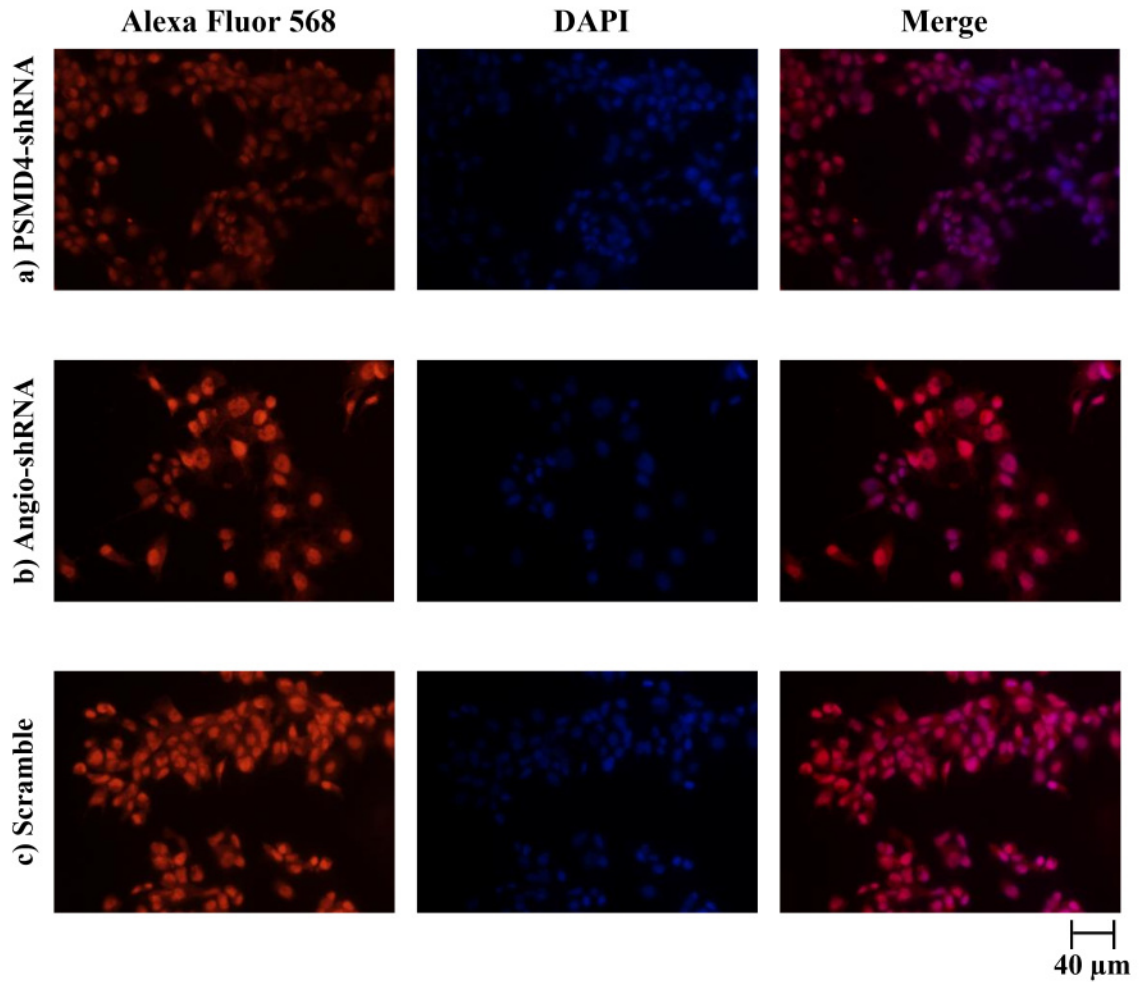
Şekil 4.46: HUVEC hücre hattında gen susturulmasının mRNA seviyesinde gösterilmesi. (*p* değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)

PANC-1 için Şekil 4.45’de, HUVEC için Şekil 4.46’da verilen grafiklere göre kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında sadece PSMD4-shRNA ile susturma yapılan hücrelerde PSMD4 geni mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu angiosidin-shRNA ve scramble uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu.

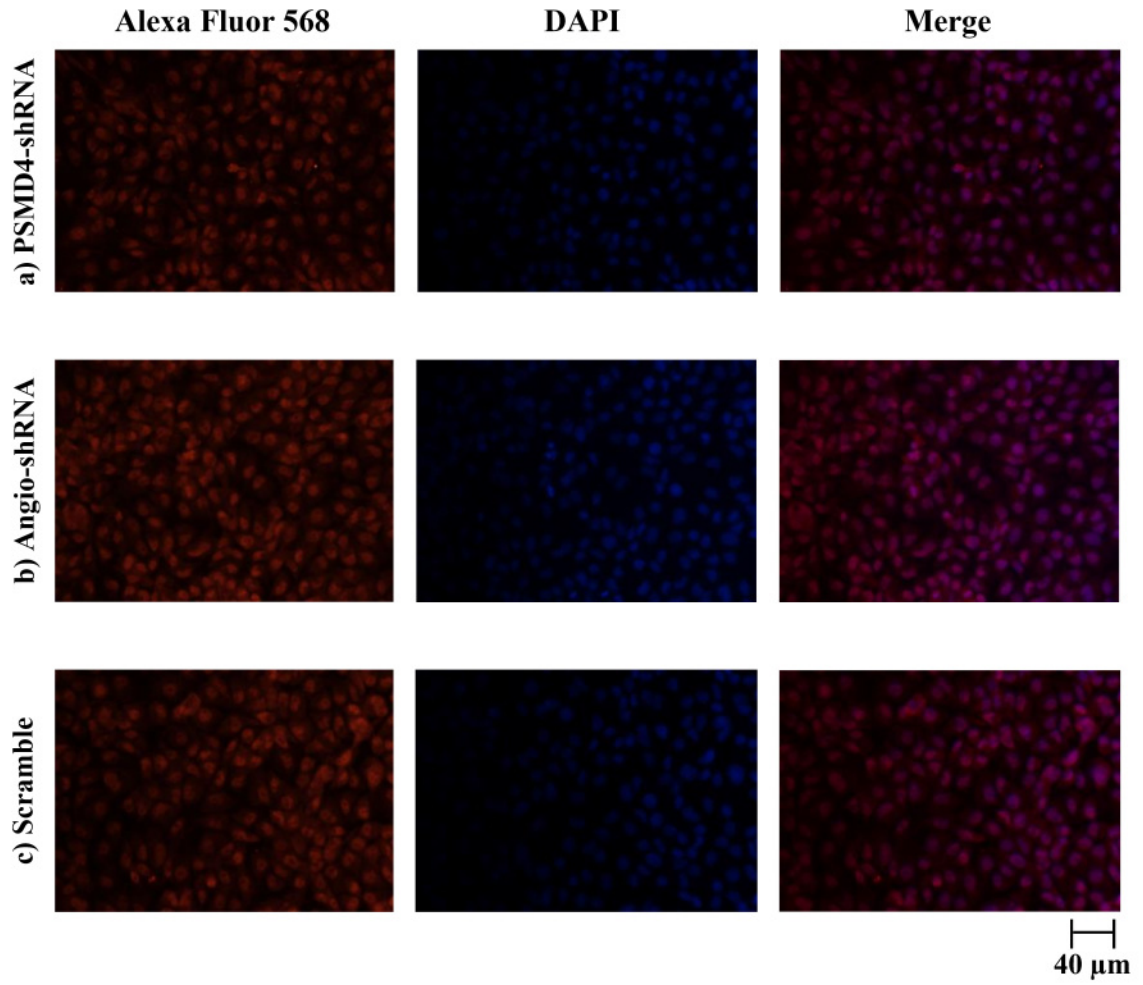
4.7.2 PSMD4 ve Angiosidin Genlerinin PANC-1 ve HUVEC Hücre Hatlarında

Susturulmasının Protein Düzeyinde IFC ile Belirlenmesi

Birkaç kez pasaj yapılarak büyütülen PANC-1 ve HUVEC hücreleri tabanında yuvarlak lameller bulunan 24 kuyucuklu plakaya kuyuda 125×10^3 hücre olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece (16 sa.) inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün PSMD4-shRNA, angiosidin-shRNA ve scramble-shRNA vektörleri Bölüm 3.2.5.2’de açıklandığı gibi transfeksiyonla hücrelere aktarıldı. PSMD4 ve angiosidin genlerinin susturulmasını protein düzeyinde belirlemek için transfeksiyonun 48. saatinde immünofloresan (IFC) tekniği uygulandı. Bölüm 3.2.10.2’de açıklandığı şekilde yapılan işlemler sonunda hazırlanan preparatlar floresan mikroskobu altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi (bk. Şekil 4.47 ve Şekil 4.48).

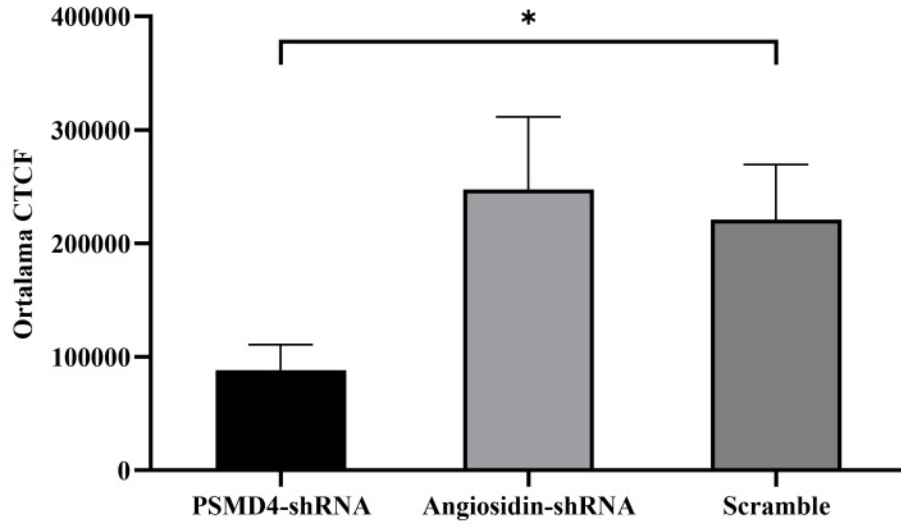


Şekil 4.47: PANC-1 hücrelerinde gen susturulmasının immünofloresan yöntemle görüntülenmesi.

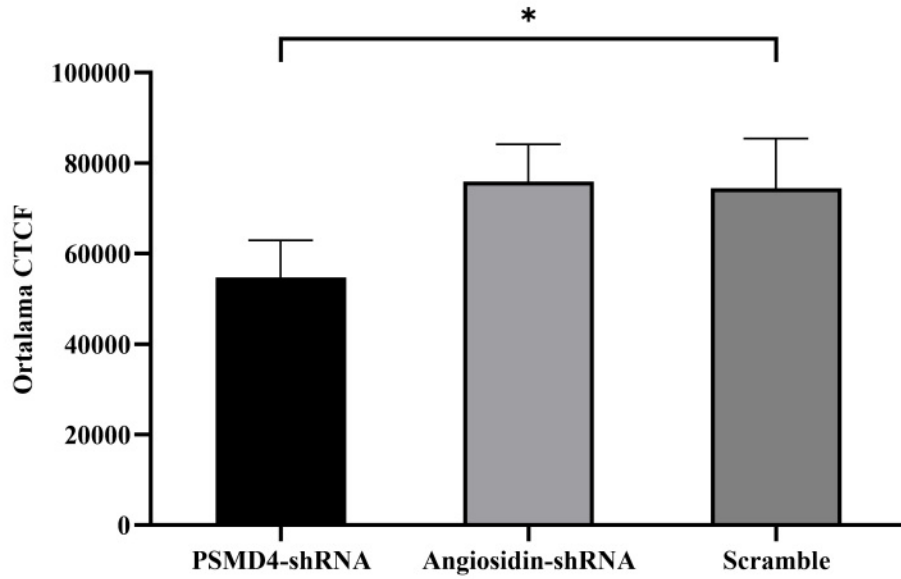


Şekil 4.48: HUVEC hücrelerinde gen susturulmasının immüno Floresan yöntemle görüntülenmesi.

Bir kısmı Şekil 4.47 ve 4.48’de gösterilen Floresan görüntüler ImageJ programında analiz edilerek Floresan miktarı belirlendi. Bölüm 3.2.10.3’de belirtilen şekilde her seferinde görüntüden bir hücre seçilerek alan, integrale yoğunluk ve gri değer ortalaması ölçüldü. Ayrıca normalleştirme amacıyla her görüntüden üç arka plan alanı ölçüldü. Düzeltilmiş toplam hücre Floresansı (CTCF) hesaplanarak sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi ve one-way ANOVA testiyle analiz edildi (bk. Şekil 4.49 ve Şekil 4.50).



Şekil 4.49: PANC-1 hücrelerinde gen susturulmasının floresan sinyal yoğunluğu. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)



Şekil 4.50: HUVEC hücrelerinde gen susturulmasının floresan sinyal yoğunluğu. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

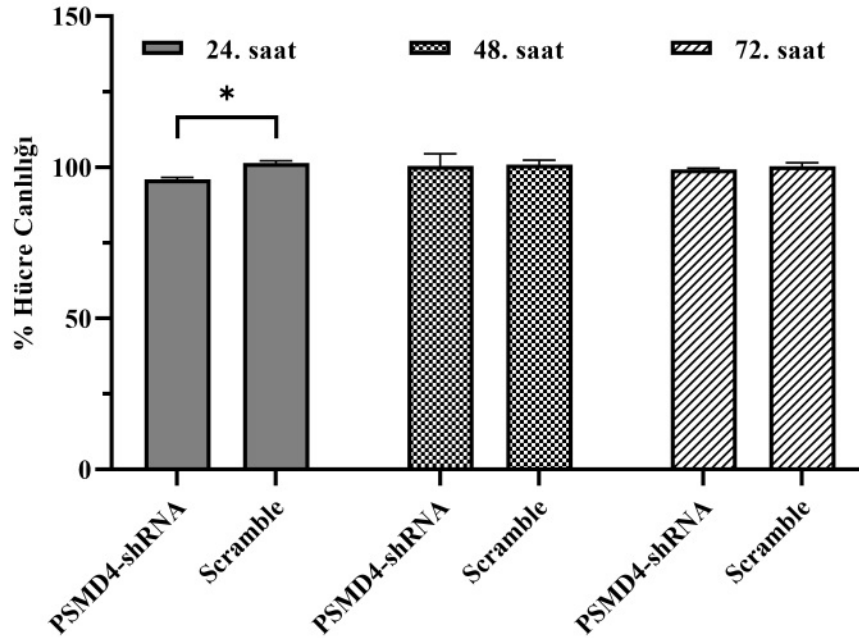
PANC-1 için Şekil 4.49 ve HUVEC için 4.50’de verilen floresan analizi sonuçlarına göre scramble vektörüyle transfekte edilen kontrol gruplarıyla kıyaslandığında sadece PSMD4-shRNA ile transfekte edilen gruplarda sinyal yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Angiosidin-shRNA uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

4.8 PSMD4 Geninin Susturulmasının Hücresel Düzeydeki Etkilerinin Belirlenmesi

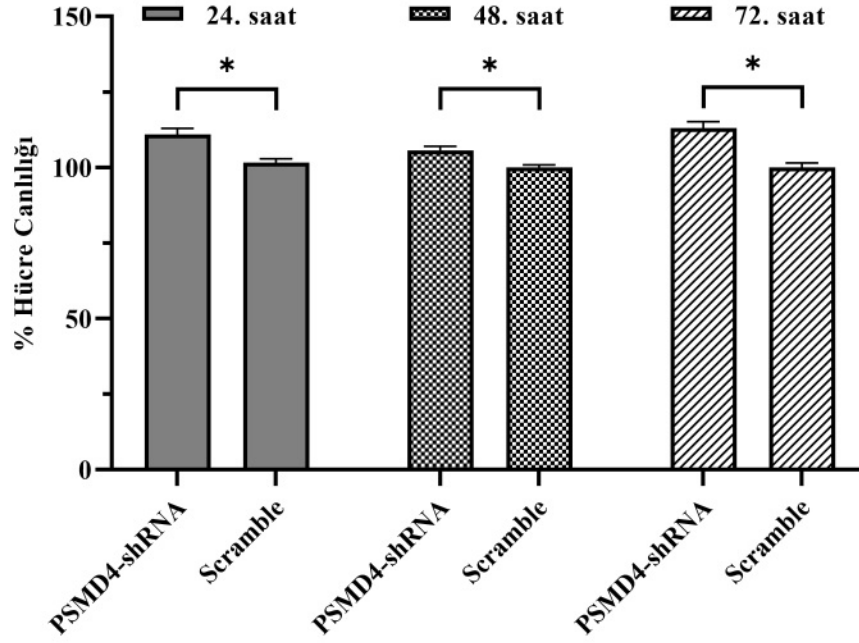
PSMD4 ve angiosidin genlerini PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında susturma çalışmalarında sadece PSMD4-shRNA uygulanan gruplarda gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü. Bu yüzden sadece PSMD4 geni susturulmasının hücrelerdeki canlılığa, göç etme ve koloni oluşturma yeteneklerine etkisi araştırıldı.

4.8.1 PSMD4 Geni Susturulmasının Hücre Sitotoksitesine Etkisinin İncelenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlendi. Bu amaçla PANC-1 ve HUVEC hücreleri 96 kuyucuklu plakaya kuyusunda 20×10^3 hücre olacak şekilde paylaştırılıp 16 sa. inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün Bölüm 3.2.5.2’de belirtilen şekilde PSMD4-shRNA ve scramble-shRNA vektörleri hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 24. 48. ve 72. saatlerinde Bölüm 3.2.7’de açıklandığı şekilde MTT testi yapıldı. Her deney grubundaki örnekler en az 6 tekrarlı çalışıldı. Örneklerin 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanları ölçüldü ve elde edilen değerler kullanılarak hücrelerin yüzde (%) canlılığı hesaplandı. Sonuçlar, GraphPad programında grafiklendirildi ve analiz edildi (bk. Şekil 4.51 ve 4.52).



Şekil 4.51: PANC-1 hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının zamana bağlı hücre canlılığına etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

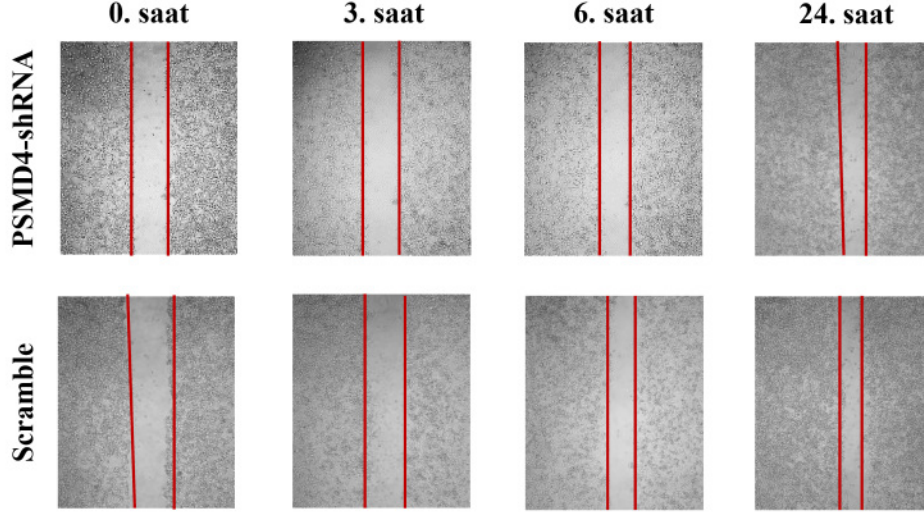


Şekil 4.52: HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının zamana bağlı hücre canlılığına etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

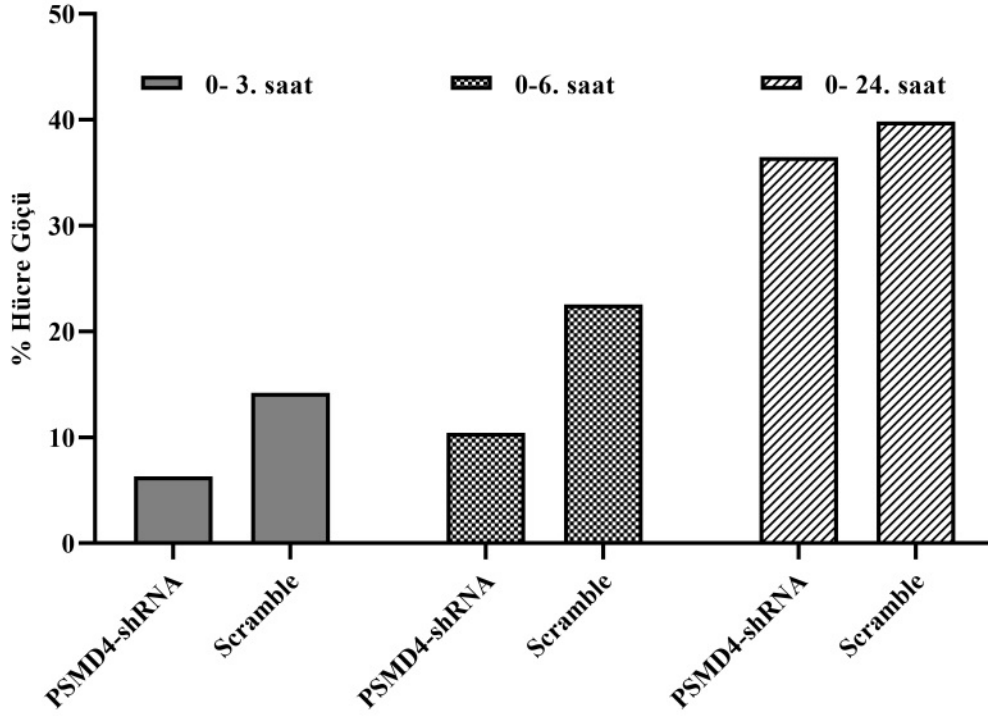
PANC-1 hücreleri için Şekil 4.51'deki grafiğe göre PSMD4 geni susturulan hücrelerde kontrol grubuna kıyasla sadece 24. saatte hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu 48. ve 72. saatlerde ise anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. HUVEC hücreleri için Şekil 4.52'de verilen grafiğe göre PSMD4 geni susturulan hücrelerin kontrol gruplarına kıyasla 24. 48. ve 72. saatlerde canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edildi.

4.8.2 PSMD4 Geni Susturulmasının Hücre Migrasyonuna Etkisinin İncelenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının hücre göçüne etkisini araştırmak için Bölüm 3.2.8'de belirtildiği şekilde scratch testi yapıldı. PANC-1 için Şekil 4.53'da, HUVEC için Şekil 4.55'de verilen farklı zaman aralıklarına ait scratch testi görüntüleri ImageJ programı (MRI Wound Healing Tool eklentisi) ile analiz edildi. Hücrelerin göç etme oranları hesaplanarak GraphPad programında grafiklendirildi (bk. Şekil 4.54 ve 4.56).

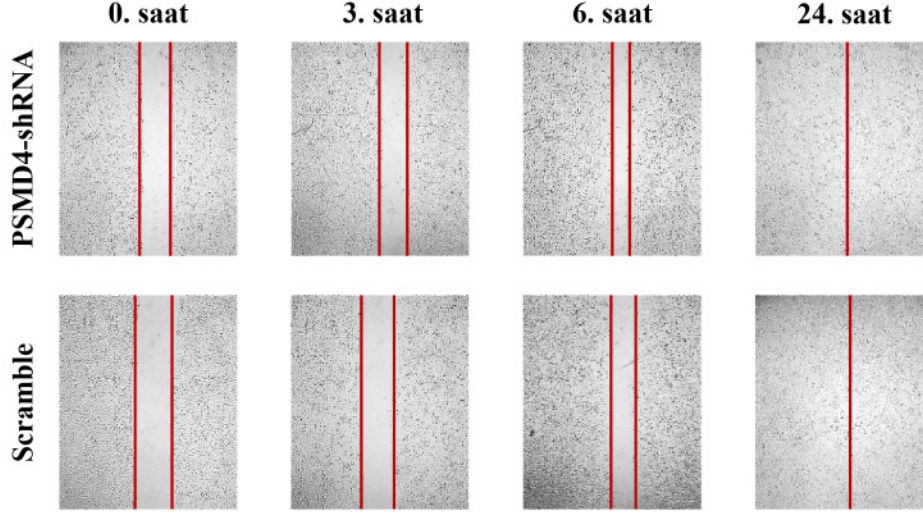


Şekil 4.53: PANC-1 hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının scratch testi görüntüleri.

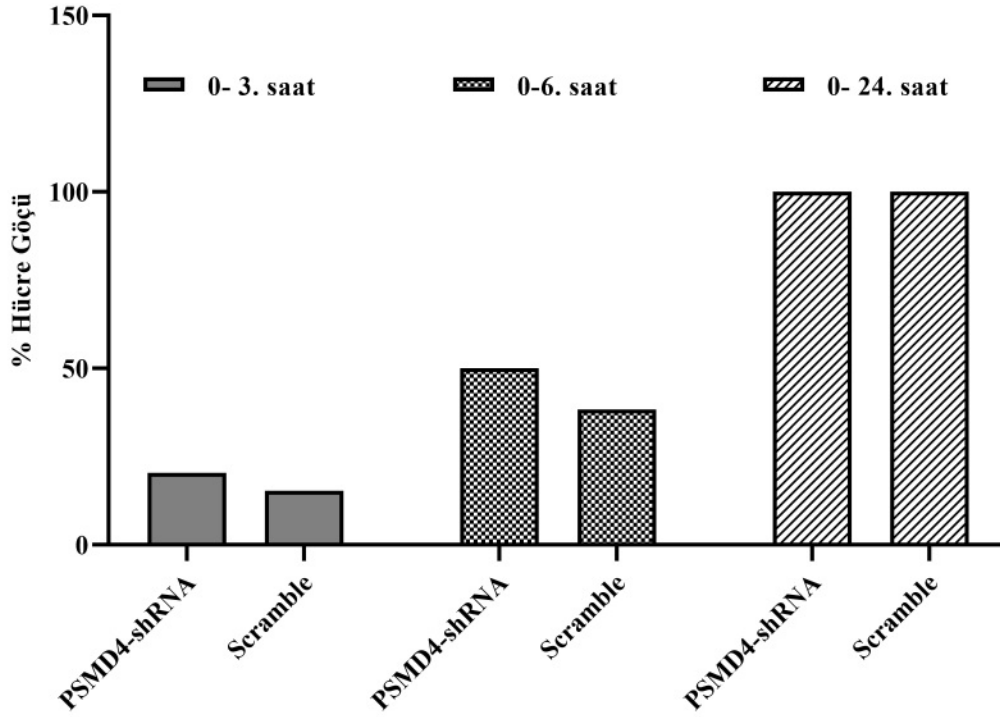


Şekil 4.54: PANC-1 hücrelerinde susturulan PSMD4 geninin hücre göçüne etkisi.

PANC-1 hücrelerinde yapılan scratch testi sonucu (bk. Şekil 4.54) PSMD4 geni susturulan hücrelerin kontrol grubu hücrelerine kıyasla göç etme yeteneğinde bir azalış olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.55: HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının scratch testi görüntüleri.



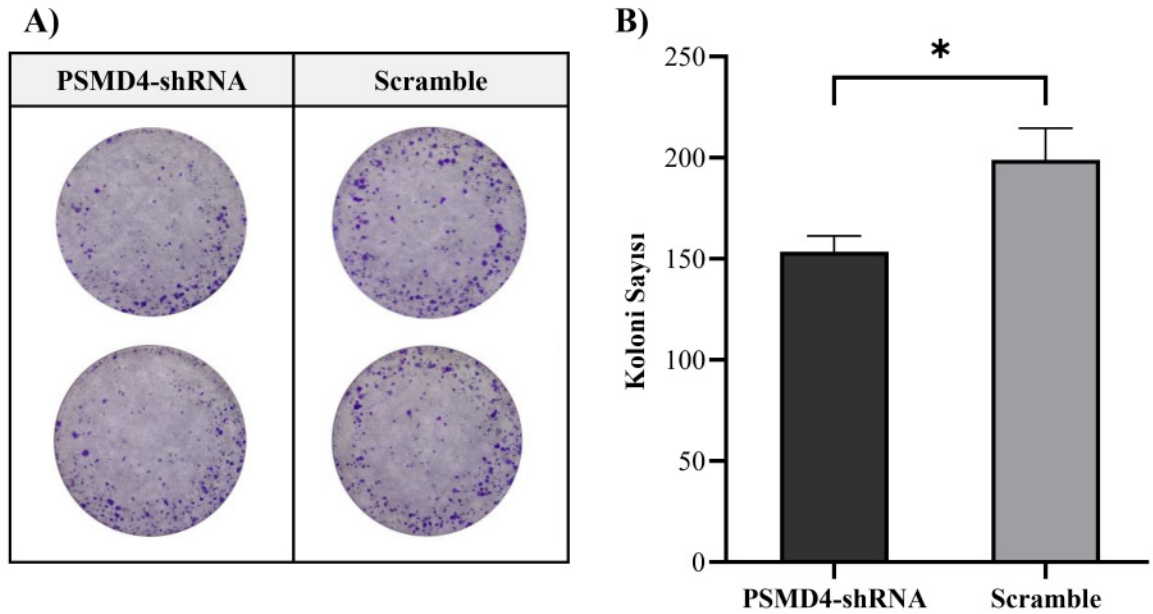
Şekil 4.56: HUVEC hücrelerinde susturulan PSMD4 geninin hücre göçüne etkisi.

HUVEC hücrelerinde yapılan scratch testi sonucu (bk. Şekil 4.56) PSMD4 geni susturulan hücrelerin kontrol grubuna kıyasla 3. ve 6. saatlerde göç etme yeteneğinde bir artış olduğu tespit edilmiştir. 24. saatte deney ve kontrol hücreleri çizdiği tamamen kapattığı için belirgin fark tespit edilemedi.

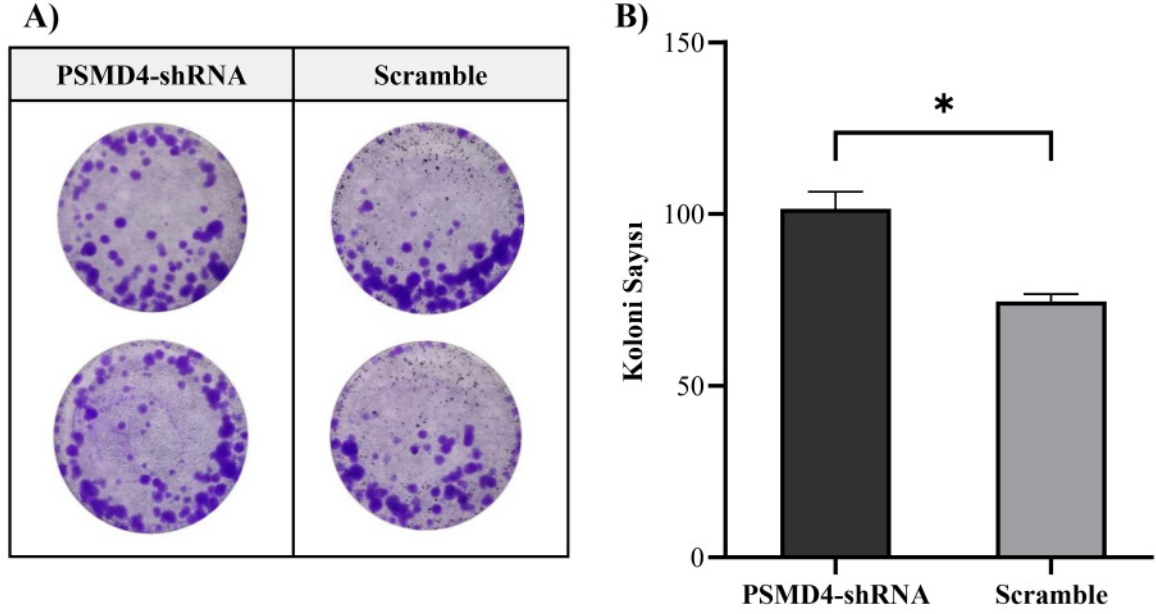
4.8.3 PSMD4 Geni Susturulmasının Hücrelerin Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisinin İncelenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının hücrelerin koloni oluşturma yeteneğine etkisini araştırmak için koloni formasyon testi yapıldı. Bu amaçla hücreler (PANC-1 için 1000 hücre/kuyu, HUVEC için 500 hücre/kuyu) 6 kuyucuklu plakaya en az 3 tekrarlı olacak şekilde paylaştırıldı ve 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün Bölüm 3.2.5.2’de belirtilen şekilde PSMD4-shRNA ve scramble-shRNA vektörleri hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 72. saatinde transfeksiyon işlemi tekrar edildi. Kuyucuklarda yeterli yoğunlukta koloni oluşumu görüldüğü zaman (ilk transfeksiyondan ~7-10 gün sonra) tam besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 1X PBS ile yıkandı. Koloniler metanol ile sabitlendikten sonra kristal viyole çözeltisiyle boyandı. Kuyucuklardaki fazlalık boya uzaklaştırılıp ortam kurutulduktan sonra koloniler görüntülenip fotoğraflandı.

Koloni formasyon testi sonucu elde edilen görüntülerdeki koloniler CellCounter programı kullanılarak sayıldı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirildi ve analiz edildi (bk. Şekil 4.57 ve 4.58).



Şekil 4.57: PANC-1 hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının koloni oluşumuna etkisi. (A: Koloni görüntüleri, B: Koloni sayısı ve analizi $p < 0,05$ (*) ile gösterildi.)



Şekil 4.58: HUVEC hücrelerinde PSMD4 geni susturulmasının koloni oluşumuna etkisi. (A: Koloni görüntüleri, B: Koloni sayısı ve analizi $p < 0,05$ (*) ile gösterildi.)

PANC-1 hücrelerinde yapılan koloni formasyon testi sonucu (bk. Şekil 4.57) analiz edildiğinde kontrol grubu hücrelerine göre PSMD4 geni susturulan hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu tespit edildi. HUVEC hücrelerinde yapılan koloni formasyon testi analiz edildiğinde ise (bk. Şekil 4.58) kontrol grubu hücrelerine göre PSMD4 geni susturulan hücrelerin koloni oluşturma yeteneğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir.

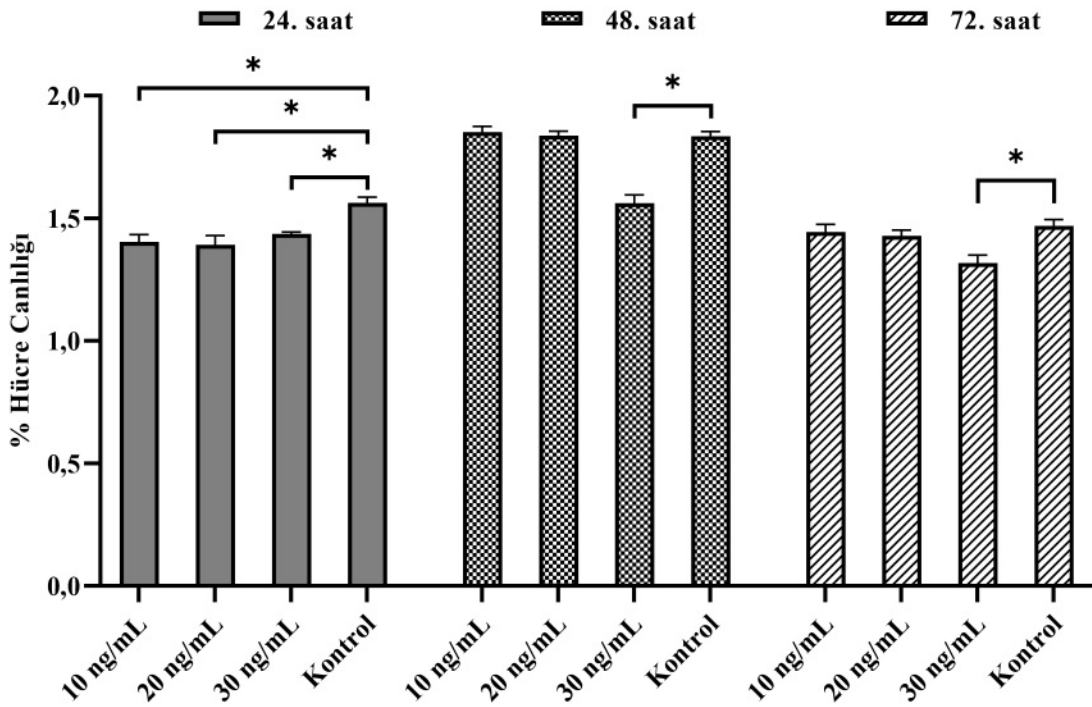
4.9 İnsan PSMD4 Geninin VEGF Sitokini ile Regülasyonu

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde VEGF-A₁₆₅ sitokininin PSMD4 geninin ekspresyonuna etkisi araştırıldı. Öncelikle çeşitli dozlardaki VEGF sitokininin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi tespit edildi. Daha sonra optimum dozda VEGF kullanılarak sitokin deneyleri kuruldu. Son aşamada ise PSMD4 geninin ekspresyonu mRNA ve protein düzeyinde yapılan çalışmalarla belirlendi.

4.9.1 VEGF Sitokininin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

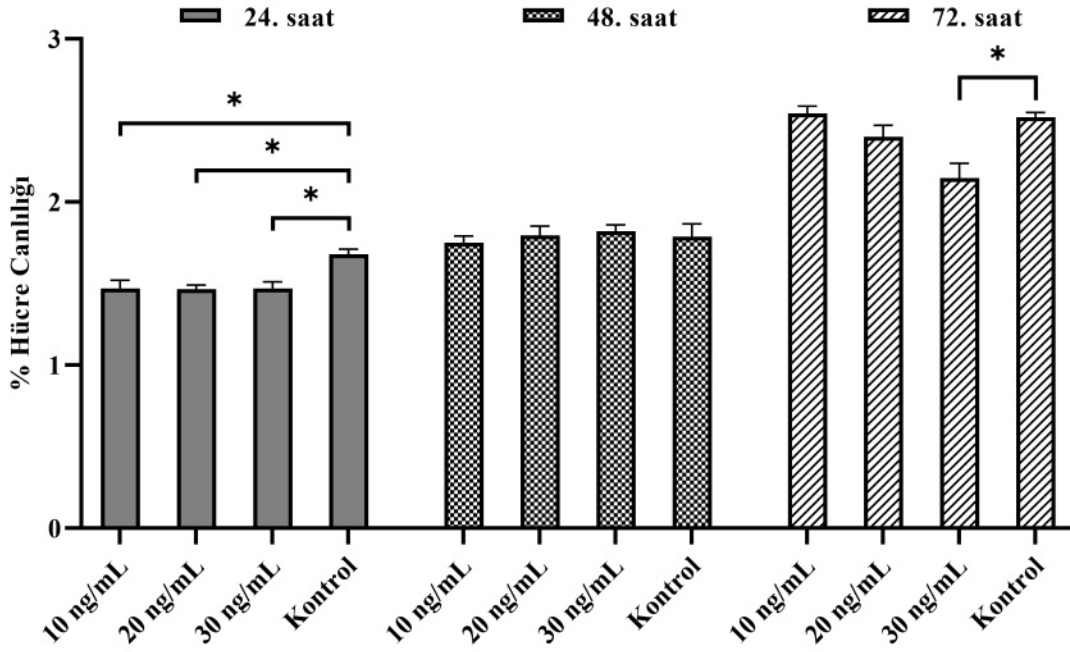
Çeşitli dozlardaki VEGF sitokininin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. Bu amaçla PANC-1 ve HUVEC hücreleri 96 kuyucuklu plakaya 20×10^3

hücre/kuyu olacak şekilde tam besiyeri (%10 FCS içeren DMEM) içinde paylaştırıldı ve bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün Bölüm 3.2.4.8’de belirtildiği gibi sitokin deneyleri kuruldu. Hücrelerden tam besiyeri uzaklaştırılıp kuyulara %0,1 (w/v) BSA’lı DMEM eklendi ve bir saat inkübasyona bırakıldı. Devamında kontrol grubu hariç diğer kuyulara son konsantrasyonu 10, 20 ve 30 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulandı ve inkübasyona devam edildi. İnkübasyonun 24. 48. ve 72. saatlerinde Bölüm 3.2.7’de açıklandığı gibi MTT testi uygulandı. Her deney grubundaki örnekler en az 3 tekrarlı çalışıldı. Örneklerin spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip one-way ANOVA testiyle analiz edildi.



Şekil 4.59: PANC-1 hücrelerinde farklı dozlardaki VEGF sitokininin sitotoksik etkisi. (p değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)

Şekil 4.59’deki MTT analizi grafiğine göre PANC-1 hücrelerinde 24. saatte tüm sitokin dozlarının sitotoksik etkisi ($p < 0,05$) vardır. Ancak bu etki çok belirgin değildir. 48. ve 72. saatlerde ise sadece 30 ng/mL olan sitokin dozunda sitotoksik etki ($p < 0,05$) görülmektedir. Bu sonuçlara göre PANC hücreleri için sitokin deneylerinde 20 ng/mL VEGF-A₁₆₅ kullanılmasının uygun olduğu tespit edildi.



Şekil 4.60: HUVEC hücrelerinde farklı dozlardaki VEGF sitokininin sitotoksik etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

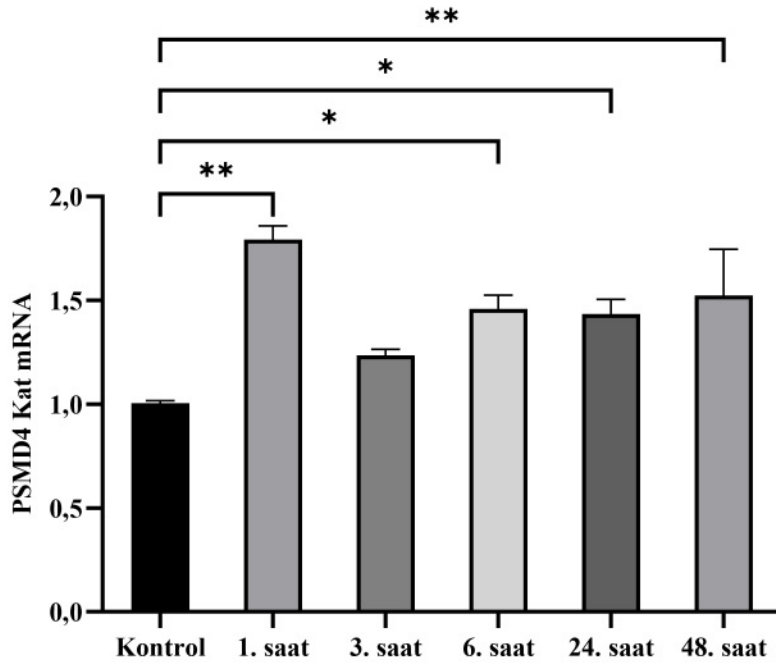
Şekil 4.60 verilen MTT analizi grafiğine göre HUVEC hücrelerinde 24. saatte tüm sitokin dozlarının sitotoksik etkisi ($p < 0,05$) vardır. Ancak bu etki çok belirgin değildir. 48. Saatte anlamlı bir sitotoksik etki görülmezken 72. saatte ise sadece 30 ng/mL olan sitokin dozunda sitotoksik etki ($p < 0,05$) görülmektedir. Bu sonuçlara göre HUVEC hücreleri için sitokin deneylerinde 20 ng/mL VEGF- A_{165} kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

4.9.2 VEGF Sitokininin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerinde PSMD4 Genine Etkisinin mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 ekspresyonuna etkilerini belirlemek için Bölüm 3.2.4.8’de belirtildiği şekilde sitokin uygulama çalışması yapıldı. Bu amaçla birkaç kez pasaj yapıp büyütülen PANC-1 ve HUVEC hücreleri tam besiyeri kullanılarak 25 cm²’lik flasklara (2×10^6 hücre/flask) paylaştırıldı ve bir gece (16 sa.) inkübasyon yapıldı. Ertesi gün flasklardan tam besiyeri uzaklaştırılıp hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı ve flasklara %0,1 (w/v) BSA içeren DMEM eklendi. Flasklar inkübatöre kaldırılıp 1 saat bekletildikten sonra kontrol grubu hariç diğer flasklara son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulandı. Flasklar tekrar inkübatöre kaldırdı ve inkübasyonun 1., 3., 6., 24. ve 48. saatlerinde hücreler kaldırılarak pellet haline getirildi.

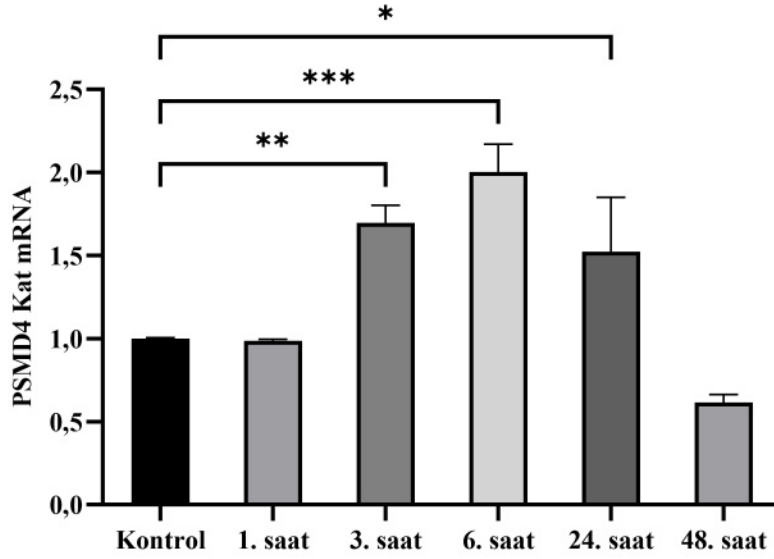
Bölüm 3.2.12.1’de açıklandığı şekilde hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı. RNA örneklerinin miktarı ve saflığı belirlendikten sonra her bir örnekten 1 µg kalıp RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı (bk. Bölüm 3.2.12.5). Elde edilen cDNA’ların kalite kontrolü yapıldıktan sonra Bölüm 3.2.12.7’de belirtildiği şekilde real-time PCR gerçekleştirildi.

PSMD4 geninin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesini belirlemek için her bir cDNA örneğine (3 tekrarlı olacak şekilde) PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleri (bk. Tablo 3.15) ile real-time PCR yapıldı. Elde edilen Ct değerleri Livak metoduna göre değerlendirildi. Sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip one-way ANOVA testi kullanılarak analizi yapıldı (bk. Şekil 4.61 ve 4.62).



Şekil 4.61: PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi. ($p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**))

PANC-1 hücreleri için Şekil 4.61’de verilen grafik değerlendirildiğinde; kontrol grubuna kıyasla VEGF sitokini uygulanan gruplarda PSMD4 geni mRNA ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. VEGF uygulamasını takip eden 1. saatten itibaren gözlenen bu artışın 48. saate kadar devam ettiği belirlenmiştir.



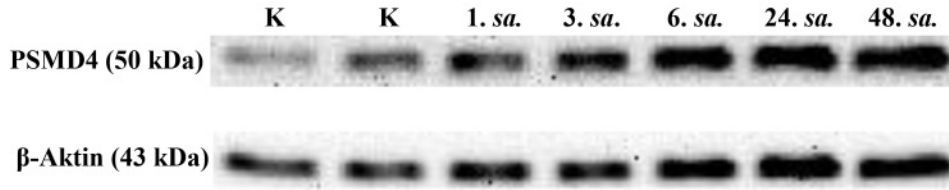
Şekil 4.62: HUVEC hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi. ($p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**), $< 0,001$ (***))

Şekil 4.62’de HUVEC hücreleri için verilen grafiğe göre VEGF sitokini uygulaması; kontrol grubuna kıyasla 3. saatten itibaren PSMD4 geni mRNA ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır. 48. saatte gözlenen azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

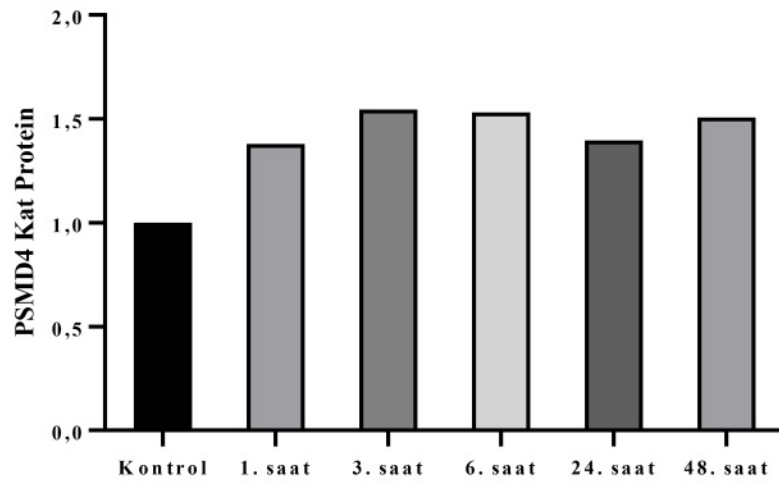
4.9.3 VEGF Sitokininin PANC-1 ve HUVEC Hücrelerinde PSMD4 Genine Etkisinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerine Bölüm 3.2.4.8’de açıklandığı gibi son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulaması yapıldı. Uygulamanın 1., 3., 6., 24. ve 48. saatlerinde hücreler kaldırılarak pellet haline getirildi. PSMD4 geninin protein düzeyindeki ekspresyon seviyesini belirlemek için Bölüm 3.2.13.1’de belirtildiği şekilde Western blot yöntemi kullanıldı. Bu amaçla RIPA tamponuyla hücre pelletlerinden proteinler ekstrakte edildi (bk. Bölüm 3.2.13.2). Protein miktarı belirlenen örnekler, Bölüm 3.2.13.4’de bahsedildiği gibi jele yüklenerek SDS-PAGE’de yürütüldü ve devamında jeldeki proteinler PVDF membrana transfer edildi (bk. Bölüm 3.2.13.5). Daha sonra membrandaki proteinler PSMD4 proteinine özgü antikorlarla muamele edilerek işaretlendi. Benzer şekilde normalizasyon amacıyla β -aktin proteinine özgü antikorlarla işaretleme yapıldı. İşaretlenmiş proteinler ECL Western blot substratı kullanılarak UVP sisteminde görüntülenip fotoğraflandı. Şekil 4.63 ve 4.65’de gösterilen PSMD4 ve β -aktin protein

bantlarının ImageJ programında densitometrik analizi yapıldı. PSMD4 sonuçları β -aktin ile normalize edilerek GraphPad programında grafiklendirildi (bk. Şekil 4.64 ve 4.66).



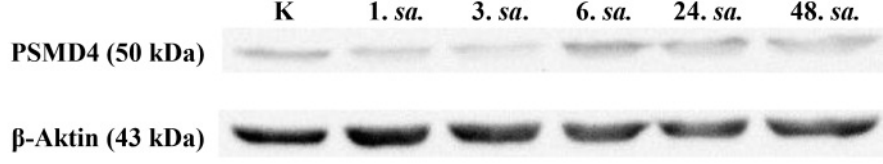
Şekil 4.63: PANC-1 hücrelerinde yapılan sitokin deneyi protein bantları.



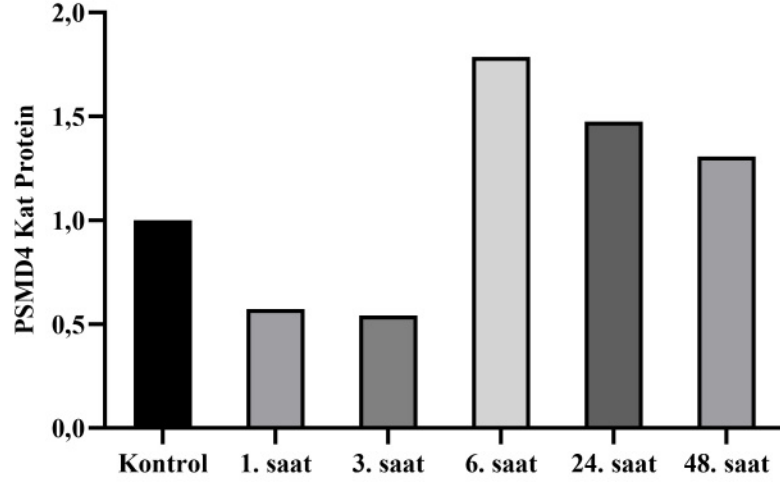
Şekil 4.64: PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi.

PANC-1 hücreleri için Şekil 4.64’de verilen grafik incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla VEGF sitokini uygulanan gruplarda PSMD4 protein ekspresyon seviyesinde bir artış olduğu tespit edilebilir. Sitokin uygulamasını takip eden 1. saatten itibaren gözlenen bu artış 48. saate kadar devam etmektedir. Benzer şekilde Şekil 4.66’da HUVEC hücreleri için verilen grafik değerlendirildiğinde VEGF uygulamasını takip eden 6. saatten itibaren PSMD4 protein ekspresyon seviyesinde bir artış olduğu görülmektedir.

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde VEGF sitokini uygulaması sonrası PSMD4 protein düzeyinde elde edilen bu sonuçlar, mRNA düzeyindeki sonuçları desteklemektedir.



Şekil 4.65: HUVEC hücrelerinde yapılan sitokin deneyi protein bantları.



Şekil 4.66: HUVEC hücrelerinde VEGF sitokininin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine zamana bağlı etkisi.

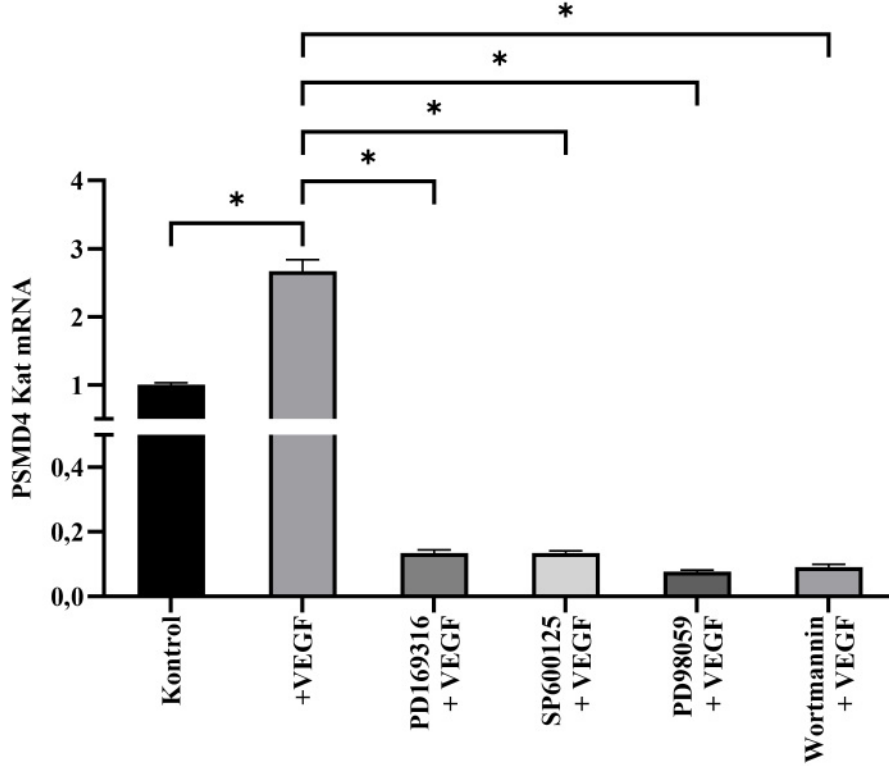
4.10 Yolak İnhibisyon Çalışmaları

PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında yapılan çalışmalarda VEGF sitokininin PSMD4 geni ekspresyonunda mRNA ve protein düzeyinde bir artışa neden olduğu belirlendi. VEGF sitokininin PSMD4 geni regülasyonunu hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiğini tespit etmek amacıyla yolak inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla öncelikle VEGF ve çeşitli yolak inhibitörleri kullanılarak inhibisyon deneyleri kuruldu. Daha sonra ise inhibitörlerin PSMD4 gen ekspresyonuna etkisi mRNA ve protein düzeyinde yapılan çalışmalarla belirlendi.

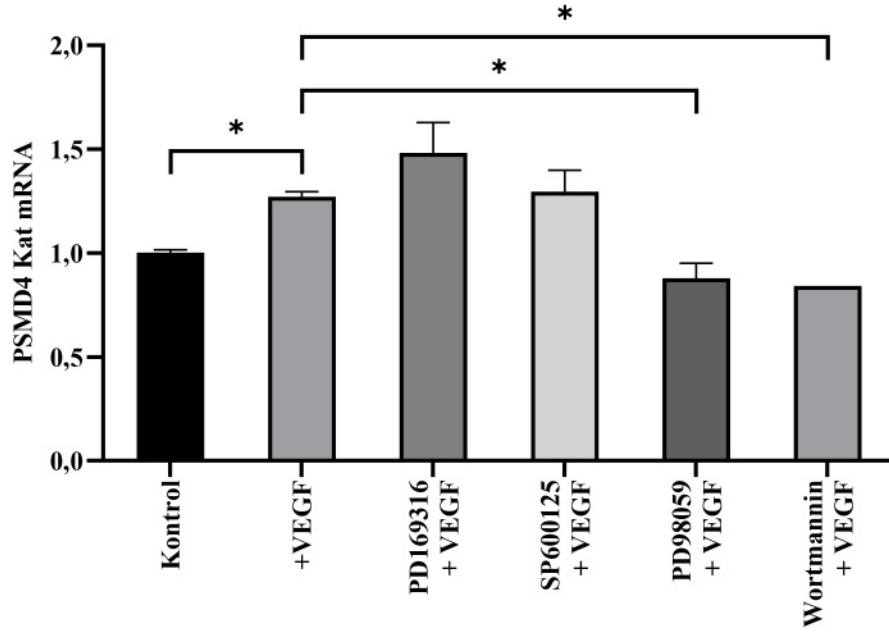
4.10.1 VEGF Sitokininin PSMD4 Regülasyonunda Kullandığı Yolların mRNA Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde inhibitörlerin PSMD4 gen ekspresyonuna etkisini belirlemek için Bölüm 3.2.4.9'da belirtildiği şekilde yolak inhibisyon deneyleri kuruldu. Bu amaçla birkaç kez pasaj yapıp büyütülen PANC-1 ve HUVEC hücreleri tam besiyeri kullanılarak 25 cm²'lik flasklara (2x10⁶ hücre/flask) paylaştırıldı ve bir gece (16 sa.)

inkübasyona bırakıldı. Sonraki gün flasklardan tam besiyeri uzaklaştırılıp hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandı ve flasklara %0,1 (w/v) BSA içeren DMEM konuldu. Flasklar inkübatöre kaldırılıp 1 saat bekletildikten sonra kontrol ve sadece sitokin uygulanacak gruplar hariç diğer flasklara, PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü), PD98059 (MEK inhibitörü) ve Wortmannin (PI3K inhibitörü) uygulandı (son konsantrasyonları için bk. Tablo 3.8). Flasklar 45 dk. inkübatörde bekletildikten sonra kontrol grubu hariç diğer flasklara son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulandı. Flasklar tekrar inkübatöre kaldırıldı ve inkübasyonun 6. saatinde hücreler kaldırılarak pellet haline getirildi. Daha sonra bu hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapıldı (bk. Bölüm 3.2.12.1). RNA örneklerinin miktarı ve saflığı belirlendikten sonra RT reaksiyonu ile cDNA sentezi yapıldı (bk. Bölüm 3.2.12.5). PSMD4 geninin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyesini belirlemek için Bölüm 3.2.12.7’de açıklandığı şekilde real-time PCR yapıldı. Her bir örneğin cDNA’sı 3 tekrarlı olacak şekilde PSMD4 ve H β -2-M geni ekspresyon primerleri (bk. Tablo 3.15) çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi ve GraphPad programında grafiklendirilip one-way ANOVA testi kullanılarak analizi yapıldı (bk. Şekil 4.67 ve 4.68).



Şekil 4.67: PANC-1 hücrelerinde inhibitörlerin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine etkisi. (*p* değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)



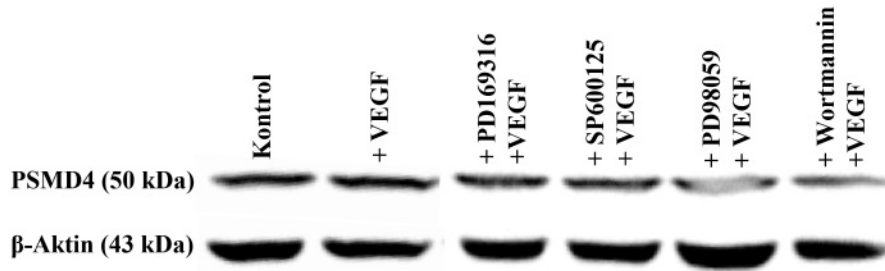
Şekil 4.68: HUVEC hücrelerinde inhibitörlerin PSMD4 mRNA ekspresyon seviyesine etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

PANC-1 hücreleri için Şekil 4.67’de verilen grafiğe göre kontrol grubuna kıyasla VEGF uygulanan grupta PSMD4 mRNA ekspresyonunu artmaktadır ($p < 0,05$). Ancak P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri ile birlikte VEGF uygulaması yapılan gruplarda ise VEGF’in arttırıcı etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi. HUVEC hücreleri için Şekil 4.68’de verilen grafik incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla VEGF uygulanan grupta PSMD4 mRNA ekspresyonunda artış ($p < 0,05$) görülmektedir. Ancak sadece MEK ve PI3K inhibitörleri çalışılan gruplarda VEGF’in arttırıcı etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlendi. P38 MAP kinaz ve JNK inhibitörlerinin çalışıldığı gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.

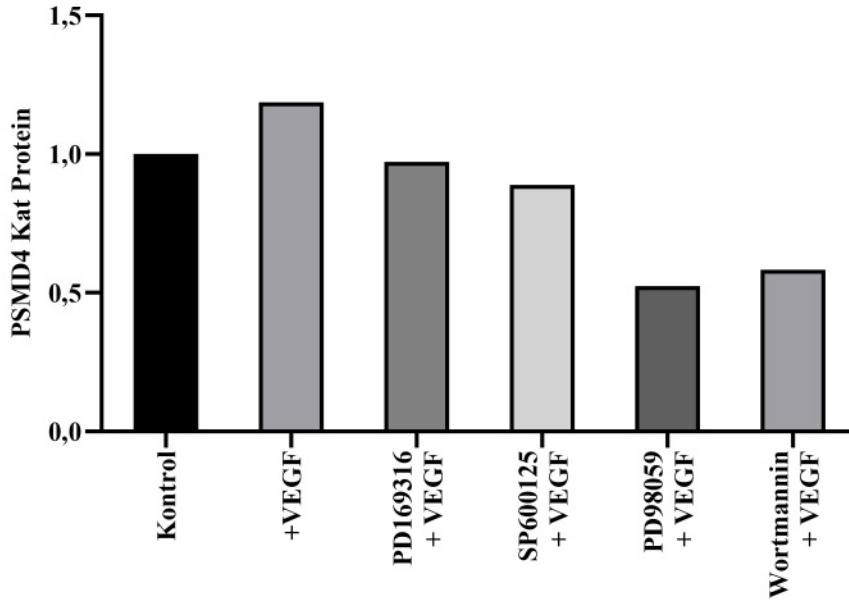
4.10.2 VEGF Sitokininin PSMD4 Regülasyonunda Kullandığı Yolakların Protein Düzeyinde Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücrelerine Bölüm 3.2.4.9’da belirtildiği şekilde PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü), PD98059 (MEK inhibitörü) ve Wortmannin (PI3K inhibitörü) uygulaması yapıldı. Hücreler 45 dk. inkübe edildikten sonra kontrol grubu hariç diğerlerine VEGF sitokini uygulandı. Hücreler 6 saat daha inkübe edildikten sonra kaldırılarak pellet halinde getirildi. Bu hücre pelletlerinden proteinler ekstrakte edildi ve örneklerin protein miktarı belirlendi. Protein örnekleri Bölüm

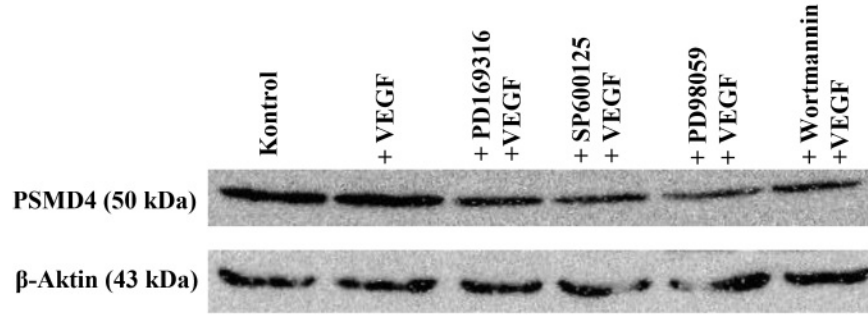
3.2.13.4’de açıklandığı gibi jele yüklenerek SDS-PAGE’de yürütüldü ve devamında jeldeki proteinler PVDF membrana transfer edildi (bk. Bölüm 3.2.13.5). Daha sonra membrandaki proteinler PSMD4 proteinine özgü antikorlarla muamele edilerek işaretlendi. Benzer şekilde normalizasyon amacıyla β -aktin proteinine özgü antikorlarla işaretleme yapıldı. İşaretlenmiş proteinler ECL Western blot substratı kullanılarak UVP sisteminde görüntülenip fotoğraflandı. Şekil 4.69 ve 4.71’de gösterilen PSMD4 ve β -aktin protein bantlarının ImageJ programında densitometrik analizi yapıldı. PSMD4 sonuçları β -aktin ile normalize edilerek GraphPad programında grafiklendirildi (bk. Şekil 4.70 ve 4.72).



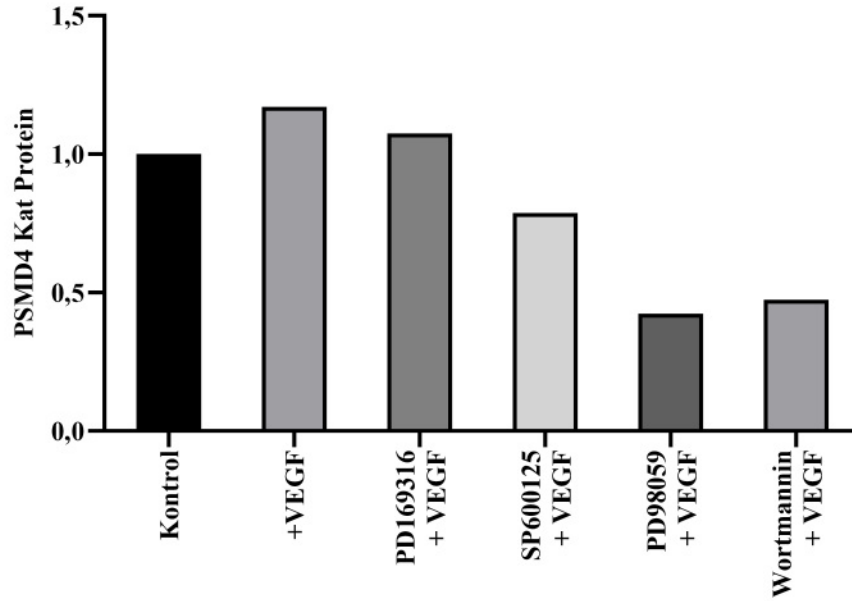
Şekil 4.69: PANC-1 hücrelerinde yapılan yolak inhibisyon deneyi protein bantları.



Şekil 4.70: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine etkisi.



Şekil 4.71: HUVEC hücrelerinde yapılan yolak inhibisyon deneyi protein bantları.



Şekil 4.72: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin PSMD4 protein ekspresyon seviyesine etkisi.

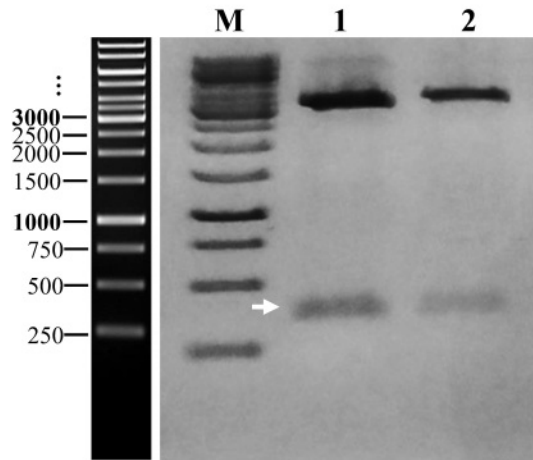
PANC-1 hücreleri için Şekil 4.70’de verilen grafiğe göre kontrol grubuyla kıyaslandığında VEGF uygulaması yapılması PSMD4 protein ekspresyonunu arttırmıştır. Ancak P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri ile birlikte VEGF uygulaması yapılması (sadece VEGF artışına kıyasla) PSMD4 protein ekspresyonunu azaltmıştır. Özellikle MEK ve PI3K inhibitörleriyle çalışılan gruplardaki azalma daha belirgindir. Şekil 4.72’de HUVEC hücreleri için verilen grafik incelendiğinde PANC-1 hücreleriyle benzer sonuçlar elde edildiği görülebilir. Her iki hücre hattı için protein ve mRNA düzeyinde elde edilen yolak inhibisyon sonuçları birbirini desteklemektedir. Muhtemelen her iki hücre hattında da VEGF sitokini, P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K yolları üzerinden PSMD4 gen regülasyonunu sağlamaktadır.

4.11 İnsan PSMD4 Geni Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitesinin İncelenmesi

İnsan PSMD4 genine ait promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi salınan sistem lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Bu amaçla PSMD4 geni P1: 150 bç (-98/+52) ve P3: 683 bç (-631/+52) promotor parçaları Uzman Gizem DAYI tarafından pMetLuc-reporter vektörüne klonlanmıştır [48]. P2: 326 bç (-274/+52) promotor parçası ise bu çalışmada klonlanmıştır. pMetLuc-reporter vektöründeki PSMD4 promotor parçaları PANC-1 ve HUVEC hücrelerine transfeksiyonla aktarılıp bazal aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesine VEGF sitokininin ve çeşitli yolak inhibitörlerinin etkisi araştırıldı.

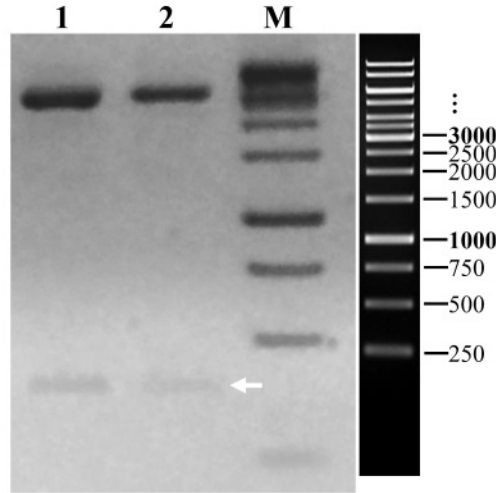
4.11.1 PSMD4 Geni P2: 326 bç (-274/+52) Promotor Parçasının pMetLuc-Reporter Vektörüne Klonlanması

PSMD4 genine ait 683 bç'lik promotor parçasının kalıp olarak kullanıldığı PCR yapıldı. Bölüm 3.2.3.3'de belirtildiği gibi hazırlanan reaksiyonda 326 bç ürün veren ileri (5'-CTC GAG GGA ATC GAC ACA GCA ACT-3') ve geri (5'-TTC GAA CAT CTT GCC ACC TTC CTC C-3') primerleri kullanıldı. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi ve bantlar Bölüm 3.2.3.5'de açıklandığı şekilde agaroz jelden geri kazanıldı. Geri kazanılan PCR ürünleri ile pGEM-T Easy vektörüne ligasyon reaksiyonu (bk. Bölüm 3.2.3.7) kuruldu. Ligasyon ürünleri kompetent hücrelere transforme edilerek rekombinant koloniler araştırıldı. Bu amaçla kolonilerden ön kültür hazırlanarak plazmit izolasyonu yapıldı ve plazmitlere *SacII* ve *PstI* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kuruldu. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi.



Şekil 4.73: P2: 326 bç promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, 1-2. koloni kesim ürünleri)

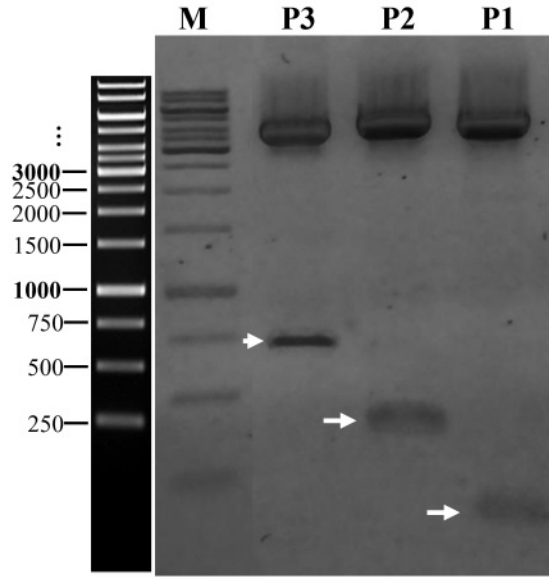
pGEM-T Easy vektörüne klonlandığı doğrulanmış (bk. Şekil 4.73) P2 promotor parçası alt klonlama ile pMetLuc-reporter vektörüne aktarıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.3.6 açıklandığı gibi P2 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörüne *SacII* ve *PstI* enzimleriyle restriksiyon endonükleaz kesimi yapıldı. Benzer şekilde pMetLuc-reporter vektörü de aynı restriksiyon enzimleriyle kesilerek lineer hale getirildi. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve bantlar geri kazanıldı. Elde edilen P3 promotor insertlerini lineer haldeki pMetLuc-reporter vektörüne bağlamak için ligasyon kuruldu (bk. Bölüm 3.2.3.7). Ligasyon ürünleri Bölüm 3.2.2.3’de bahsedildiği gibi kompetent hücrelere transforme edilerek rekombinant koloniler araştırıldı. Bu amaçla kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı ve plazmitlere *SacII* ve *PstI* restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu kuruldu. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi (bk. Şekil 4.74).



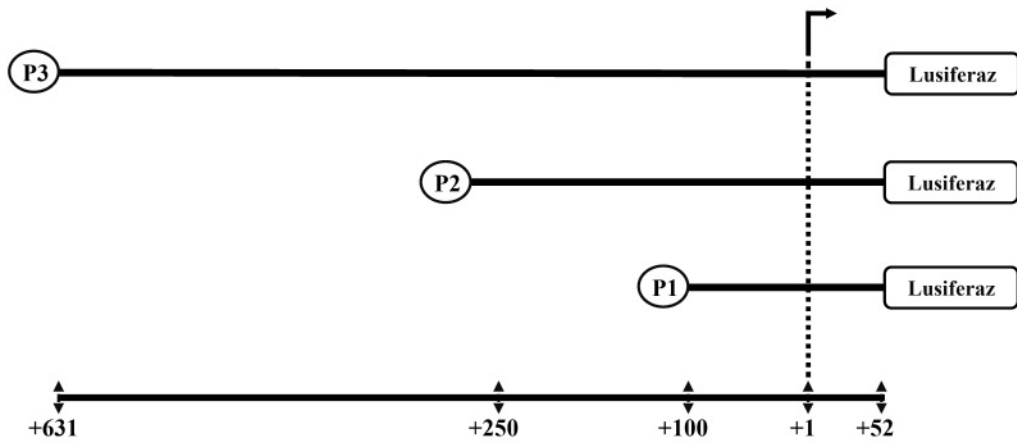
Şekil 4.74: P2 promotor parçasını içeren pMetLuc-reporter vektörü kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, 1-2. koloni kesim ürünleri)

Şekil 4.74’de görüldüğü gibi iki kolonide rekombinant plazmidi taşıdığı doğrulanmıştır. 1. koloniden izole edilen plazmit ilave doğrulama için BM Lab. Sistemleri firmasına dizilemeye yollandı. Ayrıca kontrol amacıyla P1 ve P3 promotor parçalarını içeren pMetLuc-reporter plazmitleri de dizilemeye gönderildi. Promotor parçalarının dizileme sonuçları gen bankasındaki PSMD4 dizisiyle (NCBI Ref. Seq.: NG_029700.1) blast yapılarak karşılaştırıldı (bk. EK G). P1, P2 ve P3 promotor parçalarını taşıdığı doğrulanmış pMetLuc-reporter plazmitleri kompetent hücrelere transforme edilerek Bölüm 3.2.2.4’de açıklandığı gibi gliserol stokları hazırlandı ve -80 °C’de muhafaza edildi.

Transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere pMetLuc-reporter vektöründeki P1, P2 ve P3 promotor parçalarını içeren gliserol stoklardan Bölüm 3.2.2.7’de belirtildiği şekilde MidiNucleoBond Xtra™ kiti kullanılarak büyük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitlerin *SacII* ve *PstI* enzimleriyle restriksiyon endonükleaz kesimi yapılarak doğrulaması yapıldı (bk. Şekil 4.75) ve stok plazmitler -20 °C’de saklandı. P1, P2 ve P3 promotor parçalarının temsili gösterimi Şekil 4.76’da verilmiştir.



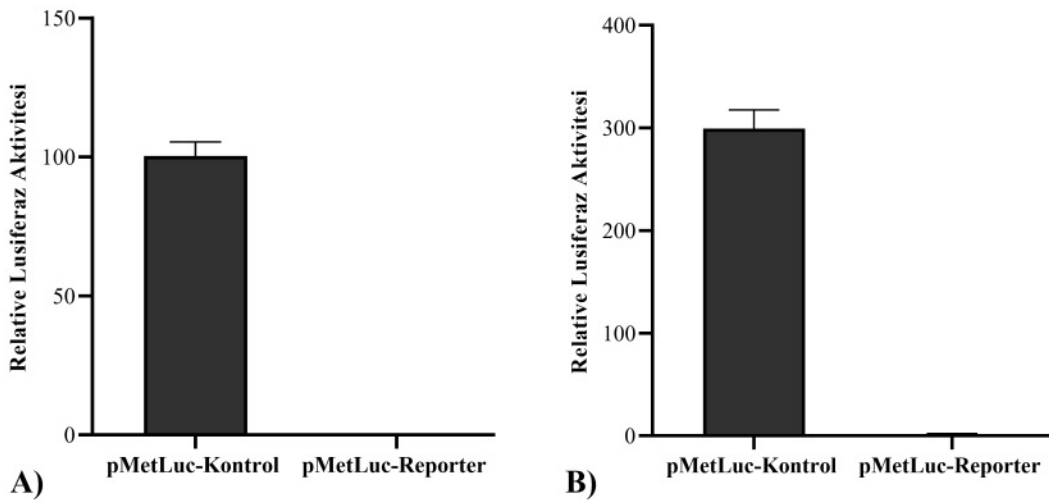
Şekil 4.75 Promotor parçalarının restriksiyon endonükleaz kesiminin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: 1 kb marker, P3-P1 promotor parçaları)



Şekil 4.76: PSMD4 promotor parçalarının şematik gösterimi. (P1: 150 bç (-98/+52), P2: 326 bç (-274/+52) ve P3: 683 bç (-631/+52))

4.11.2 Geçici Transfeksiyonun Salınan Lusiferaz ve SEAP Sisteminde Optimizasyonu

PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında gerçekleştirilen geçici transfeksiyon çalışmalarında X-tremeGENE™ HP DNA transfeksiyon reaktifi kullanıldı. Geçici transfeksiyon etkinliğinin optimizasyonu amacıyla PANC-1 ve HUVEC hücreleri 12 kuyucuklu plakaya 25×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırılıp 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün Bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde pMetLuc-kontrol (1 µg) ve pMetLuc-reporter (1 µg) vektörleri, pSEAP2-kontrol (0,5 µg) vektörüyle birlikte hücrelere transfekte edildi. Her grubun en az 3 tekrarı olacak şekilde çalışıldı. Transfeksiyonun 48. saatinde hücrelerin ortamından 100’er µL besiyeri örneği alındı. Bölüm 3.2.11’de açıklandığı şekilde Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay kiti kullanılarak besiyeri örneklerindeki lusiferaz ve SEAP aktivitesi luminometrede ölçüldü. Ölçüm sonuçları değerlendirilirken her bir örneğin lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine bölünerek relative lusiferaz aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip analiz edildi.



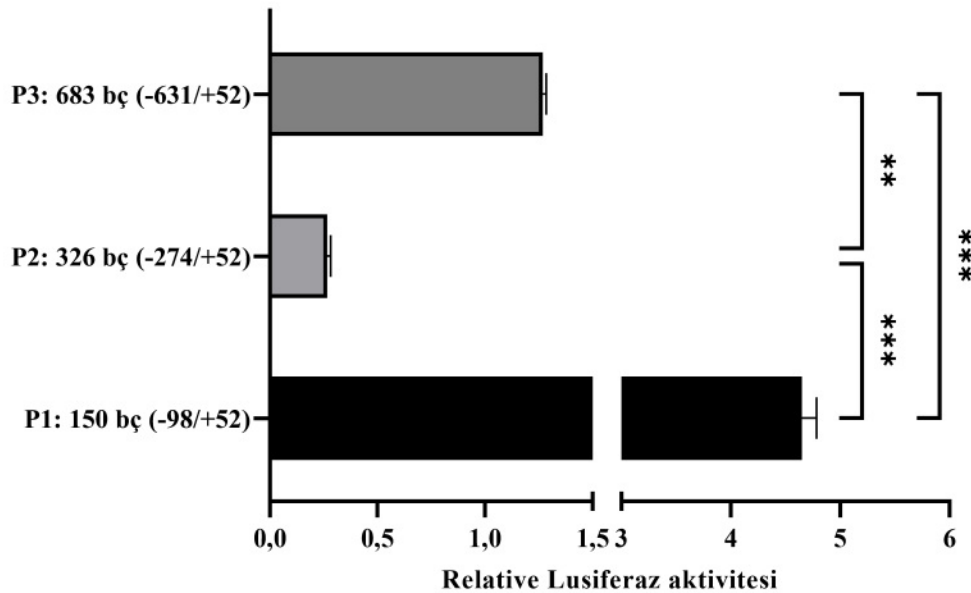
Şekil 4.77: pMetLuc-kontrol ve pMetLuc-reporter vektörlerinin transfeksiyon etkinliği. (A: PANC-1 hücre hattında, B: HUVEC hücre hattında)

Transfeksiyon etkinliğinin optimizasyonunda pozitif kontrol olarak pMetLuc-kontrol ve pSEAP2-kontrol vektörleri kullanıldı. Her iki vektör de viral kaynaklı güçlü bir promotor bölgesi içerdiğinden yüksek aktiviteye sahiptir. pMetLuc-kontrol vektörü transfeksiyon sonrası yüksek lusiferaz aktivitesi gösterir. Benzer şekilde pSEAP2-kontrol vektörü ise yüksek SEAP aktivitesi göstermektedir. Çalışmada SEAP aktivitesi, lusiferaz aktivitesini normalize etmek için kullanılmıştır. Ayrıca promotor içermeyen pMetLuc-reporter vektörü, transfeksiyon sonrası olası arka plan aktivitesini tespit etmek amacıyla negatif kontrol olarak kullanıldı.

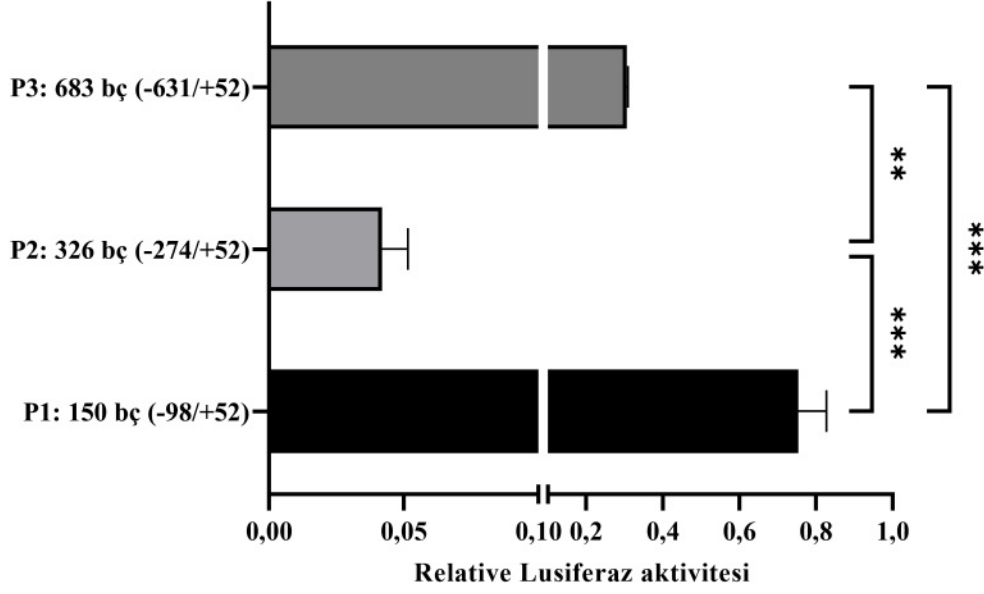
Şekil 4.77’de verilen grafiklere göre PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlendi. Ayrıca salınan sistem lusiferaz ve SEAP ölçümlerinde belirgin bir arka plan aktivitesi görülmediği ve optimum değerlerde olduğu tespit edilmiştir.

4.11.3 PSMD4 Geni Promotor Parçalarının Bazal Aktivitesinin Belirlenmesi

pMetLuc-reporter vektörüne klonlanan PSMD4 genine ait promotor parçalarının bazal aktivitesini belirlemek için transfeksiyon çalışması yapıldı. Bu amaçla PANC-1 ve HUVEC hücreleri 96 kuyucuklu plakaya 30×10^2 hücre/kuyu olacak şekilde paylaştırılıp 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün Bölüm 3.2.5.2’de belirtildiği şekilde pMetLuc-reporter vektöründeki promotor parçaları, pSEAP2-kontrol vektörü ile birlikte hücrelere transfekte edildi. Her bir kuyuda 0,1 µg promotor parçası (pMetLuc-reporter vektörü) ve 0,05 µg pSEAP2-kontrol vektörü olacak şekilde transfeksiyon yapılmıştır. Her bir promotor parçası en az 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Transfeksiyonun 48. saatinde hücrelerin besiyerinden 100’er µL örnek alındı ve Bölüm 3.2.1’de açıklandığı gibi besiyeri örneklerindeki lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine bölünerek relative lusiferaz aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip one-way ANOVA testiyle analiz edildi.



Şekil 4.78: PANC-1 hücrelerindeki PSMD4 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktivitesi. (*p* değerleri: < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***))

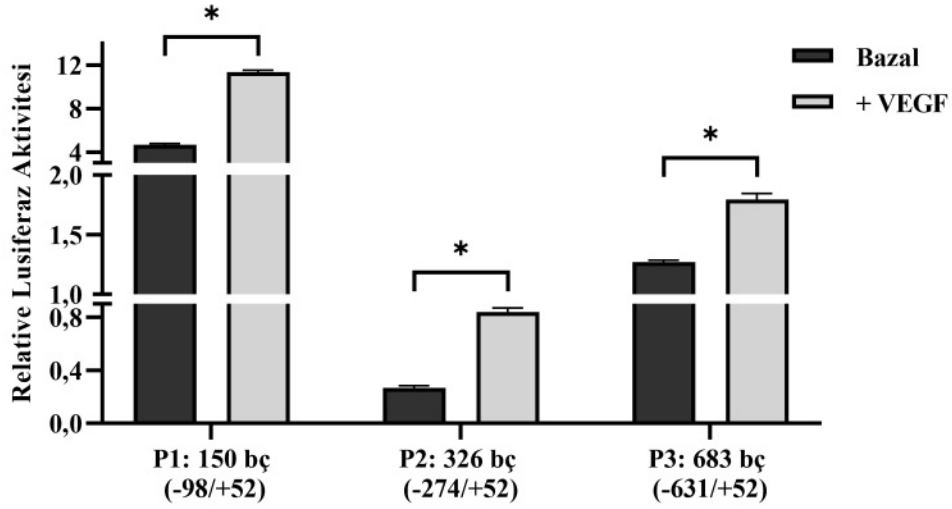


Şekil 4.79: HUVEC hücrelerindeki PSMD4 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktivitesi. (*p* değerleri: < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***))

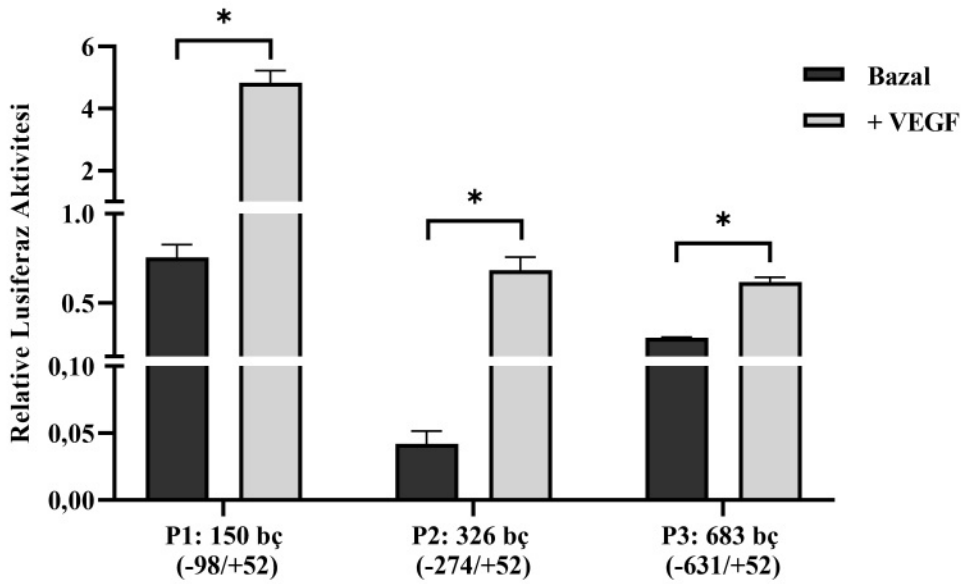
Şekil 4.78 ve 4.79’da verilen grafiklere göre PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 genine ait tüm promotor parçalarının aktif transkripsiyonel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki hücre grubunda da 150 bç’lik P1 promotor parçası diğerlerine kıyasla daha yüksek aktivite gösterdiği, 326 bç’lik P2 promotor parçasının ise daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.11.4 VEGF Sitokininin PSMD4 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi

PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarında yapılan çalışmada VEGF sitokininin PSMD4 gen ekspresyonunu hem mRNA hem de protein düzeyinde arttırdığı gösterilmiştir. VEGF uyarısıyla gerçekleşen bu etkiyi transkripsiyonel düzeyde incelemek için VEGF sitokini transfeksiyon çalışmalarına dahil edildi. Bu amaçla PSMD4 promotor parçalarının bazal aktivitesini belirleme çalışmalarında (bk. 4.11.3) olduğu gibi PANC-1 ve HUVEC hücrelerine transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde Bölüm 3.2.4.8’de belirtildiği şekilde son konsantrasyonu 20 ng/mL olacak şekilde VEGF sitokini uygulaması yapıldı. Uygulamadan 6 saat sonra hücre ortamından 100’er µL örnek alındı ve Bölüm 3.2.1’de açıklandığı gibi örneklerin lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçüldü. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine bölünerek relative lusiferaz aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafiklendirilip one-way ANOVA testiyle analiz edildi.



Şekil 4.80: PANC-1 hücrelerinde VEGF'in PSMD4 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)



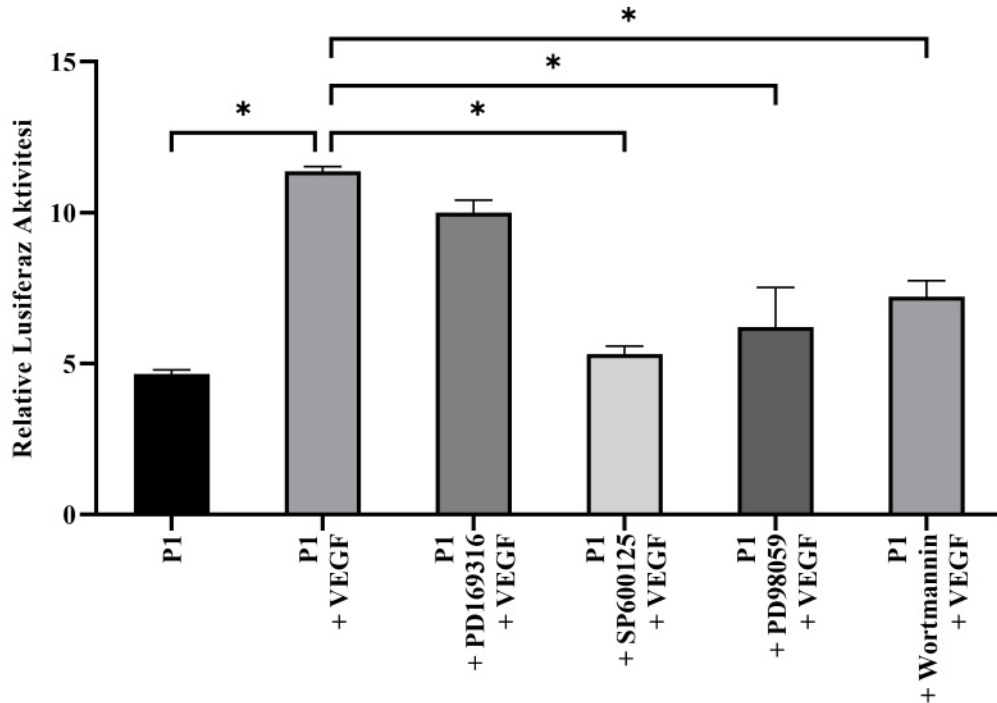
Şekil 4.81: HUVEC hücrelerinde VEGF'in PSMD4 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

PANC-1 ve HUVEC hücreleri için Şekil 4.80 ve 4.81'de verilen grafiklere göre VEGF sitokini, tüm promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttırmıştır. Özellikle P2 promotor parçasındaki aktivite artışı (PANC-1'de 3,1 kat, HUVEC'de 16 kat) diğerlerine göre daha yüksek düzeydedir. P3 promotor parçasındaki artışın ise diğerlerine göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

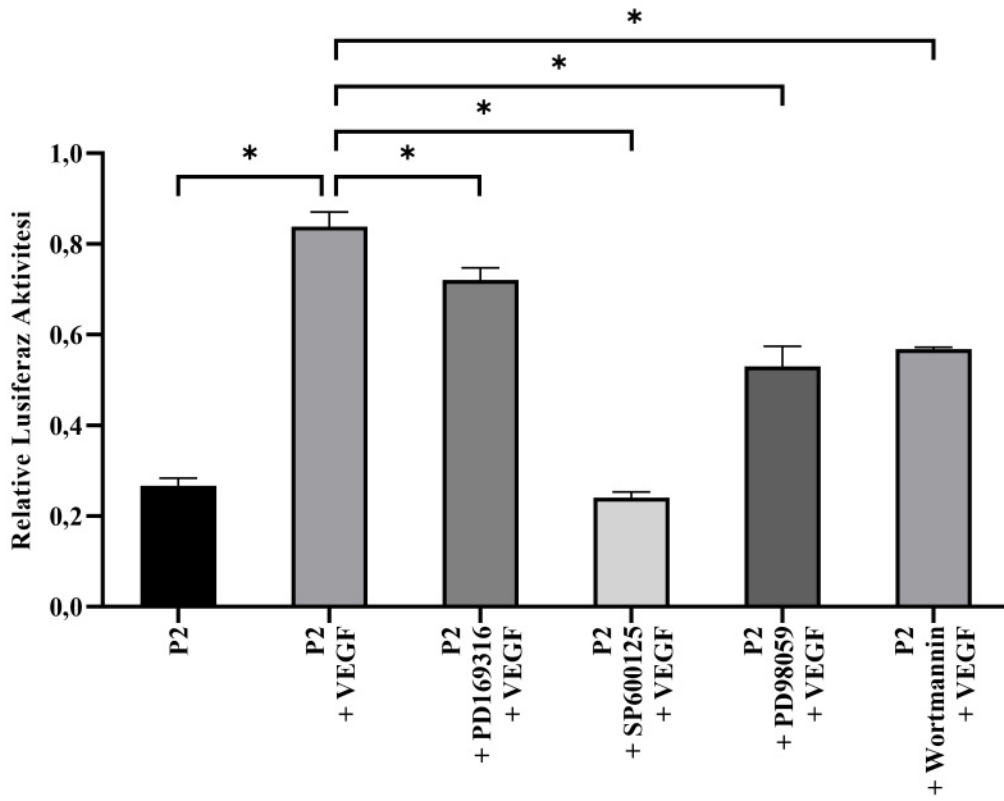
4.11.5 VEGF Sitokini ve Yolak İnhibitörlerinin PSMD4 Promotor Parçalarına

Etkisinin Belirlenmesi

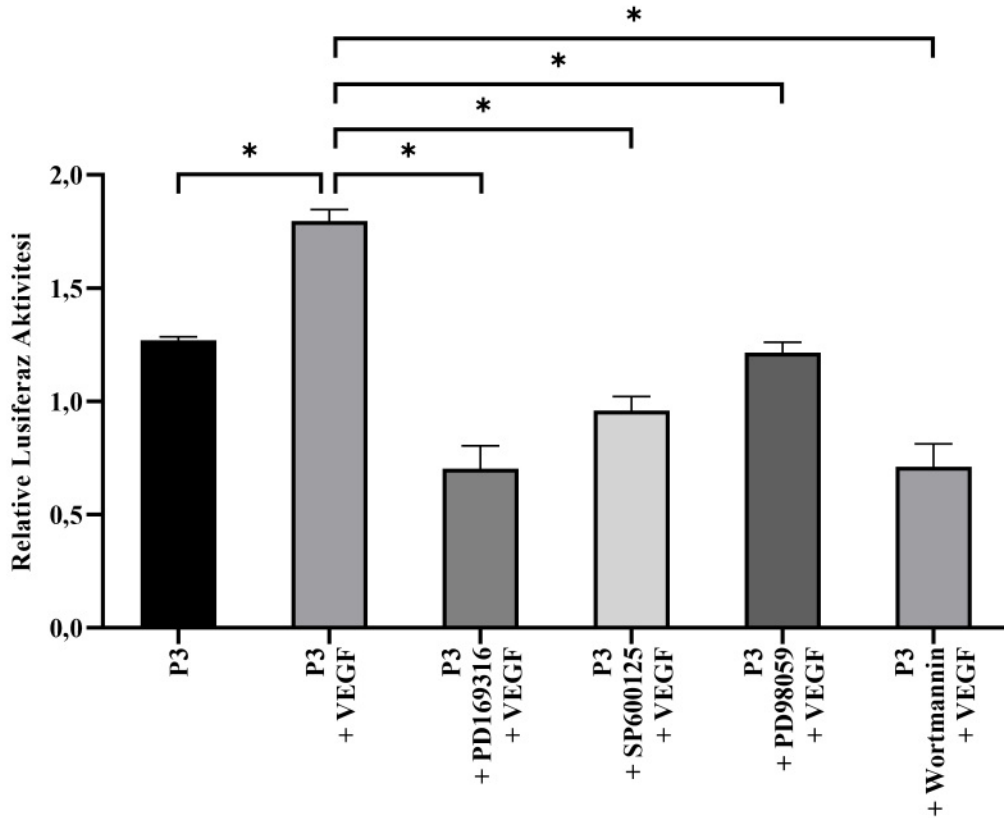
Bölüm 4.11.4'deki çalışmada VEGF sitokininin tüm PSMD4 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. VEGF sitokininin bu artışı hangi yolaklar üzerinden gerçekleştirdiğini tespit etmek amacıyla yolak inhibitörleri transfeksiyon çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu amaçla PSMD4 promotor parçalarının bazal aktivitesini belirleme çalışmasında (bk. 4.11.3) olduğu gibi PANC-1 ve HUVEC hücrelerine transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonun 36. saatinde Bölüm 3.2.4.9'da açıklandığı şekilde yolak inhibisyon deneyleri kuruldu. Çalışmada PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü), PD98059 (MEK inhibitörü) ve Wortmannin (PI3K inhibitörü) inhibitörleri Tablo 3.8'de verilen son konsantrasyonlara göre uygulanmıştır. Her bir örnek en az üç tekrarlı çalışılmıştır. VEGF uygulamasını takip eden 6. saatte hücrelerin ortamından 100 µL örnek alındı. Bu örneklerin Bölüm 3.2.1'de açıklandığı gibi lusiferaz ve SEAP aktivitesi ölçüldü ve her örneğin lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine bölünerek relative lusiferaz aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad programında grafikleştirilip one-way ANOVA testiyle analiz edilmiştir.



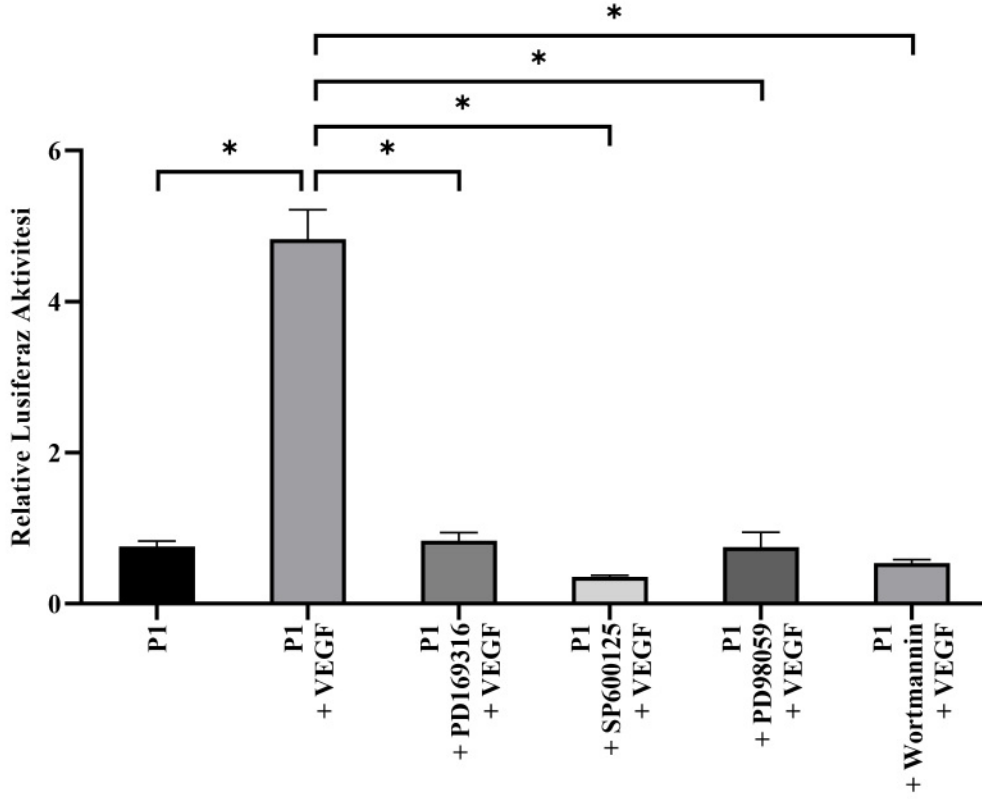
Şekil 4.82: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P1: 150 bç (-98/+52) promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (*p* değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)



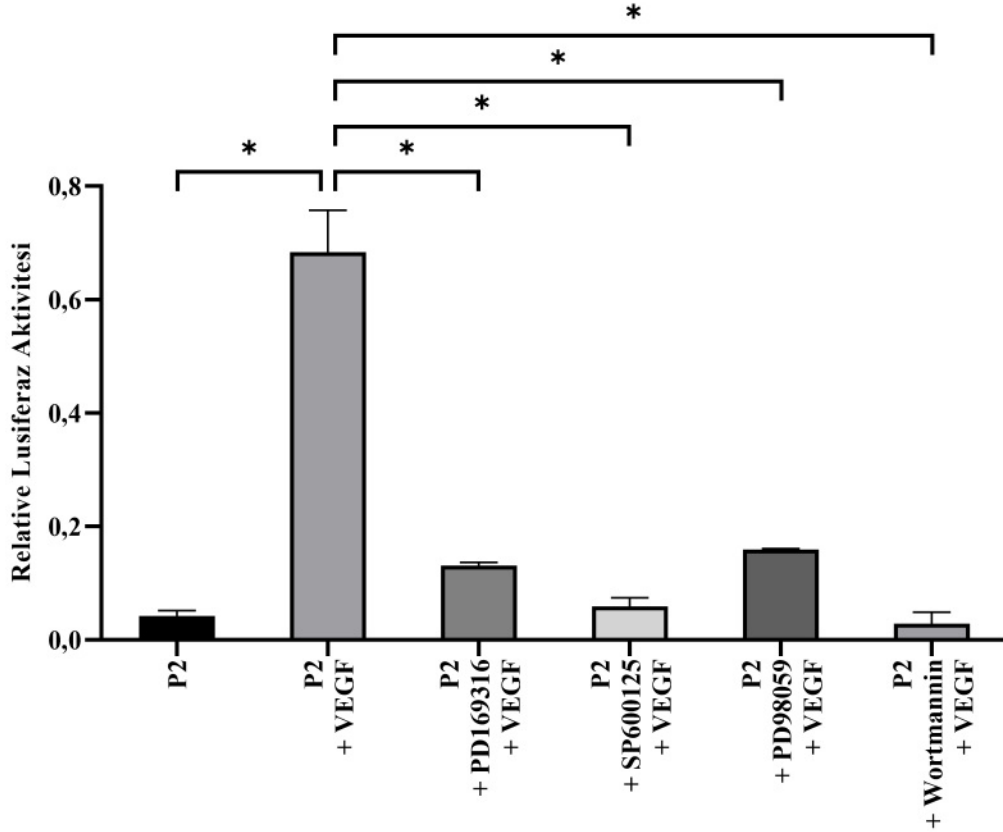
Şekil 4.83: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P2: 326 bç (-274/+52) promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (*p* değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)



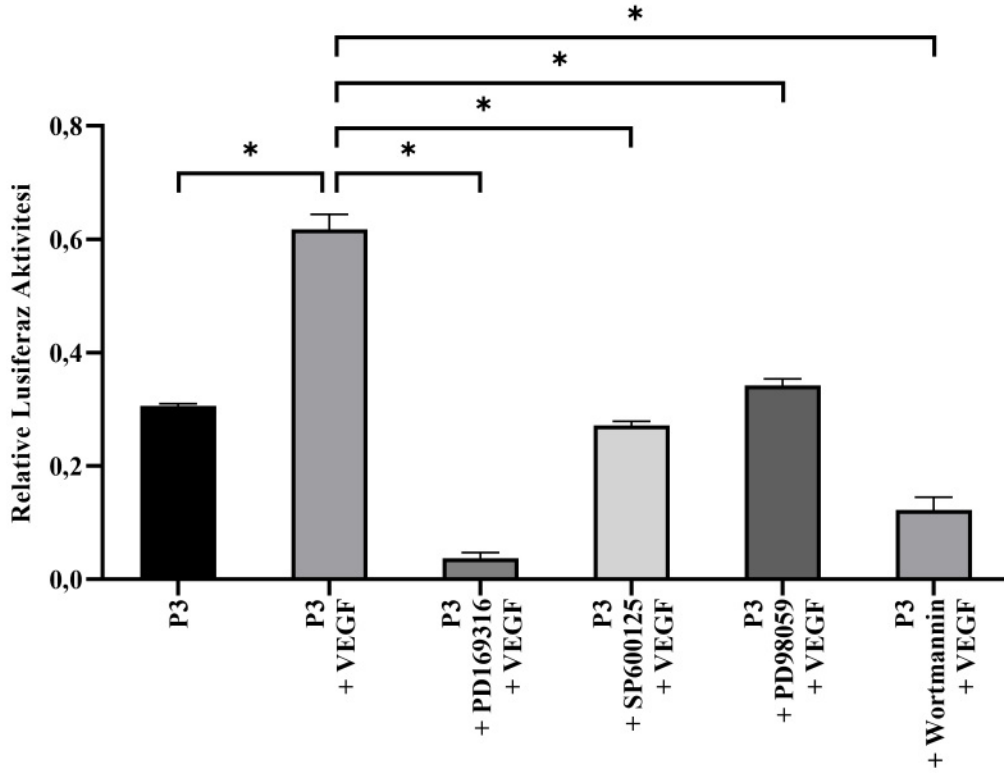
Şekil 4.84: PANC-1 hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P3: 683 bç (-631/+52) promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (*p* değeri < 0,05 (*) ile gösterildi.)



Şekil 4.85: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P1: 150 bç (-98/+52) promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)



Şekil 4.86: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P2: 326 bç (-274/+52) promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)



Şekil 4.87: HUVEC hücrelerinde yolak inhibitörlerinin P3: 683 bç (-631/+52) promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesine etkisi. (p değeri $< 0,05$ (*) ile gösterildi.)

PANC-1 hücrelerinde yapılan çalışma sonucu elde edilen verilere göre (bk. Şekil 4.82, 4.83 ve 4.84) VEGF'nin tüm promotor parçalarında görülen transkripsiyonel aktiviteye olan uyarıcı etkisi; P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri uygulanan gruplarda azalmıştır. P1 promotoru çalışmasının P38 MAP kinaz (PD169316) inhibitörü uygulanan grubu hariç diğer gruplardaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

HUVEC hücrelerindeki sonuçlar (bk. Şekil 4.85, 4.86 ve 4.87) incelendiğinde P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri uygulanan tüm promotor parçalarında VEGF sitokininin, uyarıcı etkisinde istatistiksel olarak anlamlı olan bir azalma görülmüştür.

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde elde edilen sonuçlara göre muhtemelen her iki hücre hattında da VEGF sitokini; P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K yolları üzerinden PSMD4 promotor parçalarının transkripsiyonel regülasyonunu sağlamaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ubikitin-proteazom sistemi (UPS), hücrel proteostazı düzenleyerek çeşitli süreçlerde kritik roller oynamaktadır. Proteinlerin UPS aracılı kontrollü yıkımıyla hücre döngüsü, gen ekspresyonu, sinyal iletimi, bağışıklık, apoptoz ve onkogenez gibi süreçler düzenlenmektedir [9]. Son yıllarda UPS'deki düzensizliklerin birçok insan hastalığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [7].

PSMD4 geni, ubikitin-proteazom sisteminde yer alan 26S proteazomun ubikitin reseptörü olarak görev yapan alt birimlerinden birini kodlamaktadır. Gen bankaları tarandığında PSMD4 geninin 380 amino asitlik izoform 1 (angiosidin) ve 377 amino asitlik izoform 2 (PSMD4) proteinlerini kodladığı görülmektedir [19]. Literatürde PSMD4 geninin tümör gelişimiyle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak pankreas kanserinde PSMD4 geninin rolünü ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen çalışmalar dört basamak altında toplanabilir. Birinci basamakta, PSMD4 ve angiosidin genlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde over ekspresyonu yapılarak moleküler ve hücrel düzeyde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Öncelikle pcDNA-3.3 TOPO vektöründeki insan PSMD4 geni, pEGFP-C1 vektörüne klonlandı. Bu amaçla PSMD4 geninin transkript varyant 2 (NM_002810.4) mRNA nükleotit dizisinin restriksiyon haritalaması yapılarak geni kesen ve kesmeyen enzimler belirlendi. pEGFP-C1 vektörünün kesim bölgesinde tanıma dizileri bulunan ancak kesmeyen enzimlerin tanıma dizileri okuma çerçevesini kaydırmayacak şekilde ileri ve geri klonlama primerlerine yerleştirildi. PSMD4 geni, Şekil 4.1'de verilen çalışma basamakları takip edilerek pEGFP-C1 vektörüne klonlandı. Klonlamanın doğruluğu dizi analiziyle teyit edildi.

Tez çalışması kapsamında PSMD4 geninden angiosidin proteinini kodlayan transkript varyant 1 (angiosidin geni) yönlendirilmiş mutagenезle elde edildi ve pEGFP-C1 vektörüne klonlandı. Bu amaçla angiosidin genindeki 9 nükleotitlik (5'...-AGGTGAAAG-...3') fazlalık bölgeyi içeren ileri ve geri mutasyon primerleri tasarlandı. Mutagenез çalışmasında ilk olarak Stratagene QuickChange™ kiti modifiye edilerek kullanıldı ancak

istenilen mutant gen elde edilemedi. Bu yüzden farklı bir strateji olan PCR tabanlı mutagenез çalışması yapıldı [131]. Şekil 4.6'daki çalışma basamakları uygulanarak mutasyonu taşıyan gen (angiosidin) elde edildi ve devamında pEGFP-C1 vektörüne klonlandı. Mutagenезin ve klonlamanın doğruluğu dizi analizi yapılarak kontrol edildi.

PSMD4 ve angiosidin genlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde over ekspresyonunu gerçekleştirmek için transfeksiyon çalışması yapıldı. Bu amaçla pEGFP-C1 vektörüne klonlanan PSMD4 ve angiosidin genleri geçici transfeksiyonla hücrelere aktarıldı ve genlerin over ekspresyonu mRNA düzeyinde real-time PCR ile doğrulandı. PANC-1 hücrelerinde boş-pEGFP-C1 uygulanan grupla kıyaslandığında; mRNA seviyesindeki artışın PSMD4 uygulanan grupta 18 kat ($p < 0,001$), angiosidin uygulanan grupta ise 26 kat ($p < 0,001$) olduğu tespit edildi. HUVEC hücrelerinde ise mRNA seviyesindeki artışın PSMD4 uygulanan grupta 15 kat ($p < 0,001$), angiosidin uygulanan grupta ise 21 kat ($p < 0,001$) olduğu belirlendi. Hücrelerdeki PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu protein düzeyinde western blot ile teyit edildi. Boş-pEGFP-C1 uygulanan hücrelerle kıyaslandığında; PSMD4 ve angiosidin protein seviyesindeki artışın sırasıyla PANC-1 için 1,86 ve 1,92 kat olduğu, HUVEC için ise 1,3 ve 1,27 kat olduğu tespit edildi. PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun real-time ve western blot sonuçları birbiriyle tutarlılık göstermektedir.

Hücrelerde pEGFP-C1 vektöründeki PSMD4 ve angiosidin genlerinin protein ürünleri, GFP'nin C-terminaline füzyon olarak ifade olmaktadır. PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki yeşil floresan protein (GFP) etiketli PSMD4 ve angiosidin proteinleri flow sitometri ile analiz edildi. Her iki hücre hattında da transfeksiyon yapılmayan kontrol grubu hücrelerine kıyasla transfeksiyon yapılan grupların floresan sinyal seviyesinde artış olduğu tespit edildi. Ayrıca GFP sinyali floresan mikroskop altında da takip edildi. PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde yapılan analizler sonucu transfeksiyon yapılan grupların yoğun yeşil floresan protein (GFP) sinyali gösterdiği belirlendi. Gerçekleştirilen tüm doğrulama analizleri sonucunda PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği tespit edildi.

PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarındaki PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonunun hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlendi. Öncelikle 96 kuyucuklu plakada MTT testi için kullanılacak optimum hücre sayısı tespit edildi. Her iki hücre hattı için kuyu başına 20.000

hücre kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi. PANC-1 ve HUVEC hücrelerine PSMD4 ve angiosidin genlerinin transfeksiyonu yapıldı ve transfeksiyonun 24. 48. ve 72. saatlerinde MTT testi gerçekleştirildi. PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu kontrol gruplarına kıyasla, tüm saat dilimlerinde hücrelerin canlılığında bir artışa ($p<0,05$) neden olmaktadır. Hücrelerdeki PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonunun hücre göçüne etkisini belirlemek amacıyla scratch testi yapıldı. Test sonuçları analiz edildiğinde PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 ve angiosidin genlerinin over ekspresyonunun yapıldığı gruplarda kontrol gruplarına kıyasla hücrelerin göç etme yeteneğinde bir artış olduğu belirlendi. PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonunun hücrelerin koloni oluşturma yeteneğine etkisini belirlemek için koloni formasyon testi yapılmıştır. Öncelikle 6 kuyucuklu plaka için kullanılacak optimum hücre sayısı belirlendi. PANC-1 ve HUVEC için sırasıyla 1000 ve 500 hücre ile deneye başlanmasının uygun olduğuna karar verildi. Koloni formasyon testi sonuçları analiz edildiğinde her iki hücre hattında da PSMD4 ve angiosidin genleriyle transfekte edilen gruplarda kontrol gruplarına kıyasla koloni sayılarında bir artış ($p<0,05$) olduğu tespit edildi.

PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki proliferasyonu, migrasyonu ve koloni oluşum yeteneğini arttırmaktadır. Çalışmada ayrıca bu hücrel değişikliklerin EMT (Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm) süreciyle ilişkisi araştırıldı. Over ekspresyonun EMT ilişkili bazı genlerin ekspresyonuna etkisi mRNA düzeyinde real-time PCR ile belirlendi. PANC-1 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonu yapılan gruplarda E-cadherin mRNA seviyesinde bir azalış ($p<0,05$) olduğu, osteopontin, vimentin ve twist mRNA seviyesinde ise bir artış ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. HUVEC hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla PSMD4 over ekspresyonu yapılan gruplarda E-cadherin ve osteopontin mRNA seviyelerinde bir azalış ($p<0,05$), vimentin ve twist mRNA seviyesinde ise artış ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. Angiosidin over ekspresyonu yapılan gruplarda da E-cadherin ve osteopontin mRNA seviyesinde bir azalış ($p<0,05$), vimentin mRNA seviyesinde ise artış ($p<0,05$) olduğu belirlendi.

Tez çalışmasının ikinci basamağında ise PSMD4 genlerinin PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde susturulması yapılarak moleküler ve hücrel düzeyde karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

PSMD4 ve angiosidin genlerini hedefleyen shRNA oligoları siRNA seçim programı kullanılarak tasarlandı. PSMD4-shRNA ve angiosidin-shRNA oligoları üretici firmanın (Addgene) önerdiği şekilde pLKO.1-TRC vektörüne klonlandı. Klonlamanın doğruluğu *EcoRI* ve *NcoI* restriksiyon endonükleaz kesimi ve dizi analiziyle teyit edildi.

PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki PSMD4 ve angiosidin genlerini susturmak için pLKO.1-TRC vektörüne klonlanan shRNA oligoları transfeksiyonla hücrelere aktarıldı. PSMD4 ve angiosidin susturulması mRNA düzeyinde real-time PCR ile doğrulandı. PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde kontrol olarak scramble uygulanan grupla karşılaştırıldığında sadece PSMD4-shRNA ile susturma yapılan gruplarda PSMD4 mRNA seviyesinde bir azalış ($p<0,05$) olduğu gözlemlendi. Angiosidin-shRNA ile susturma yapılan gruplarda ise belirgin bir fark görülmedi. PSMD4 ve angiosidin susturulması protein düzeyinde de immüno floresan (IFC) tekniği ile doğrulandı. IFC sonuçları analiz edildiğinde her iki hücre hattında da sadece PSMD4-shRNA ile susturma yapılan gruplarda floresan sinyal yoğunluğunda bir azalma ($p<0,05$) olduğu tespit edildi. Angiosidin-shRNA uygulanan gruplarda belirgin bir fark görülmedi. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre PSMD4-shRNA, hücrelerdeki PSMD4 genini kısmi olarak susturmaktadır. Bu yüzden susturma çalışmalarına PSMD4-shRNA ile devam edildi.

Hücrelerdeki PSMD4 gen susturulmasının hücre canlılığına olan etkisi MTT testi ile belirlendi. PANC-1 ve HUVEC hücrelerine PSMD4-shRNA transfeksiyonu yapıldı ve transfeksiyonun 24. 48. ve 72. saatlerinde MTT testi gerçekleştirildi. PANC-1 hücrelerinde PSMD4 geni susturulması sadece 24. saatte hücrelerin canlılığında bir azalışa ($p<0,05$) neden olmuştur. Diğer saat dilimlerinde belirgin bir fark ($p>0,05$) gözlenmedi. HUVEC hücrelerinde ise PSMD4 gen susturulması, kontrol grubuna kıyasla tüm saat dilimlerinde hücre canlılığında bir artışa ($p<0,05$) neden olmaktadır. Hücrelerdeki PSMD4 gen susturulmasının hücre göçüne etkisini belirlemek için scratch testi yapıldı. Test sonuçlarına göre PSMD4 geninin susturulması, PANC-1 hücrelerinde göç etme yeteneğini azaltırken HUVEC hücrelerinde arttırmaktadır. Son olarak PSMD4 susturulmasının hücrelerin koloni oluşturma yeteneğine etkisi koloni formasyon testi yapılarak belirlendi. Koloni formasyon test sonuçları analiz edildiğinde, kontrol gruplarına kıyasla PSMD4 susturulması yapılan gruplarda, PANC-1 hücrelerinde koloni oluşturma yeteneğinde bir azalış ($p<0,05$) olduğu HUVEC hücrelerinde ise bir artış ($p<0,05$) olduğu tespit edildi.

Tezin üçüncü basamağında ise VEGF-A₁₆₅ sitokininin PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki PSMD4 gen regülasyonuna etkisi incelenmiştir. Öncelikle VEGF'in hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. Bu amaçla hücrelere son konsantrasyonları 10, 20 ve 30 ng/mL olan VEGF sitokini uygulandı ve 24. 48. ve 72. saatlerinde MTT testi yapıldı. PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde 24. saatte tüm VEGF dozları sitotoksik etki ($p<0,05$) yaratmaktadır ancak bu etki çok belirgin değildir. 72. saatte ise sadece 30 ng/mL olan VEGF dozunda sitotoksik etki ($p<0,05$) görülmektedir. Diğer saat dilimlerinde ve sitokin dozlarında anlamlı bir fark yoktur. Bu sonuçlara göre sitokin çalışmalarında, 20 ng/mL olacak şekilde VEGF kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde VEGF uygulamasının PSMD4 gen ekspresyonuna etkisi mRNA düzeyinde real-time PCR ile tespit edildi. PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokini uygulamasını takip eden 1. saatten itibaren PSMD4 mRNA seviyesinde bir artış olduğu ve bu artışın 48. saate kadar devam ettiği ($p<0,05$) belirlendi. HUVEC hücrelerinde ise 3. saatten itibaren PSMD4 mRNA seviyesinde artış ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur. VEGF'in PSMD4 ekspresyonuna etkisi protein düzeyinde western blot tekniği ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlar analiz edildiğinde PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokini uygulaması 1. saatten 48. saate kadar PSMD4 protein seviyesinde bir artışa neden olmaktadır. HUVEC hücrelerinde ise 6. saatten itibaren PSMD4 protein seviyesinde bir artış olduğu tespit edildi. Sonuç olarak mRNA düzeyinde elde edilen veriler western blot analiziyle tutarlılık göstermektedir.

VEGF sitokininin PSMD4 gen regülasyonunu hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiğini tespit etmek amacıyla yolak inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla hücrelere PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü), PD98059 (MEK inhibitörü) ve Wortmannin (PI3K inhibitörü) inhibitörleri uygulandı. Devamında (45 dk. sonra) VEGF sitokini uygulaması yapıldı. İnhibitörlerin PSMD4 ekspresyonuna olan etkisi mRNA düzeyinde real-time PCR ile belirlendi. PANC-1 hücrelerinde VEGF sitokini PSMD4 mRNA ekspresyonunu arttırmaktadır ($p<0,05$). Ancak P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri ile birlikte VEGF uygulaması, PSMD4 mRNA seviyesini azaltmaktadır ($p<0,05$). HUVEC hücrelerinde ise VEGF'in PSMD4 mRNA seviyesini arttırdığı ancak MEK ve PI3K inhibitörleri çalışılan gruplarda VEGF'in uyarıcı etkisinde bir azalış ($p<0,05$) olduğu belirlendi. P38 MAP kinaz ve JNK inhibitörleri çalışılan grupların mRNA seviyesinde belirgin bir fark görülmedi ($p>0,05$). İnhibitörlerin PSMD4 ekspresyonuna

etkisi protein düzeyinde western blot analiziyle belirlendi. PANC-1 hücreleri için P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri çalışılan gruplarda VEGF'in PSMD4 protein seviyesinde gösterdiği uyarıcı etkisinde azalma olduğu görüldü. Özellikle MEK ve PI3K inhibitörleri uygulanan gruplardaki azalma daha belirgindir. HUVEC hücrelerinde inhibitörlerin PSMD4 protein düzeyine olan etkisi PANC-1'de elde edilen sonuçlara benzerdir. Sonuç olarak iki hücre hattında da protein ve mRNA düzeyinde elde edilen yolak inhibisyon sonuçları birbirini desteklemektedir. Muhtemelen her iki hücre hattında da VEGF sitokini, P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K yolları üzerinden PSMD4 gen regülasyonunu sağlamaktadır.

Tez çalışmasının son basamağında insan PSMD4 genine ait promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesi incelendi. Bu amaçla grubumuz tarafından [48] P1: 150 bç (-98/+52) ve P3: 683 bç (-631/+52) promotor parçaları pMetLuc-reporter vektörüne klonlanmıştır. P2: 326 bç (-274/+52) promotor parçası ise 683 bç'lik P3 promotor parçası kullanılarak pMetLuc-reporter vektörüne bu çalışmada klonlandı.

Öncelikle PANC-1 ve HUVEC hücrelerinde geçici transfeksiyonun etkinliği belirlendi. Bu amaçla pMetLuc-kontrol (1 µg) ve pMetLuc-reporter (1 µg) vektörleri, pSEAP2-kontrol (0,5 µg) vektörüyle birlikte hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. saatinde salınan sistem lusiferaz ve SEAP ölçümleri yapıldı. Çalışmada SEAP aktivitesi, lusiferaz aktivitesini normalize etmek için kullanıldı. Ayrıca promotor içermeyen pMetLuc-reporter vektörü, transfeksiyon sonrası olası arka plan aktivitesini tespit etmek amacıyla negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve lusiferaz ve SEAP ölçümlerinde belirgin bir arka plan aktivitesi görülmediği ve optimum değerlerde olduğu tespit edildi.

PSMD4 genine ait pMetLuc-reporter vektöründeki üç promotor parçasının (P1, P2 ve P3) PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki bazal transkripsiyonel aktivitesi belirlendi. Bu amaçla P1, P2 ve P3 promotor parçaları, pSEAP2-kontrol vektörü ile birlikte hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. saatinde lusiferaz ve SEAP ölçümleri yapıldı ve sonuçlar analiz edildi. Her iki hücre grubunda (PANC-1 ve HUVEC) PSMD4 genine ait tüm promotor parçalarının aktif transkripsiyonel aktiviteye sahip olduğu ve 150 bç'lik P1

promotor parçasının diğerlerine kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ($p<0,05$) tespit edildi.

PSMD4 geni promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesine VEGF sitokininin etkisini belirlemek için transfeksiyon çalışmalarına VEGF dahil edildi. PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki promotor parçalarının tümünün transkripsiyonel aktivitesini VEGF arttırmıştır ($p<0,05$). VEGF'in transkripsiyonel aktiviteyi hangi yollar üzerinden arttırdığını tespit etmek için transfeksiyon çalışmalarına PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), SP600125 (JNK inhibitörü), PD98059 (MEK inhibitörü) ve Wortmannin (PI3K inhibitörü) inhibitörleri dahil edildi. PANC-1 hücrelerindeki çalışma sonucuna göre VEGF'nin tüm promotor parçalarında görülen transkripsiyonel aktiviteye olan uyarıcı etkisi; P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri uygulanan gruplarda azalmıştır. Sadece P1 promotor parçasında P38 MAP kinaz (PD169316) inhibitörü uygulanan grup hariç diğer gruplardaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). HUVEC hücrelerinde ise P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K inhibitörleri uygulanan tüm promotor parçalarında VEGF sitokininin uyarıcı etkisinde azalma ($p<0,05$) görülmüştür. Her iki hücre hattı için elde edilen veriler değerlendirildiğinde muhtemelen VEGF sitokini; P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K yolları üzerinden PSMD4 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesini düzenlemektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında PANC-1 ve HUVEC hücrelerindeki PSMD4 ve angiosidin over ekspresyonunun proliferasyonu, migrasyonu ve koloni oluşum yeteneğini arttırdığı belirlendi. Ayrıca PSMD4 gen susturulmasının hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve koloni oluşum yeteneğini PANC-1 hücrelerinde azaltırken HUVEC hücrelerinde arttırdığı tespit edildi. Son olarak VEGF sitokininin PSMD4 gen ekspresyonunu ve promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitesini uyardığı ve bu regülasyonu P38 MAP kinaz, JNK, MEK ve PI3K yolları üzerinden gerçekleştirdiği görülmüştür. Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgilerin PSMD4 genini hedef alan tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- [1] Y. A. Mebratu, Z. H. Negasi, S. Dutta, J. Rojas-Quintero, ve Y. Tesfaigzi, “Adaptation of Proteasomes and Lysosomes to Cellular Environments”, *Cells*, c. 9, sy 10, s. 2221, Eki. 2020, doi: 10.3390/cells9102221.
- [2] D. L. Nelson, M. M. Cox, ve A. A. Hoskins, *Lehninger principles of biochemistry*, Eighth edition. Austin: Macmillan Learning, 2021.
- [3] N. Chandar ve S. Viselli, *Cell and molecular biology*, Second edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2019.
- [4] D. Voet, J. G. Voet, ve C. W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, 5th edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2016.
- [5] K. L. Rock vd., “Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules”, *Cell*, c. 78, sy 5, ss. 761-771, Eyl. 1994, doi: 10.1016/S0092-8674(94)90462-6.
- [6] J. Adams, “The proteasome: structure, function, and role in the cell”, *Cancer Treat. Rev.*, c. 29, ss. 3-9, May. 2003, doi: 10.1016/S0305-7372(03)00081-1.
- [7] J. Hanna, A. Guerra-Moreno, J. Ang, ve Y. Micoogullari, “Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease”, *Am. J. Pathol.*, c. 189, sy 1, ss. 94-103, Oca. 2019, doi: 10.1016/j.ajpath.2018.09.004.
- [8] R. Garrett ve C. M. Grisham, *Biochemistry*, 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013.
- [9] A. F. Kisselev ve A. L. Goldberg, “Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates”, *Chem. Biol.*, c. 8, sy 8, ss. 739-758, 2001.
- [10] “The Nobel Prize in Chemistry 2004”, *NobelPrize.org*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2004/summary/> (erişim 04 Eylül 2022).
- [11] Y. Leestemaker ve H. Ovaa, “Tools to investigate the ubiquitin proteasome system”, *Drug Discov. Today Technol.*, c. 26, ss. 25-31, Ara. 2017.
- [12] S. H. Lecker, A. L. Goldberg, ve W. E. Mitch, “Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States”, *J. Am. Soc. Nephrol.*, c. 17, sy 7, ss. 1807-1819, Tem. 2006, doi: 10.1681/ASN.2006010083.
- [13] D. Voges, P. Zwickl, ve W. Baumeister, “The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis”, *Annu. Rev. Biochem.*, c. 68, sy 1, ss. 1015-1068, Haz. 1999, doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.1015.

- [14] A. Rousseau ve A. Bertolotti, “Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, c. 19, sy 11, ss. 697-712, Kas. 2018.
- [15] K. Tanaka, “The proteasome: Overview of structure and functions”, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, c. 85, sy 1, ss. 12-36, 2009, doi: 10.2183/pjab.85.12.
- [16] I. Livneh, V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, N. Avni, ve A. Ciechanover, “The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death”, *Cell Res.*, c. 26, sy 8, ss. 869-885, Ağu. 2016.
- [17] R. J. Tomko ve M. Hochstrasser, “Molecular Architecture and Assembly of the Eukaryotic Proteasome”, *Annu. Rev. Biochem.*, c. 82, sy 1, ss. 415-445, Haz. 2013, doi: 10.1146/annurev-biochem-060410-150257.
- [18] F. Türker, E. K. Cook, ve S. S. Margolis, “The proteasome and its role in the nervous system”, *Cell Chem. Biol.*, c. 28, sy 7, ss. 903-917, 2021.
- [19] “PSMD4 proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI”. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5710> (erişim 14 Ağustos 2022).
- [20] “Gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee”. https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:9561 (erişim 09 Aralık 2022).
- [21] Q. Wang, P. Young, ve K. J. Walters, “Structure of S5a Bound to Monoubiquitin Provides a Model for Polyubiquitin Recognition”, *J. Mol. Biol.*, c. 348, sy 3, ss. 727-739, May. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.03.007.
- [22] “PSMD4 - 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt”. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P55036/entry#function> (erişim 09 Aralık 2022).
- [23] J. Hamazaki, S. Hirayama, ve S. Murata, “Redundant Roles of Rpn10 and Rpn13 in Recognition of Ubiquitinated Proteins and Cellular Homeostasis”, *PLOS Genet.*, c. 11, sy 7, s. e1005401, Tem. 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005401.
- [24] S. A. Türkoğlu, G. Güler, ve F. Köçkar, “The Bioinformatic and Expression Analysis of PSMD4 Gene”, *Hacet. J. Biol. Chem.*, c. 46, sy 3, Art. sy 3, Eyl. 2018.
- [25] S. Dimitrov, Y. Sabherwal, D. D. Raymond, D. Z. L’Heureux, Q. Lu, ve G. P. Tuszynski, “Endothelial apoptotic activity of angiocidin is dependent on its polyubiquitin binding activity”, *Br. J. Cancer*, c. 93, sy 6, Art. sy 6, Eyl. 2005, doi: 10.1038/sj.bjc.6602773.

- [26] P. Young, Q. Deveraux, R. E. Beal, C. M. Pickart, ve M. Rechsteiner, "Characterization of Two Polyubiquitin Binding Sites in the 26 S Protease Subunit 5a *", *J. Biol. Chem.*, c. 273, sy 10, ss. 5461-5467, Mar. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.10.5461.
- [27] L.-Å. Nilsson, S. Lange, ve I. Lönnroth, "Induction of anti secretory factor in mice by the nonintestinal parasite *Schistosoma mansoni*", *J. Parasitol.*, c. 78, sy 6, ss. 1055-1058, 1992, doi: 10.2307/3283229.
- [28] G. P. Tuszynski, V. L. Rothman, M. Papale, B. K. Hamilton, ve J. Eyal, "Identification and characterization of a tumor cell receptor for CSVTCG, a thrombospondin adhesive domain.", *J. Cell Biol.*, c. 120, sy 2, ss. 513-521, Oca. 1993, doi: 10.1083/jcb.120.2.513.
- [29] J. Zhou *vd.*, "Cloning and characterization of angiocidin, a tumor cell binding protein for thrombospondin-1", *J. Cell. Biochem.*, c. 92, sy 1, ss. 125-146, May. 2004, doi: 10.1002/jcb.20076.
- [30] E. Johansson, I. Lönnroth, S. Lange, I. Jonson, E. Jennische, ve C. Lönnroth, "Molecular Cloning and Expression of a Pituitary Gland Protein Modulating Intestinal Fluid Secretion (*)", *J. Biol. Chem.*, c. 270, sy 35, ss. 20615-20620, Eyl. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.35.20615.
- [31] E. Jennische, E. Johansson, H.-A. Hansson, ve I. Jonson, "Immunohistochemical staining patterns using epitope-specific antibodies indicate conformation variants of antiseecretory factor/S5a in the CNS", *APMIS*, c. 114, sy 7-8, ss. 529-538, Ağu. 2006.
- [32] I. Lönnroth ve S. Lange, "Inhibition of cyclic AMP-mediated intestinal hypersecretion by pituitary extracts from rats pretreated with cholera toxin", *Med. Biol.*, c. 62, sy 5, ss. 290-294, 1984.
- [33] I. Lönnroth ve S. Lange, "Purification and characterization of the antiseecretory factor: a protein in the central nervous system and in the gut which inhibits intestinal hypersecretion induced by cholera toxin", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, c. 883, sy 1, ss. 138-144, Ağu. 1986, doi: 10.1016/0304-4165(86)90144-3.
- [34] I. Lönnroth, S. Lange, ve E. Skadhauge, "The antiseecretory factors: Inducible proteins which modulate secretion in the small intestine", *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, c. 90, sy 4, ss. 611-617, Oca. 1988, doi: 10.1016/0300-9629(88)90675-5.
- [35] T. S. Davidson ve W. F. Hickey, "Distribution and immunoregulatory properties of antiseecretory factor", *Lab. Invest.*, c. 84, sy 3, Art. sy 3, Mar. 2004, doi: 10.1038/labinvest.3700036.

- [36] T. S. Davidson ve W. F. Hickey, “Antisecretory factor expression is regulated by inflammatory mediators and influences the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis”, *J. Leukoc. Biol.*, c. 76, sy 4, ss. 835-844, Eki. 2004, doi: 10.1189/jlb.0204085.
- [37] K. Ferrell, Q. Deveraux, S. van Nocker, ve M. Rechsteiner, “Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease”, *FEBS Lett.*, c. 381, sy 1-2, ss. 143-148, Şub. 1996, doi: 10.1016/0014-5793(96)00101-9.
- [38] S. Lange, E. Jennische, E. Johansson, ve I. Lönnroth, “The antisecretory factor: synthesis and intracellular localisation in porcine tissues”, *Cell Tissue Res.*, c. 296, sy 3, s. 607, 1999, doi: 10.1007/s004410051322.
- [39] Q. Deveraux, V. Ustrell, C. Pickart, ve M. Rechsteiner, “A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates.”, *J. Biol. Chem.*, c. 269, sy 10, ss. 7059-7061, Mar. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)37244-7.
- [40] M. Elangovan, E. S. Choi, B. G. Jang, M. S. Kim, ve Y. J. Yoo, “The ubiquitin-interacting motif of 26S proteasome subunit S5a induces A549 lung cancer cell death”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, c. 364, sy 2, ss. 226-230, Ara. 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.127.
- [41] M. Elangovan, D. Y. Shin, ve Y. J. Yoo, “The ubiquitin-interacting motifs of S5a as a unique upstream inhibitor of the 26S proteasome”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, c. 388, sy 4, ss. 723-726, Eki. 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.078.
- [42] R. Piterman *vd.*, “VWA domain of S5a restricts the ability to bind ubiquitin and Ubl to the 26S proteasome”, *Mol. Biol. Cell*, c. 25, sy 25, ss. 3988-3998, Ara. 2014, doi: 10.1091/mbc.e13-11-0697.
- [43] J. Hasskarl, D. S. Mern, ve K. Münger, “Interference of the dominant negative helix–loop–helix protein ID1 with the proteasomal subunit S5A causes centrosomal abnormalities”, *Oncogene*, c. 27, sy 12, ss. 1657-1664, Mar. 2008.
- [44] A. Sparks, S. Dayal, J. Das, P. Robertson, S. Menendez, ve M. K. Saville, “The degradation of p53 and its major E3 ligase Mdm2 is differentially dependent on the proteasomal ubiquitin receptor S5a”, *Oncogene*, c. 33, sy 38, Art. sy 38, Eyl. 2014.
- [45] A. Sparks, C. J. Kelly, ve M. K. Saville, “Ubiquitin receptors play redundant roles in the proteasomal degradation of the p53 repressor MDM2”, *FEBS Lett.*, c. 596, sy 21, ss. 2746-2767, Kas. 2022, doi: 10.1002/1873-3468.14436.

- [46] Z. Wang *vd.*, “S5a binds death receptor-6 to induce THP-1 monocytes differentiation via NF- κ B pathway”, *J. Cell Sci.*, s. jcs.144105, Oca. 2014, doi: 10.1242/jcs.144105.
- [47] Y. Gus, R. Karni, ve A. Levitzki, “Subunit S5a of the 26S proteasome is regulated by antiapoptotic signals”, *FEBS J.*, c. 274, sy 11, ss. 2815-2831, 2007, doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05815.x.
- [48] S. Aydoğan Türkoğlu, G. Dayi, ve F. Köçkar, “Upregulation of PSMD4 gene by hypoxia in prostate cancer cells”, *Turk. J. Biol.*, c. 44, sy 5, ss. 275-283, Eki. 2020, doi: 10.3906/biy-2002-71.
- [49] X. Qian ve G. P. Tuszynski, “Expression of Thrombospondin-1 in Cancer: A Role in Tumor Progression”, *Exp. Biol. Med.*, c. 212, sy 3, ss. 199-207, Tem. 1996, doi: 10.3181/00379727-212-44008.
- [50] J. Lawler, “The structural and functional properties of thrombospondin”, *Blood*, c. 67, sy 5, ss. 1197-1209, May. 1986, doi: 10.1182/blood.V67.5.1197.1197.
- [51] B. Sid *vd.*, “Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, c. 49, sy 3, ss. 245-258, Mar. 2004, doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.009.
- [52] A. Ma, L. Yu, H. Zhao, C. Qin, X. Tian, ve Q. Wang, “PSMD4 regulates the malignancy of esophageal cancer cells by suppressing endoplasmic reticulum stress”, *Kaohsiung J. Med. Sci.*, c. 35, sy 10, ss. 591-597, Eki. 2019, doi: 10.1002/kjm2.12093.
- [53] Y. Sabherwal *vd.*, “Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the anti-angiogenic and anti-tumor activities of angiocidin, a novel tumor-associated protein”, *Exp. Cell Res.*, c. 312, sy 13, ss. 2443-2453, Ağu. 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2006.04.009.
- [54] X. Yang, V. L. Rothman, D. Z. L’Heureux, ve G. Tuszynski, “Reduction of angiocidin expression in human umbilical vein endothelial cells via siRNA silencing inhibits angiogenesis”, *Exp. Mol. Pathol.*, c. 81, sy 2, ss. 108-114, Eki. 2006, doi: 10.1016/j.yexmp.2006.06.003.
- [55] Y. Sabherwal, V. L. Rothman, R. T. P. Poon, ve G. P. Tuszynski, “Clinical significance of serum angiocidin levels in hepatocellular carcinoma”, *Cancer Lett.*, c. 251, sy 1, ss. 28-35, Haz. 2007, doi: 10.1016/j.canlet.2006.10.023.
- [56] C. Liebig, N. Agarwal, G. E. Ayala, G. Verstovsek, G. P. Tuszynski, ve D. Albo, “Angiocidin inhibitory peptides decrease tumor burden in a murine colon cancer model”, *J. Surg. Res.*, c. 142, sy 2, ss. 320-326, Eki. 2007, doi: 10.1016/j.jss.2007.02.036.

- [57] C. Liebig *vd.*, “The role of angiocidin in sarcomas”, *Cancer*, c. 115, sy 22, ss. 5251-5262, Kas. 2009, doi: 10.1002/cncr.24568.
- [58] A. Gaurnier-Hausser, V. L. Rothman, S. Dimitrov, ve G. P. Tuszynski, “The Novel Angiogenic Inhibitor, Angiocidin, Induces Differentiation of Monocytes to Macrophages”, *Cancer Res.*, c. 68, sy 14, ss. 5905-5914, Tem. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6179.
- [59] S. G. Kremlev, A. L. Gaurnier-Hausser, L. D. Valle, G. Perez-Liz, S. Dimitrov, ve G. Tuszynski, “Angiocidin promotes pro-inflammatory cytokine production and antigen presentation in multiple sclerosis”, *J. Neuroimmunol.*, c. 194, sy 1, ss. 132-142, Şub. 2008, doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.11.003.
- [60] D. Z. L’Heureux, V. L. Rothman, ve G. P. Tuszynski, “The interaction of angiocidin with tissue transglutaminase”, *Exp. Mol. Pathol.*, c. 88, sy 1, ss. 15-25, Şub. 2010, doi: 10.1016/j.yexmp.2009.11.001.
- [61] J. Godek, I. Sargiannidou, S. Patel, L. Hurd, V. L. Rothman, ve G. P. Tuszynski, “Angiocidin inhibits breast cancer proliferation through activation of epidermal growth factor receptor and nuclear factor kappa (NF-κB)”, *Exp. Mol. Pathol.*, c. 90, sy 3, ss. 244-251, Haz. 2011, doi: 10.1016/j.yexmp.2011.01.002.
- [62] X. G. Guan *vd.*, “Reduction of angiocidin contributes to decreased HepG2 cell proliferation”, *Afr. Health Sci.*, c. 13, sy 3, Art. sy 3, Eyl. 2013, doi: 10.4314/ahs.v13i3.5.
- [63] Y. Li, Q. Zhou, J. Shen, ve L. Zhu, “Down-regulation of PSMD4 can attenuate autophagy, enhance the accumulation of intracellular ROS, and increase the sensitivity of epithelial ovarian cancer to carboplatin by inhibiting the NF-κB pathway”, *Transl. Cancer Res.*, c. 10, sy 11, ss. 4756-4772, Kas. 2021, doi: 10.21037/tcr-21-1389.
- [64] T. Huang *vd.*, “Upregulation of Rpn10 promotes tumor progression via activation of the NF-κB pathway in clear cell renal cell carcinoma”, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, c. 53, sy 8, ss. 988-996, Haz. 2021, doi: 10.1093/abbs/gmab078.
- [65] M.-J. Cai *vd.*, “Inhibition of PSMD4 blocks the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma”, *Gene*, c. 702, ss. 66-74, Haz. 2019, doi: 10.1016/j.gene.2019.03.063.
- [66] Z. Jiang *vd.*, “Rpn10 promotes tumor progression by regulating hypoxia-inducible factor 1 alpha through the PTEN/Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma”, *Cancer Lett.*, c. 447, ss. 1-11, Nis. 2019.

- [67] Y.-M. Cheng, P.-L. Lin, D.-W. Wu, L. Wang, C.-C. Huang, ve H. Lee, “PSMD4 is a novel therapeutic target in chemoresistant colorectal cancer activated by cytoplasmic localization of Nrf2”, *Oncotarget*, c. 9, sy 41, ss. 26342-26352, May. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.25254.
- [68] M. S. Fejzo *vd.*, “Proteasome ubiquitin receptor *PSMD4* is an amplification target in breast cancer and may predict sensitivity to PARPi: FEJZO et al.”, *Genes. Chromosomes Cancer*, c. 56, sy 8, ss. 589-597, Ağu. 2017, doi: 10.1002/gcc.22459.
- [69] P.-L. Lin, J. T. Chang, D.-W. Wu, C.-C. Huang, ve H. Lee, “Cytoplasmic localization of Nrf2 promotes colorectal cancer with more aggressive tumors via upregulation of PSMD4”, *Free Radic. Biol. Med.*, c. 95, ss. 121-132, Haz. 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.014.
- [70] G. J. Tortora ve B. Derrickson, *Principles of anatomy and physiology*, Fifteenth edition. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2017.
- [71] F. Martini *vd.*, *Fundamentals of anatomy & physiology*, Eleventh edition. New York: Pearson Education, Inc, 2018.
- [72] A. Uc ve D. S. Fishman, “Pancreatic Disorders”, *Pediatr. Clin. North Am.*, c. 64, sy 3, ss. 685-706, Haz. 2017, doi: 10.1016/j.pcl.2017.01.010.
- [73] J. Ferlay *vd.*, “Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer”, 2020. <http://gco.iarc.fr/today> (erişim 14 Ocak 2023).
- [74] P. Rawla, T. Sunkara, ve V. Gaduputi, “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors”, *World J. Oncol.*, c. 10, sy 1, ss. 10-27, 2019, doi: 10.14740/wjon1166.
- [75] H. Sung *vd.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, c. 71, sy 3, ss. 209-249, May. 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [76] J. Ferlay, C. Partensky, ve F. Bray, “More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017”, *Acta Oncol. Stockh. Swed.*, c. 55, sy 9-10, ss. 1158-1160, 2016, doi: 10.1080/0284186X.2016.1197419.
- [77] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, ve L. M. Matrisian, “Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States”, *Cancer Res.*, c. 74, sy 11, ss. 2913-2921, Haz. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0155.

- [78] M. Hidalgo *vd.*, “Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes”, *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI*, c. 15, sy 1, ss. 8-18, 2015, doi: 10.1016/j.pan.2014.10.001.
- [79] C. L. Wolfgang *vd.*, “Recent progress in pancreatic cancer”, *CA. Cancer J. Clin.*, c. 63, sy 5, ss. 318-348, Eyl. 2013, doi: 10.3322/caac.21190.
- [80] “World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention”, International Agency for Research on Cancer, 2020. [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://publications.iarc.fr/586>
- [81] A. McGuigan, P. Kelly, R. C. Turkington, C. Jones, H. G. Coleman, ve R. S. McCain, “Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes”, *World J. Gastroenterol.*, c. 24, sy 43, ss. 4846-4861, Kas. 2018.
- [82] R. S. Apte, D. S. Chen, ve N. Ferrara, “VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development”, *Cell*, c. 176, sy 6, ss. 1248-1264, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
- [83] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. Van Oosterom, ve E. A. De Bruijn, “Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis”, *Pharmacol. Rev.*, c. 56, sy 4, ss. 549-580, Ara. 2004, doi: 10.1124/pr.56.4.3.
- [84] H. Takahashi ve M. Shibuya, “The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions”, *Clin. Sci.*, c. 109, sy 3, ss. 227-241, Eyl. 2005, doi: 10.1042/CS20040370.
- [85] E. Crivellato, “The role of angiogenic growth factors in organogenesis”, *Int. J. Dev. Biol.*, c. 55, sy 4-5, ss. 365-375, 2011, doi: 10.1387/ijdb.103214ec.
- [86] K. Matsumoto ve M. Ema, “Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours”, *J. Biochem. (Tokyo)*, c. 156, sy 1, ss. 1-10, Tem. 2014, doi: 10.1093/jb/mvu031.
- [87] A.-K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, ve L. Claesson-Welsh, “VEGF receptor signalling - in control of vascular function”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, c. 7, sy 5, ss. 359-371, May. 2006, doi: 10.1038/nrm1911.
- [88] K. Suto, Y. Yamazaki, T. Morita, ve H. Mizuno, “Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1”, *J. Biol. Chem.*, c. 280, sy 3, ss. 2126-2131, Oca. 2005, doi: 10.1074/jbc.M411395200.

- [89] S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld, ve M. Klagsbrun, “Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor”, *Cell*, c. 92, sy 6, ss. 735-745, Mar. 1998.
- [90] R. Benedito *vd.*, “Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling”, *Nature*, c. 484, sy 7392, ss. 110-114, Mar. 2012, doi: 10.1038/nature10908.
- [91] T. Tammela *vd.*, “VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling”, *Nat. Cell Biol.*, c. 13, sy 10, ss. 1202-1213, Eyl. 2011, doi: 10.1038/ncb2331.
- [92] F. Dehghanian, Z. Hojati, ve M. Kay, “New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process”, *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, c. 6, sy 4, ss. 192-199, Eki. 2014.
- [93] N. Ferrara, “Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress”, *Endocr. Rev.*, c. 25, sy 4, ss. 581-611, Ağu. 2004, doi: 10.1210/er.2003-0027.
- [94] T. Tammela, B. Enholm, K. Alitalo, ve K. Paavonen, “The biology of vascular endothelial growth factors”, *Cardiovasc. Res.*, c. 65, sy 3, ss. 550-563, Şub. 2005, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.12.002.
- [95] M. Giacca, “Non-redundant functions of the protein isoforms arising from alternative splicing of the VEGF-A pre-mRNA”, *Transcription*, c. 1, sy 3, ss. 149-153, Kas. 2010, doi: 10.4161/trns.1.3.13229.
- [96] M. Tjwa, A. Lutun, M. Autiero, ve P. Carmeliet, “VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis”, *Cell Tissue Res.*, c. 314, sy 1, ss. 5-14, Eki. 2003, doi: 10.1007/s00441-003-0776-3.
- [97] C. S. Melincovici *vd.*, “Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis”, *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.*, c. 59, sy 2, ss. 455-467, 2018.
- [98] T. Arcondéguy, E. Lacazette, S. Millevoi, H. Prats, ve C. Touriol, “VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level”, *Nucleic Acids Res.*, c. 41, sy 17, ss. 7997-8010, Eyl. 2013, doi: 10.1093/nar/gkt539.
- [99] M. I. Costache, M. Ioana, S. Iordache, D. Ene, C. A. Costache, ve A. Săftoiu, “VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature”, *Rom. J. Intern. Med.*, c. 53, sy 3, ss. 199-208, Eyl. 2015, doi: 10.1515/rjim-2015-0027.

- [100] D. Kajdaniuk, B. Marek, H. Borgiel-Marek, ve B. Kos-Kudła, “Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology”, *Endokrynol. Pol.*, c. 62, sy 5, ss. 444-455, 2011.
- [101] B. Olofsson, M. Jeltsch, U. Eriksson, ve K. Alitalo, “Current biology of VEGF-B and VEGF-C”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, c. 10, sy 6, ss. 528-538, Ara. 1999.
- [102] N. Ortega, H. Hutchings, ve J. Plouët, “Signal relays in the VEGF system”, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, c. 4, ss. D141-152, Şub. 1999, doi: 10.2741/A417.
- [103] C. S. Abhinand, R. Raju, S. J. Soumya, P. S. Arya, ve P. R. Sudhakaran, “VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis”, *J. Cell Commun. Signal.*, c. 10, sy 4, ss. 347-354, Ara. 2016.
- [104] M. Lohela, M. Bry, T. Tammela, ve K. Alitalo, “VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, c. 21, sy 2, ss. 154-165, Nis. 2009, doi: 10.1016/j.ceb.2008.12.012.
- [105] M. Shibuya ve L. Claesson-Welsh, “Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis”, *Exp. Cell Res.*, c. 312, sy 5, ss. 549-560, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012.
- [106] “VEGF Signaling Pathway”, *Tocris Bioscience*. <https://www.tocris.com/pathways/vegf-signaling-pathway> (erişim 05 Ocak 2023).
- [107] “KEGG PATHWAY: VEGF signaling pathway - Homo sapiens (human)”. <https://www.kegg.jp/pathway/map=hsa04370&keyword=vegf> (erişim 05 Ocak 2023).
- [108] D. Fukumura *vd.*, “Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells”, *Cell*, c. 94, sy 6, ss. 715-725, Eyl. 1998, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81731-6.
- [109] B. Sipos, W. Klapper, M.-L. Kruse, H. Kalthoff, D. Kerjaschki, ve G. Klöppel, “Expression of Lymphangiogenic Factors and Evidence of Intratumoral Lymphangiogenesis in Pancreatic Endocrine Tumors”, *Am. J. Pathol.*, c. 165, sy 4, ss. 1187-1197, Eki. 2004, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63379-2.
- [110] M. T. Yip-Schneider *vd.*, “Vascular Endothelial Growth Factor, a Novel and Highly Accurate Pancreatic Fluid Biomarker for Serous Pancreatic Cysts”, *J. Am. Coll. Surg.*, c. 218, sy 4, ss. 608-617, Nis. 2014, doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.12.019.
- [111] K.-X. Ai, L.-Y. Lu, X.-Y. Huang, W. Chen, ve H.-Z. Zhang, “Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer”, *World J. Gastroenterol.*, c. 14, sy 12, s. 1931, 2008.

- [112] Z. V. Marschall *vd.*, “De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: Evidence for an autocrine mitogenic loop”, *Gastroenterology*, c. 119, sy 5, ss. 1358-1372, Kas. 2000, doi: 10.1053/gast.2000.19578.
- [113] Y. Seo, H. Baba, T. Fukuda, M. Takashima, ve K. Sugimachi, “High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma”, *Cancer*, c. 88, sy 10, ss. 2239-2245, May. 2000.
- [114] Q.-L. Liang, B.-R. Wang, G.-Q. Chen, G.-H. Li, ve Y.-Y. Xu, “Clinical significance of vascular endothelial growth factor and connexin43 for predicting pancreatic cancer clinicopathologic parameters”, *Med. Oncol.*, c. 27, sy 4, ss. 1164-1170, Ara. 2010, doi: 10.1007/s12032-009-9354-1.
- [115] D. Georgiadou *vd.*, “VEGF and Id-1 in pancreatic adenocarcinoma: Prognostic significance and impact on angiogenesis”, *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO*, c. 40, sy 10, ss. 1331-1337, Eki. 2014, doi: 10.1016/j.ejso.2014.01.004.
- [116] B. Sipos *vd.*, “Vascular endothelial growth factor mediated angiogenic potential of pancreatic ductal carcinomas enhanced by hypoxia: An *in vitro* and *in vivo* study: Angiogenesis in Pancreatic Carcinoma”, *Int. J. Cancer*, c. 102, sy 6, ss. 592-600, Ara. 2002, doi: 10.1002/ijc.10753.
- [117] R.-F. Tang *vd.*, “Expression of vascular endothelial growth factors A and C in human pancreatic cancer”, *World J. Gastroenterol.*, c. 12, sy 2, s. 280, 2006, doi: 10.3748/wjg.v12.i2.280.
- [118] Y. Doi, M. Yashiro, N. Yamada, R. Amano, S. Noda, ve K. Hirakawa, “VEGF-A/VEGFR-2 Signaling Plays an Important Role for the Motility of Pancreas Cancer Cells”, *Ann. Surg. Oncol.*, c. 19, sy 8, ss. 2733-2743, Ağu. 2012, doi: 10.1245/s10434-011-2181-6.
- [119] R. F. Tang *vd.*, “Overexpression of Lymphangiogenic Growth Factor VEGF-C in Human Pancreatic Cancer”:, *Pancreas*, c. 22, sy 3, ss. 285-292, Nis. 2001, doi: 10.1097/00006676-200104000-00010.
- [120] Y. Doi *vd.*, “Significance of phospho-vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in pancreatic cancer”, *Cancer Sci.*, c. 101, sy 6, ss. 1529-1535, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01547.x.

- [121] P. Cheng *vd.*, “Analysis of tumor-induced lymphangiogenesis and lymphatic vessel invasion of pancreatic carcinoma in the peripheral nerve plexus”, *Cancer Sci.*, c. 103, sy 10, ss. 1756-1763, Eki. 2012, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02364.x.
- [122] K. Li *vd.*, “[Expression of vascular endothelial growth factor C in pancreatic cancer and its effect upon lymph node metastasis]”, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, c. 89, sy 34, ss. 2386-2390, Eyl. 2009.
- [123] Z. Von Marschall *vd.*, “Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer”, *Int. J. Oncol.*, c. 27, sy 3, ss. 669-679, Eyl. 2005.
- [124] H. Kurahara, S. Takao, K. Maemura, H. Shinchi, S. Natsugoe, ve T. Aikou, “Impact of Vascular Endothelial Growth Factor-C and -D Expression in Human Pancreatic Cancer”, *Clin. Cancer Res.*, c. 10, sy 24, ss. 8413-8420, Ara. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0379.
- [125] J. S. Wey *vd.*, “Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines”, *Cancer*, c. 104, sy 2, ss. 427-438, Tem. 2005, doi: 10.1002/cncr.21145.
- [126] A. D. Yang *vd.*, “Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Activation Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Pancreatic Carcinoma Cells”, *Cancer Res.*, c. 66, sy 1, ss. 46-51, Oca. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3086.
- [127] G. G. Chung *vd.*, “Vascular endothelial growth factor, FLT-1, and FLK-1 analysis in a pancreatic cancer tissue microarray”, *Cancer*, c. 106, sy 8, ss. 1677-1684, Nis. 2006, doi: 10.1002/cncr.21783.
- [128] F. T. Köçkar, “Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene”, Ph.D, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, 1999.
- [129] A. Froger ve J. E. Hall, “Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method”, *J. Vis. Exp.*, sy 6, s. 253, Ağu. 2007, doi: 10.3791/253.
- [130] J. A. Glasel, “Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios.”, *BioTechniques*, c. 18, sy 1, ss. 62-63, Oca. 1995.
- [131] F. T. Kockar, “Analysis of the *Xenopus laevis* CCAAT-enhancer binding protein alpha gene promoter demonstrates species-specific differences in the mechanisms for both auto-activation and regulation by Sp1”, *Nucleic Acids Res.*, c. 29, sy 2, ss. 362-372, Oca. 2001, doi: 10.1093/nar/29.2.362.

- [132] J. Dale ve M. von Schantz, *From genes to genomes: concepts and applications of DNA technology*. Chichester, West Sussex, England ; New York: Wiley, 2002.
- [133] W. Strober, "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability", içinde *Current Protocols in Immunology*, J. E. Coligan, B. E. Bierer, D. H. Margulies, E. M. Shevach, ve W. Strober, Ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001, s. ima03bs21. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- [134] M. V. Berridge, P. M. Herst, ve A. S. Tan, "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction", içinde *Biotechnology Annual Review*, c. 11, Elsevier, 2005, ss. 127-152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7.
- [135] M. . D. Abramoff, P. J. Magelhaes, ve S. J. Ram, "Image Processing with ImageJ", *Biophotonics International*, c. 11, sy 7, ss. 36-42, 2004.
- [136] A. E. El-Sharkawey, "Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF).", 2016, doi: 10.13140/RG.2.1.1307.8008.
- [137] K. J. Livak ve T. D. Schmittgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method", *Methods*, c. 25, sy 4, ss. 402-408, Ara. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [138] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, c. 72, sy 1-2, ss. 248-254, May. 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [139] S. Kul, "Interpretation of statistical results: what is p value and confidence interval?", *Plevra Bul.*, c. 8, sy 1, ss. 11-13, Mar. 2014, doi: 10.5152/pb.2014.003.

EKLER

EKLER

EK A.1: PSMD4 Geni Transkript Varyant 2 (PSMD4) mRNA Nükleotit Dizisi

► Transkript Varyant 2 mRNA Nükleotit Dizisi: NCBI RefSeq: NM_002810.4

```
1      gttgtaggc cgtcccggag acccggtcgg gagggaggaa ggtggcaaga tggtagttgga
61     aagcactatg gtgtgtgtgg acaacagtga gtatatgcgg aatggagact tcttaccac
121    caggctgcag gccagcagg atgctgtcaa catagtttgt cattcaaaga cccgagcaa
181    ccctgagaac aacgtgggcc ttatcacact ggctaatac tgtgaagtgc tgaccacact
241    caccacagac actggccgta tctgtccaa gctacatact gtccaacca agggcaagat
301    caccttctgc acgggcatcc gcgtggcca tctggctctg aagcaccgac aaggcaagaa
361    tcacaagatg cgcattcattg cctttgtggg aagcccagtg gaggacaatg agaaggatct
421    ggtgaaactg gctaaacgcc tcaagaagga gaaagtaaat gttgacatta tcaattttgg
481    ggaagaggag gtgaacacag aaaagctgac agcctttgta aacacgttga atggcaaaga
541    tggaaaccgt tctcatctgg tgacagtgcc tctggggccc agtttggtg atgctctcat
601    cagttctccg attttggtg gtgaaggtgg tgccatgctg ggtcttggtg ccagtgactt
661    tgaatttgga gtagatccca gtgctgatcc tgagctggcc ttggcccttc gtgtatctat
721    ggaagagcag cggcagcggc aggaggagga ggcccggcgg gcagctgcag cttctgctgc
781    tgaggccggg attgctacga ctgggactga agactcagac gatgccttgc tgaagatgac
841    catcagccag caagagtttg gccgactgag gcttctgac ctaagcagta tgactgagga
901    agagcagatt gcttatgcca tgcatatgct cctgcaggga gcagagtttg gccaggcgga
961    atcagcagac attgatgcca gctcagctat ggacacatct gagccagcca aggaggagga
1021   tgattacgac gtgatgcagg accccgagtt ccttcagagt gtcctagaga acctcccagg
1081   tgtggatccc aacaatgaag ccattcgaaa tgctatgggc tcctggcct cccaggccac
1141   caaggacggc aagaaggaca agaaggagga agacaaga agtgagactgga gggaaaggtt
1201   agctgagtct gcttagggga ctgcatggga agcacggaat atagggttag atgtgtgtta
1261   tctgtaacca ttacagccta aataaagctt ggcaactttt tttccttttt tgcttcaaa
```

► İzoform 2 (PSMD4) Protein Amino Asit Dizisi (377 aa):

NCBI RefSeq: NP_002801.1

```
1      M VLESTMVCV DNSEYMRNGD FLPTRLQAQQ DAVNIVCHSK TRSNPENNVG LITLANDCEV
61     LTTLTPDTGR ILSKLHTVQP KGKTFCTGI RVAHLALKHR QGKNHKMRII AFVGGSPVEDN
121    EKDLVKLAKR LKKEKVNVDI INFGEDEVNT EKLTAQVNTL NGKDGTSGLV VTPVPGPSLA
181    DALISSPILA GEGGAMLGLG ASDFEFGVDP SADPELALAL RVSMEEQRQR QEEEARRAAA
241    ASAAEAGIAT TGTEDSDDAL LKMTISQQEF GRTGLPDLSS MTEEEQIAYA MQMSLQGAEF
301    GQAESADIDA SSAMDTSEPA KEEDDYVMQ DPEFLQSVLE NLPGVDPNNE AIRNAMGSLA
361    SQATKDGKKD KKEEDK
```

► Amino Asitlerin Kısaltması

Alanin (Ala) → A	Glisin (Gly) → G	Lizin (Lys) → K	Sistein (Cys) → C
Arjinin (Arg) → R	Glutamat (Glu) → E	Lösin (Leu) → L	Tirozin (Tyr) → Y
Asparajin (Asn) → N	Glutamin (Gln) → Q	Metiyonin (Met) → M	Treonin (Thr) → T
Aspartat (Asp) → D	Histidin (His) → H	Prolin (Pro) → P	Triptofan (Trp) → W
Fenilalanin (Phe) → F	İzolösin (İle) → I	Serin (Ser) → S	Valin (Val) → V

EK A.2: PSMD4 Geni Transkript Varyant 1 (Angiosidin) mRNA Nükleotit Dizisi

► Transkript Varyant 1 mRNA Nükleotit Dizisi: NCBI RefSeq: NM_001330692.2

```
1      gttgtaggc cgtcccggag acccggctcgg gagggaggaa ggtggcaaga tggtgttggg
61     aagcactatg gtgtgtgtgg acaacagtga gtatatgcgg aatggagact tcttaccac
121    caggctgcag gccagcagg atgctgtcaa catagtttgt cattcaaaga cccgcagcaa
181    ccctgagaac aacgtgggcc ttatcacact ggctaatac tgtgaagtgc tgaccacact
241    caccacagac actggccgta tctgttccaa gctacatact gtccaacca agggcaagat
301    caccttctgc acgggcatcc gcgtggccca tctggctctg aagcaccgac aaggcaagaa
361    tcacaagatg cgcattcattg cctttgtggg aagcccagtg gaggacaatg agaaggatct
421    ggtgaaactg gctaaacgcc tcaagaagga gaaagtaaat gttgacatta tcaattttgg
481    ggaagaggag gtgaacacag aaaagctgac agcctttgta aacacgttga atggcaaaga
541    tggaaccggt tctcatctgg tgacagtgcc tcttgggcc agtttggctg atgctctcat
601    cagttctccg attttggctg gtgaaggtgg tgccatgctg ggtcttgggtg ccagtgactt
661    tgaatttggg gtagatccca gtgctgatcc tgagctggcc ttggcccttc gtgtatctat
721    ggaagagcag cggcagcggc aggaggagga ggcccggcgg gcagctgcag cttctgctgc
781    tgaggccggg attgctacga ctgggactga aggtgaaaga gactcagacg atgcctgct
841    gaagatgacc atcagccagc aagagtttgg ccgcaactgg cttcctgacc taagcagtat
901    gactgaggaa gagcagattg cttatgccat gcagatgtcc ctgcaggag cagagtttgg
961    ccaggcggaa tcagcagaca ttgatgccag ctcagctatg gacacatctg agccagccaa
1021   ggaggaggat gattacgacg tgatgcagga ccccgagttc cttcagagtg tccatagagaa
1081   cctcccaggt gtggatccca acaatgaagc cattcgaaat gctatgggct ccttggcctc
1141   ccaggccacc aaggacggca agaaggacaa gaaggaggaa gacaagaagt gagactggag
1201   ggaaagggta gctgagtctg cttaggggac tgcatgggaa gcacggaata tagggttaga
1261   tgtgtgttat ctgtaaccat tacagcctaa ataaagcttg gcaactttt
```

► İzoform 1 (Angiosidin) Protein Amino Asit Dizisi (380 aa):

NCBI RefSeq: NP_001317621.1

```
1      VVLESTMVCV DNSEYMRNGD FLPTRLQAQQ DAVNIVCHSK TRSNPENNVG LITLANDCEV
61     LTTLTPTDGR ILSKLHTVQP KGKIFCTGI RVAHLALKHR QGKNHKMRII AFVGGSPVEDN
121    EKDLVKLAKR LKKEKVNVDI IINFGEENVNT EKLTAHVNTL NGKDGTSGLV VTPVPPPSLA
181    DALISSPILA GEGGAMLGLG ASDFEFGVDP SADPELALAL RVSMEEQQR QEEEEARRAA
241    ASAAEAGIAT TGTEGERDSD DALLKMTISQ QEFGRITGLPD LSSMTEEEQI AYAMQMSLQG
301    AEFQQAESAD IDASSAMDTSEPAKEEDDYD VMQDPEFLQS VLENLPGVDP NNEAIRNAMG
361    SLASQATKDG KKDKKEEDKK
```

► Amino Asitlerin Kısaltması

Alanin (Ala) → A	Glisin (Gly) → G	Lizin (Lys) → K	Sistein (Cys) → C
Arjinin (Arg) → R	Glutamat (Glu) → E	Lösin (Leu) → L	Tirozin (Tyr) → Y
Asparajin (Asn) → N	Glutamin (Gln) → Q	Metiyonin (Met) → M	Treonin (Thr) → T
Aspartat (Asp) → D	Histidin (His) → H	Prolin (Pro) → P	Triptofan (Trp) → W
Fenilalanin (Phe) → F	İzolösin (İle) → I	Serin (Ser) → S	Valin (Val) → V

EK B: PSMD4 ve Angiosidin Gen Dizilerinin Karşılaştırılması

PSMD4	1	ATGGTGTGGAAAGCACTATGGTGTGTGTGGACAACAGTGAGTATATGCGGAATGGAGAC	60
Angio	1	ATGGTGTGGAAAGCACTATGGTGTGTGTGGACAACAGTGAGTATATGCGGAATGGAGAC	60
PSMD4	61	TTCTTACCCACCAGGCTGCAGGCCAGCAGGATGCTGTCAACATAGTTTGTCAATTCAAAG	120
Angio	61	TTCTTACCCACCAGGCTGCAGGCCAGCAGGATGCTGTCAACATAGTTTGTCAATTCAAAG	120
PSMD4	121	ACCCGCAGCAACCCTGAGAACAACGTGGGCCCTTATCACACTGGCTAATGACTGTGAAGTG	180
Angio	121	ACCCGCAGCAACCCTGAGAACAACGTGGGCCCTTATCACACTGGCTAATGACTGTGAAGTG	180
PSMD4	181	CTGACCACACTCACCCAGACACTGGCCGTATCCTGTCCAAGCTACATACTGTCCAACCC	240
Angio	181	CTGACCACACTCACCCAGACACTGGCCGTATCCTGTCCAAGCTACATACTGTCCAACCC	240
PSMD4	241	AAGGGCAAGATCACCTTCTGCACGGGCATCCGCGTGGCCCATCTGGCTCTGAAGCACCGA	300
Angio	241	AAGGGCAAGATCACCTTCTGCACGGGCATCCGCGTGGCCCATCTGGCTCTGAAGCACCGA	300
PSMD4	301	CAAGGCAAGAATCACAAAGATGCGCATCATTGCCTTTGTGGGAAGCCCAGTGGAGGACAAT	360
Angio	301	CAAGGCAAGAATCACAAAGATGCGCATCATTGCCTTTGTGGGAAGCCCAGTGGAGGACAAT	360
PSMD4	361	GAGAAGGATCTGGTGAACTGGCTAAACGCCTCAAGAAGGAGAAAGTAAATGTTGACATT	420
Angio	361	GAGAAGGATCTGGTGAACTGGCTAAACGCCTCAAGAAGGAGAAAGTAAATGTTGACATT	420
PSMD4	421	ATCAATTTTGGGAAGAGGAGGTGAACACAGAAAAGCTGACAGCCTTTGTAACACGTTG	480
Angio	421	ATCAATTTTGGGAAGAGGAGGTGAACACAGAAAAGCTGACAGCCTTTGTAACACGTTG	480
PSMD4	481	AATGGCAAAGATGGAACCGGTTCTCATCTGGTGACAGTGCCTCCTGGGCCAGTTGGCT	540
Angio	481	AATGGCAAAGATGGAACCGGTTCTCATCTGGTGACAGTGCCTCCTGGGCCAGTTGGCT	540
PSMD4	541	GATGCTCTCATCAGTTCTCCGATTTTGGCTGGTGAAGGTGGTGCCATGCTGGGTCTTGGT	600
Angio	541	GATGCTCTCATCAGTTCTCCGATTTTGGCTGGTGAAGGTGGTGCCATGCTGGGTCTTGGT	600
PSMD4	601	GCCAGTGACTTTGAATTTGGAGTAGATCCCAGTGCTGATCCTGAGCTGGCCTTGGCCCTT	660
Angio	601	GCCAGTGACTTTGAATTTGGAGTAGATCCCAGTGCTGATCCTGAGCTGGCCTTGGCCCTT	660
PSMD4	661	CGTGTATCTATGGAAGAGCAGCGGCAGCGCAGGAGGAGGAGGCCCGGCGGGCAGCTGCA	720
Angio	661	CGTGTATCTATGGAAGAGCAGCGGCAGCGCAGGAGGAGGAGGCCCGGCGGGCAGCTGCA	720
PSMD4	721	GCTTCTGCTGCTGAGGCCGGGATTGCTACGACTGGGACTGA-----AGACTCAGAC	771
Angio	721	GCTTCTGCTGCTGAGGCCGGGATTGCTACGACTGGGACTGAAGGTGAAAGAGACTCAGAC	780
PSMD4	772	GATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCCAGCAAGAGTTTGCCCGCACTGGGCTTCCTGAC	831
Angio	781	GATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCCAGCAAGAGTTTGCCCGCACTGGGCTTCCTGAC	840
PSMD4	832	CTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGATTGCTTATGCCATGCAGATGTCCCTGCAGGGA	891
Angio	841	CTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGATTGCTTATGCCATGCAGATGTCCCTGCAGGGA	900
PSMD4	892	GCAGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAGACATTGATGCCAGCTCAGCTATGGACACATCT	951
Angio	901	GCAGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAGACATTGATGCCAGCTCAGCTATGGACACATCT	960
PSMD4	952	GAGCCAGCCAAGGAGGAGGATGATTACGACGTGATGCAGGACCCCGAGTTCCTTCAGAGT	1011
Angio	961	GAGCCAGCCAAGGAGGAGGATGATTACGACGTGATGCAGGACCCCGAGTTCCTTCAGAGT	1020
PSMD4	1012	GTCCTAGAGAACCTCCCAGGTGTGGATCCCAACAATGAAGCCATTTCGAAATGCTATGGGC	1071
Angio	1021	GTCCTAGAGAACCTCCCAGGTGTGGATCCCAACAATGAAGCCATTTCGAAATGCTATGGGC	1080
PSMD4	1072	TCCCTGGCCTCCCAGGCCACCAAGGACGGCAAGAAGGACAAGAAGGAGGAAGACAAGAAG	1131
Angio	1081	TCCCTGGCCTCCCAGGCCACCAAGGACGGCAAGAAGGACAAGAAGGAGGAAGACAAGAAG	1140
PSMD4	1132	TGA 1134	
Angio	1141	TGA 1143	

EK C: PSMD4 Varyant 2 mRNA'sı Restriksiyon Haritası

Noncutters: *AarI, AatII, AbsI, Accl, AclI, Acyl, AflIII, AjuI, AlfI, ApaLI, AscI, AvrII, BaeI, BarI, BcgI, BclI, BglII, BplI, BsaAI, BsePI, BsmI, BspI407I, BspHI, BspMI, BsrBI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtsI, ClaI, CspCI, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco3II, Eco47III, EcoRI, EcoRV, Esp3I, FseI, GsuI, HaeII, HaeIV, HgaI, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NruI, NspI, PacI, PasI, PfoI, PmaCI, PmeI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, Scal, PI-SceI, SexAI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, SspI, StuI, SwaI, TaqII, TatI, TspGWI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI*

Tablo C.1: PSMD4 varyant 2 mRNA restriksiyon haritası.

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<i>Ball</i>	TGGCCA	6	blunt	1	902
<i>BtrI</i>	CACGTC	6	blunt	1	981
<i>FspAI</i>	RTGCGCAY	8	blunt	1	322
<i>OliI</i>	CACNNNNGTG	6	blunt	1	19
<i>PvuII</i>	CAGCTG	6	blunt	1	715
<i>AflIII</i>	ACRYGT	6	five_prime	1	473
<i>AgeI</i>	ACCGGT	6	five_prime	1	496
<i>ApoI</i>	RAATTY	6	five_prime	1	613
<i>AsuII</i>	TTCGAA	6	five_prime	1	1056
<i>AvaI</i>	CYCGRG	6	five_prime	1	994
<i>AvaII</i>	GGWCC	5	five_prime	1	990
<i>BamHI</i>	GGATCC	6	five_prime	1	1035
<i>BbvCI</i>	CCTCAGC	7	five_prime	1	731
<i>BsmAI</i>	GTCTC	5	five_prime	1	50
<i>Cfr10I</i>	RCCGGY	6	five_prime	1	496
<i>DraII</i>	RGGNCCY	6	five_prime	1	990
<i>EcoNI</i>	CCTNNNNNAGG	6	five_prime	1	394
<i>PleI</i>	GAGTC	5	five_prime	1	757
<i>PpuMI</i>	RGGWCCY	7	five_prime	1	990
<i>SmlI</i>	CTYRAG	6	five_prime	1	391
<i>ApaI</i>	GGGCCC	6	three_prime	1	530
<i>BciVI</i>	GTATCC	6	three_prime	1	220

Tablo C.1 (devam)

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<i>BseSI</i>	GKGCMC	6	three_prime	1	530
<i>BsgI</i>	GTGCAG	6	three_prime	1	243
<i>BsrDI</i>	GCAATG	6	three_prime	1	326
<i>EciI</i>	GGCGGA	6	three_prime	1	922
<i>Hpy99I</i>	CGWCG	5	three_prime	1	982
<i>MmeI</i>	TCCRAC	6	three_prime	1	258
<i>PflMI</i>	CCANNNNNTGG	6	three_prime	1	202
<i>SfiI</i>	GGCCNNNNNGGCC	8	three_prime	1	1084
<i>Sse8387I</i>	CCTGCAGG	8	three_prime	1	887
<i>TspDTI</i>	ATGAA	5	three_prime	1	1061
<i>BsaBI</i>	GATNNNNATC	6	blunt	2	322, 790
<i>HindII</i>	GTYRAC	6	blunt	2	99, 414
<i>XmnI</i>	GAANNNNTTC	6	blunt	2	498, 1052
<i>BseYI</i>	CCCAGC	6	five_prime	2	83, 588
<i>FauI</i>	CCCGC	5	five_prime	2	130, 701
<i>SapI</i>	GCTCTTC	7	five_prime	2	668, 845
<i>TfiI</i>	GAWTC	5	five_prime	2	309, 910
<i>Tsp45I</i>	GTSAC	5	five_prime	2	510, 604
<i>AloI</i>	GAACNNNNNTCC	7	three_prime	2	982, 1014
<i>AlwNI</i>	CAGNNNCTG	6	three_prime	2	202, 724
<i>ArsI</i>	GACNNNNNNTTYG	7	three_prime	2	598, 630
<i>BdaI</i>	TGANNNNNTCA	6	three_prime	2	171, 205
<i>BsaXI</i>	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	2	504, 534
<i>FalI</i>	AAGNNNNNCTT	6	three_prime	2	238, 270
<i>PpiI</i>	GAACNNNNNCTC	7	three_prime	2	486, 518
<i>SduI</i>	GDGCHC	6	three_prime	2	530, 1072
<i>TsoI</i>	TARCCA	6	three_prime	2	151, 370
<i>XcmI</i>	CCANNNNNNNNTGG	6	three_prime	2	805, 936
<i>MslI</i>	CAYNNNNRTG	6	blunt	3	19, 271, 874
<i>BccI</i>	CCATC	5	five_prime	3	287, 484, 799
<i>Bpu10I</i>	CCTNAGC	6	five_prime	3	641, 731, 832
<i>CfrI</i>	YGGCCR	6	five_prime	3	204, 810, 900
<i>FokI</i>	GGATG	5	five_prime	3	103, 253, 982

Tablo C.1 (devam)

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<i>XhoII</i>	RGATCY	6	five_prime	3	366, 624, 1035
<i>AgsI</i>	TTSAA	5	three_prime	3	116, 480, 613
<i>PstI</i>	CTGCAG	6	three_prime	3	80, 720, 887
<i>TauI</i>	GCSGC	5	three_prime	3	684, 690, 815
<i>StyI</i>	CCWWGG	6	five_prime	4	239, 650, 959, 1091
<i>BglI</i>	GCCNNNNNGGC	6	three_prime	4	283, 525, 709, 1084
<i>BseRI</i>	GAGGAG	6	three_prime	4	451, 709, 712, 979
<i>Eco57I</i>	CTGAAG	6	three_prime	4	310, 779, 802, 988
<i>Eco57MI</i>	CTGRAG	6	three_prime	4	310, 779, 802, 988
<i>Hin4I</i>	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	4	504, 536, 916, 948
<i>TstI</i>	CACNNNNNTCC	6	three_prime	4	332, 364, 807, 839
<i>EcoP15I</i>	CAGCAG	6	five_prime	5	115, 697, 700, 750, 944
<i>BfiI</i>	ACTGGG	6	three_prime	5	340, 524, 623, 761, 827
<i>EcoRII</i>	CCWGG	5	five_prime	6	70, 522, 902, 1026, 1073, 1082
<i>HphI</i>	GGTGA	5	three_prime	6	183, 243, 384, 453, 522, 583
<i>MboII</i>	GAAGA	5	three_prime	6	445, 685, 772, 795, 862, 1132
<i>BseMII</i>	CTCAG	5	three_prime	7	125, 632, 722, 779, 836, 941, 947
<i>BbvI</i>	GCAGC	5	five_prime	8	62, 137, 690, 696, 702, 714, 724, 730
<i>SfaNI</i>	GCATC	5	five_prime	8	81, 275, 308, 332, 531, 762, 915, 974
<i>TseI</i>	GCWGC	5	five_prime	8	75, 125, 678, 684, 712, 715, 718, 727
<i>TspRI</i>	CASTG	5	three_prime	8	42, 164, 207, 353, 521, 609, 636, 822
<i>BsrI</i>	ACTGG	5	three_prime	9	164, 207, 346, 383, 530, 602, 629, 756, 822

EK D: Alt Klonlama Dizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

PSMD4	87	GTGAGTATATGCGGAATGGAGACTTCTTACCCACCAGGCTGCAGGCCAGCAGGATGCTG 	146
KlonF	1	GTGAGTATATGCGGAATGGAGACTTCTTACCCACCAGGCTGCAGGCCAGCAGGATGCTG 	60
PSMD4	147	TCAACATAGTTTGTTCATTCAAAGACCCGAGCAACCCTGAGAACAACGTGGGCCTTATCA 	206
KlonF	61	TCAACATAGTTTGTTCATTCAAAGACCCGAGCAACCCTGAGAACAACGTGGGCCTTATCA 	120
PSMD4	207	CACTGGCTAATGACTGTGAAGTGTGACCACACTCACCCAGACACTGGCCGTATCCTGT 	266
KlonF	121	CACTGGCTAATGACTGTGAAGTGTGACCACACTCACCCAGACACTGGCCGTATCCTGT 	180
PSMD4	267	CCAAGCTACATACTGTCCAACCCAAGGGCAAGATCACCTTCTGCACGGGCATCCGCGTGG 	326
KlonF	181	CCAAGCTACATACTGTCCAACCCAAGGGCAAGATCACCTTCTGCACGGGCATCCGCGTGG 	240
PSMD4	327	CCCATCTGGCTCTGAAGCACCGACAAGGCAAGAATCACAAGATGCGCATCATTGCCTTTG 	386
KlonF	241	CCCATCTGGCTCTGAAGCACCGACAAGGCAAGAATCACAAGATGCGCATCATTGCCTTTG 	300
PSMD4	387	TGGGAAGCCCAGTGGAGGACAATGAGAAGGATCTGGTGAAACTGGCTAAACGCCTCAAGA 	446
KlonF	301	TGGGAAGCCCAGTGGAGGACAATGAGAAGGATCTGGTGAAACTGGCTAAACGCCTCAAGA 	360
PSMD4	447	AGGAGAAAGTAAATGTTGACATTATCAATTTTGGGGAAGAGGAGGTGAACACAGAAAAGC 	506
KlonF	361	AGGAGAAAGTAAATGTTGACATTATCAATTTTGGGGAAGAGGAGGTGAACACAGAAAAGC 	420
PSMD4	507	TGACAGCCTTTGTAAACACGTTGAATGGCAAAGATGGAACCGTTCTCATCTGGTGACAG 	566
KlonF	421	TGACAGCCTTTGTAAACACGTTGAATGGCAAAGATGGAACCGTTCTCATCTGGTGACAG 	480
PSMD4	567	TGCCTCCTGGGCCAGTTTGGCTGATGCTCTCATCAGTTCTCCGATTTTGGCTGGTGAAG 	626
KlonF	481	TGCCTCCTGGGCCAGTTTGGCTGATGCTCTCATCAGTTCTCCGATTTTGGCTGGTGAAG 	540
PSMD4	627	GTGGTGCCATGCTGGGTCTTGGTGCCAGTGACTTTGAATTTGGAGTAGATCCCAGTGCTG 	686
KlonF	541	GTGGTGCCATGCTGGGTCTTGGTGCCAGTGACTTTGAATTTGGAGTAGATCCCAGTGCTG 	600
PSMD4	687	ATCCTGAGCTGGCCTTGGCCCTTCGTGTATCTATGGAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGGAGG 	746
KlonF	601	ATCCTGAGCTGGCCTTGGCCCTTCGTGTATCTATGGAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGGAGG 	660
PSMD4	747	AGGAGGCCCGGGCGGCAGCTGCAGCTTCTGCTGCTGAGGCCGGGATTGCTACGACTGGGA 	806
KlonF	661	AGGAGGCCCGGGCGGCAGCTGCAGCTTCTGCTGCTGAGGCCGGGATTGCTACGACTGGGA 	720
PSMD4	807	CTGAAGACTCAGACGATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCCAGCAAGAGTTTGGCCGCA 	866
KlonF	721	CTGAAGACTCAGACGATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCCAGCAAGAGTTTGGCCGCA 	780
PSMD4	867	CTGGGCTTCCTGACCTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGATTGCTTATGCCATGCAGA 	926
KlonF	781	CTGGGCTTCCTGACCTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGATTGCTTATGCCATGCAGA 	840
PSMD4	927	TGTCCCTGCAGGGAGCAGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAGACATTGATGCCAGCTCAG 	986
KlonF	841	TGTCCCTGCAGGGAGCAGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAGACATTGATGCCAGCTCAG 	900
PSMD4	987	CTATGGACACATCTGAGCCAGCCAAGGAGGAGGATGATTACGACGTGATGCAGGACCCCG 	1046
KlonF	901	CTATGGACACATCCGAGCCAGCCAAGGAGG--GGATGATTACGACGTGATGCAGGACCCCG 	959

EK E: PCR1 ve PCR2 için Çoğalma Bölgeleri

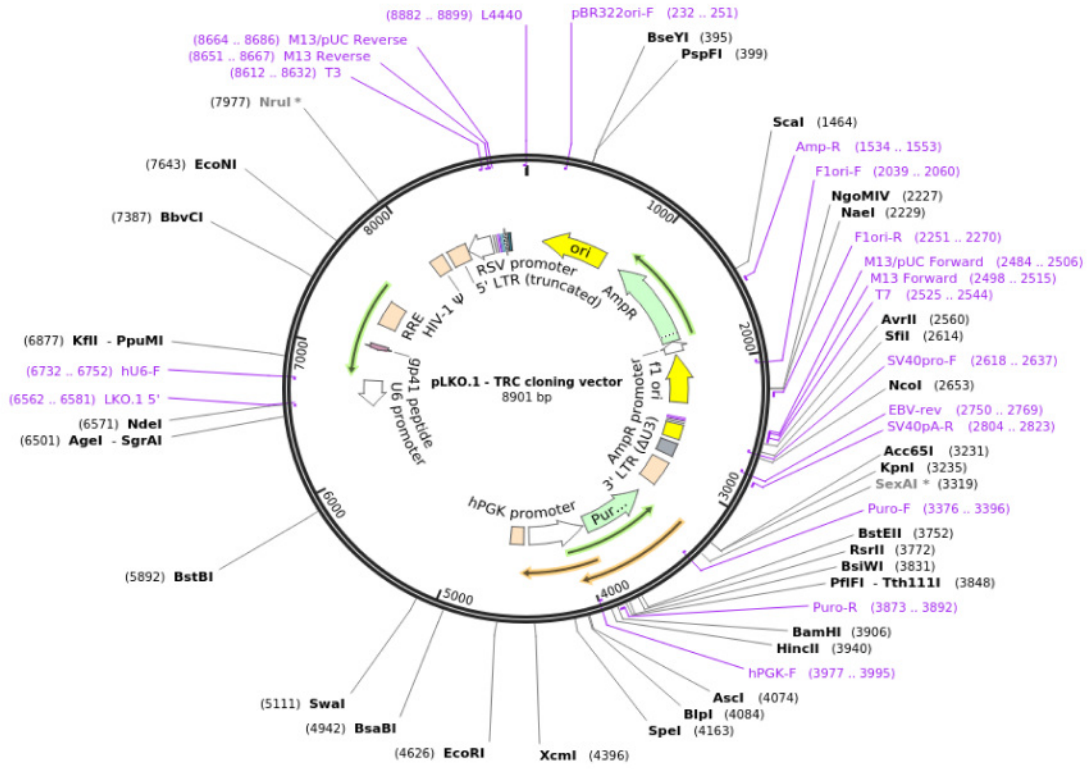
► PCR1 için 793 nükleotitik bölge;

```
aactcgaga gagatggtgt tggaaagcac tatggtgtgt gtggacaaca gtgagtatat
gcggaatgga gacttcttac ccaccaggct gcaggcccag caggatgctg tcaacatagt
ttgtcattca aagaccgcga gcaaccctga gaacaacgtg ggccttatca cactggctaa
tgactgtgaa gtgctgacca cactcacccc agacactggc cgtatcctgt ccaagctaca
tactgtccaa cccaagggca agatcacctt ctgcacgggc atccgcgtgg cccatctggc
tctgaagcac cgacaaggca agaatacaca gatgcgcatc attgcctttg tgggaagccc
agtggaggac aatgagaagg atctggtgaa actggctaaa cgcctcaaga aggagaaagt
aaatgttgac attatcaatt ttggggaaga ggaggtgaac acagaaaagc tgacagcctt
tgtaaacacg ttgaatggca aagatggaac cggttctcat ctggtgacag tgacctctgg
gccagtttg gctgatgctc tcatcagttc tccgattttg gctggtgaag gtggtgccat
gctgggtctt ggtgccagtg actttgaatt tggagtagat cccagtgctg atcctgagct
ggccttgcc cttcgtgtat ctatggaaga gcagcggcag cggcaggagg aggaggccg
gcgggcagct gcagcttctg ctgctgaggc cgggattgct acgactggga ctgaaggtga
aagagactca gacg
```

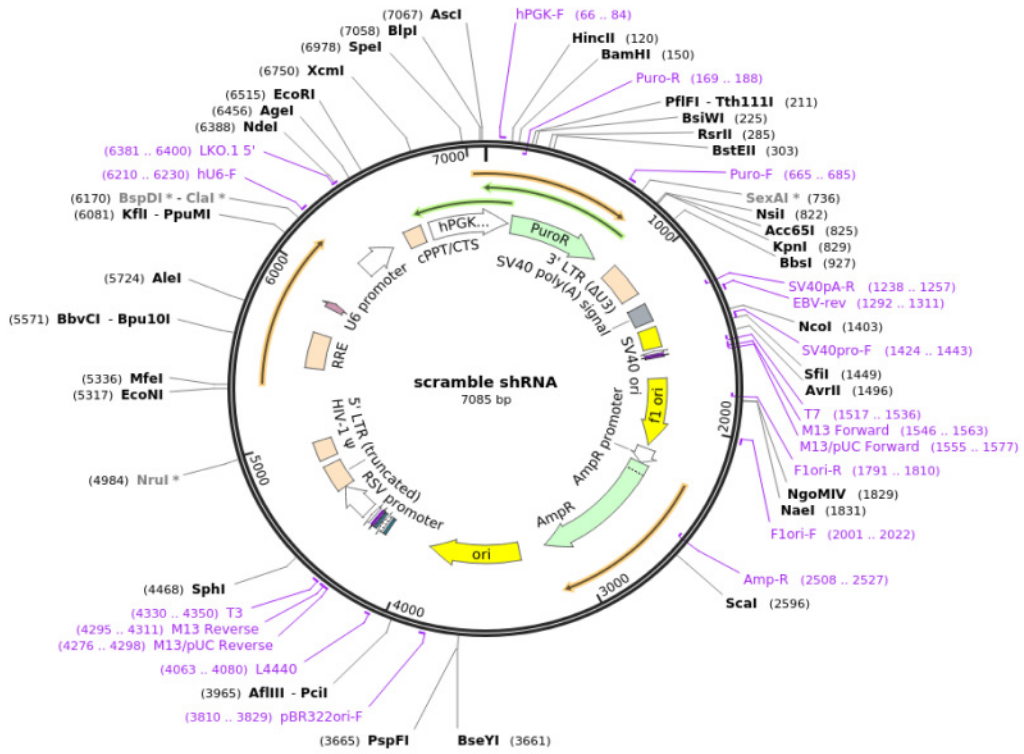
► PCR2 için 400 nükleotitik bölge;

```
tggga ctgaaggtga aagagactca gacgatgccc tgctgaagat gaccatcagc
cagcaagagt ttggccgcac tgggcttccct gacctaaagca gtatgactga ggaagagcag
attgcttatg ccatgcagat gtccctgcag ggagcagagt ttggccaggc ggaatcagca
gacattgatg ccagctcagc tatggacaca tctgagccag ccaaggagga ggatgattac
gacgtgatgc aggaccccga gttccttcag agtgtcctag agaacctccc aggtgtggat
ccaacaatg aagccattcg aatgctatg ggctccctgg cctcccaggc caccaaggac
ggcaagaagg acaagaagg ggaagacaag aagtga (+ 9 Nükleotit)
```

EK F: Susturma Çalışmalarında Kullanılan Vektörler



▲ pLKO.1-TRC Klonlama Vektörü



▲ Scramble shRNA Vektörü

EK G: PSMD4 Promotor Parçalarının Dizi Sonuçlarının Karşılaştırılması

▼P1: 150 bç (-98/+52) promotor parçasının NCBI (RefSeq: NG_029700.1) blast sonucu

NCBI	4916	TACAAC TCCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTC	4975
P1	150	TACAAC TCCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTC	91
NCBI	4976	TGTGATTGGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGAC	5035
P1	90	TGTGATTGGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGAC	31
NCBI	5036	CCGGTCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG	5065
P1	30	CCGGTCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG	1

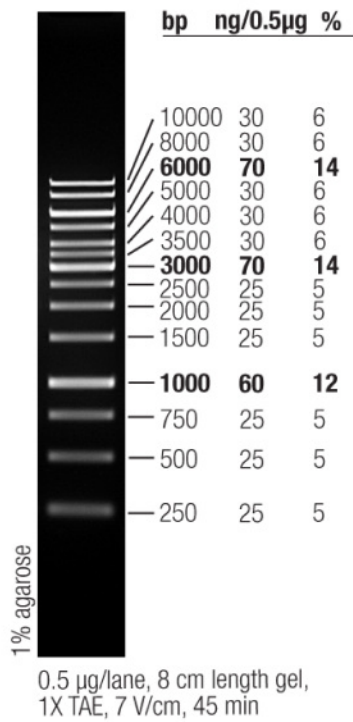
▼P2: 326 bç (-274/+52) promotor parçasının NCBI (RefSeq: NG_029700.1) blast sonucu

NCBI	4740	GGAATCGACACAGCACTTTCAAAGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGG	4799
P2	326	GGAATCGACACAGCACTTTCAAAGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGG	267
NCBI	4800	AAACCCCAACTGAGAAGTGAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTTGTGT	4859
P2	266	AAACCCCAACTGAGAAGTGAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTTGTGT	207
NCBI	4860	TACCGGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTTGGCGGCACCTACA	4919
P2	206	TACCGGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTTGGCGGCACCTACA	147
NCBI	4920	ACTCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTG	4979
P2	146	ACTCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTG	87
NCBI	4980	ATTGGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGG	5039
P2	86	ATTGGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGG	27
NCBI	5040	TCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG	5065
P2	26	TCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG	1

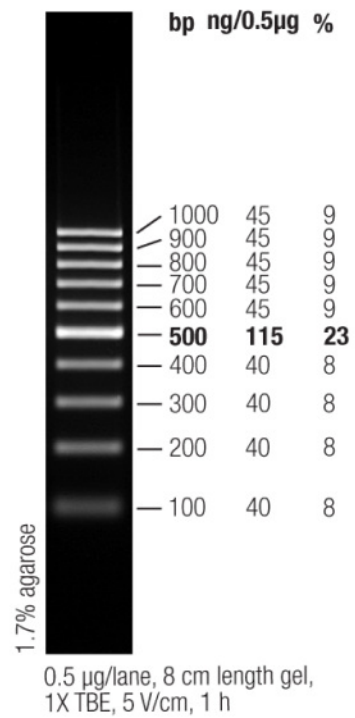
▼P3: 683 bç (-631/+52) promotor parçasının NCBI (RefSeq: NG_029700.1) blast sonucu

NCBI	4383	GTAGAAAGTCATTAGCGATCCCAGACACTTTTTTTTTTCTTTTTTTGAGACGGAGTCTCAC	4442
P3	1	GTAGAAAGTCATTAGCGATCCCAGACACTTTTTTTTTTCTTTTTTTGAGACGGAGTCTCAC	60
NCBI	4443	TCTGTCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGGATCTCGGCTCACTGCAATCTCTGCCTCCC	4502
P3	61	TCTGTCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGGATCTCGGCTCACTGCAATCTCTGCCTCCC	120
NCBI	4503	GGGTTCAAGTAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCGGGGATTACAGCGGTGCGCCA	4562
P3	121	GGGTTCAAGTAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCGGGGATTACAGCGGTGCGCCA	180
NCBI	4563	CCATGCCCGGCTAATTTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGCTGGCCAGG	4622
P3	181	CCATGCCCGGCTAATTTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGCTGGCCAGG	240
NCBI	4623	CTGGTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTCTGGGCTA	4682
P3	241	CTGGTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTCTGGGCTA	300
NCBI	4683	ACAGGCGTGAGCCACCGCGCTCGGCCGATCCCGACACTTTTTTAAAATGCCGAAGCCGGA	4742
P3	301	ACAGGCGTGAGCCACCGCGCTCGGCCGATCCCGACACTTTTTTAAAATGCCGAAGCCGGA	360
NCBI	4743	ATCGACACAGCACTTTCAAAGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGGAAA	4802
P3	361	ATCGACACAGCACTTTCAAAGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGGAAA	420
NCBI	4803	CCCCAACTGAGAAGTGAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTTGTGTTAC	4862
P3	421	CCCCAACTGAGAAGTGAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTTGTGTTAC	480
NCBI	4863	CGCGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTTGGCGGCACCTACAAC	4922
P3	481	CGCGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTTGGCGGCACCTACAAC	540
NCBI	4923	CCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATT	4982
P3	541	CCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATT	600
NCBI	4983	GGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCCG	5042
P3	601	GGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCCG	660
NCBI	5043	GGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG	5065
P3	661	GGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG	683

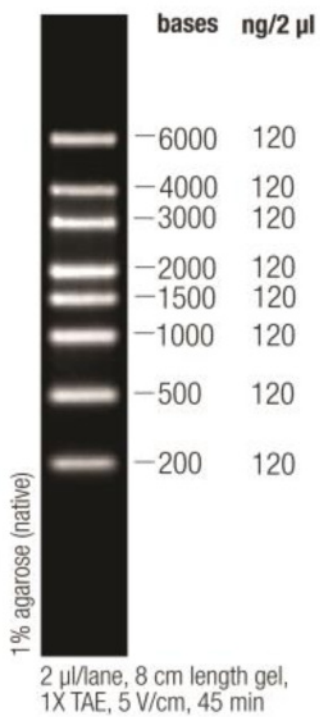
EK H: Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



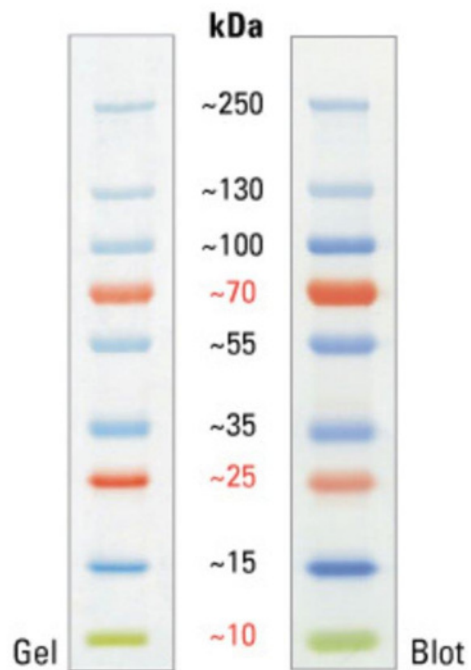
▲ **1 kb DNA Ladder**
(GeneRuler™)



▲ **100 bp DNA Ladder**
(GeneRuler™)

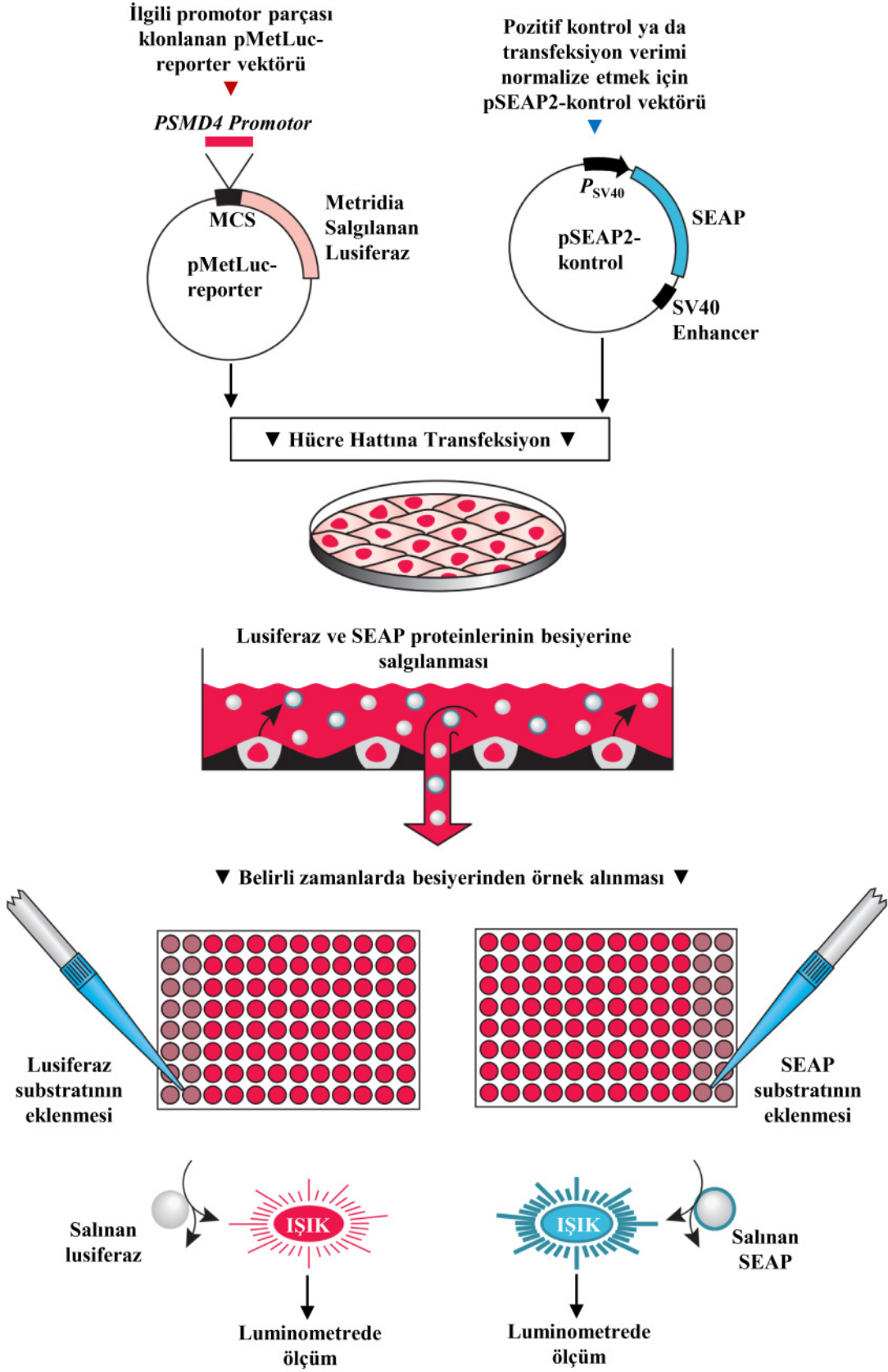


▲ **RNA Ladder**
(RiboRuler™)



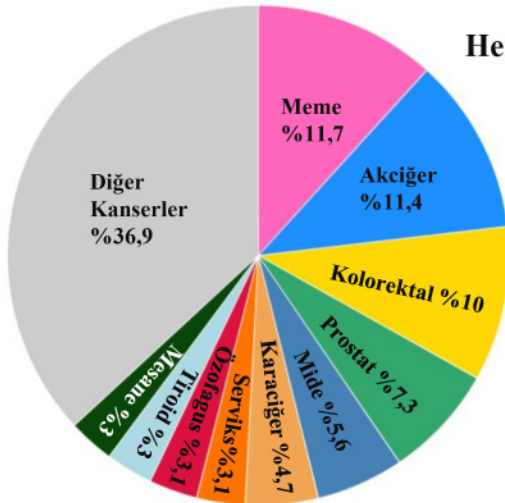
▲ **Protein Ladder**
(PageRuler™)

EK I: Salınan Lusiferaz ve SEAP Sisteminin Akış Şeması

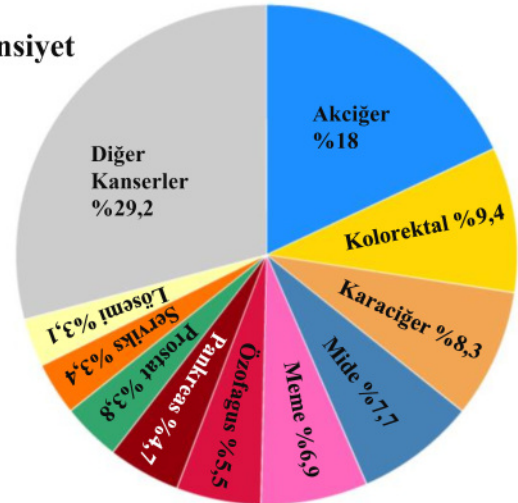


EK İ.1: Dünyada En Yaygın Görülen 10 Kanserin 2020 Yılı Tahmini Dağılımı

A) Her iki cinsiyet

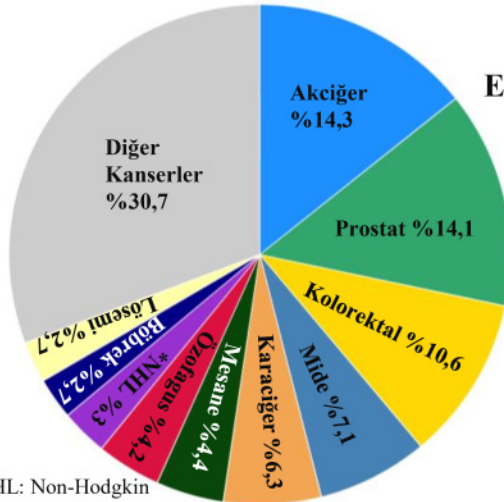


Toplam 19,3 milyon yeni vaka



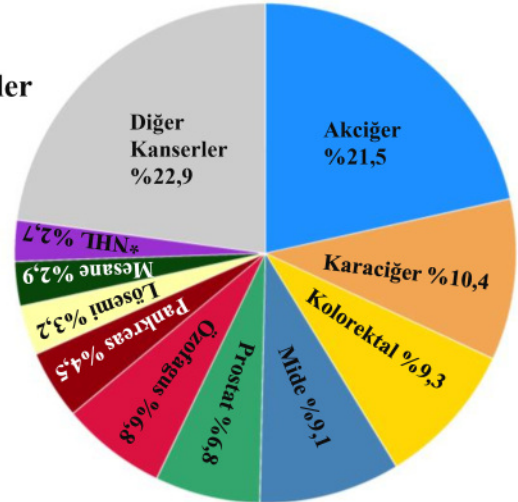
Toplam 9,6 milyon ölüm

B) Erkekler



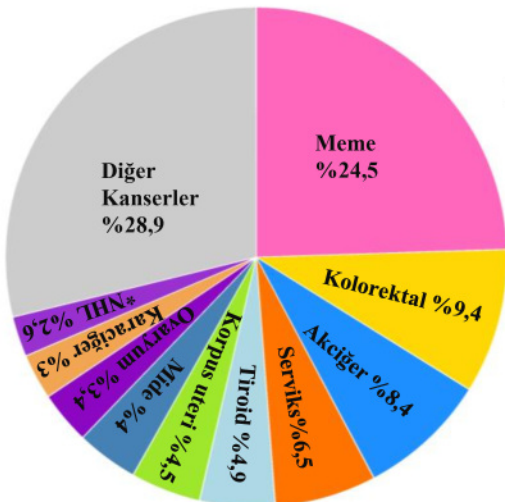
Toplam 10,1 milyon yeni vaka

(*NHL: Non-Hodgkin
Lenfoma)

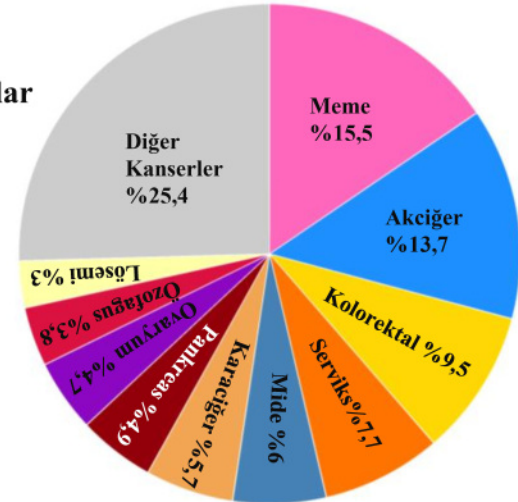


Toplam 5,5 milyon ölüm

C) Kadınlar

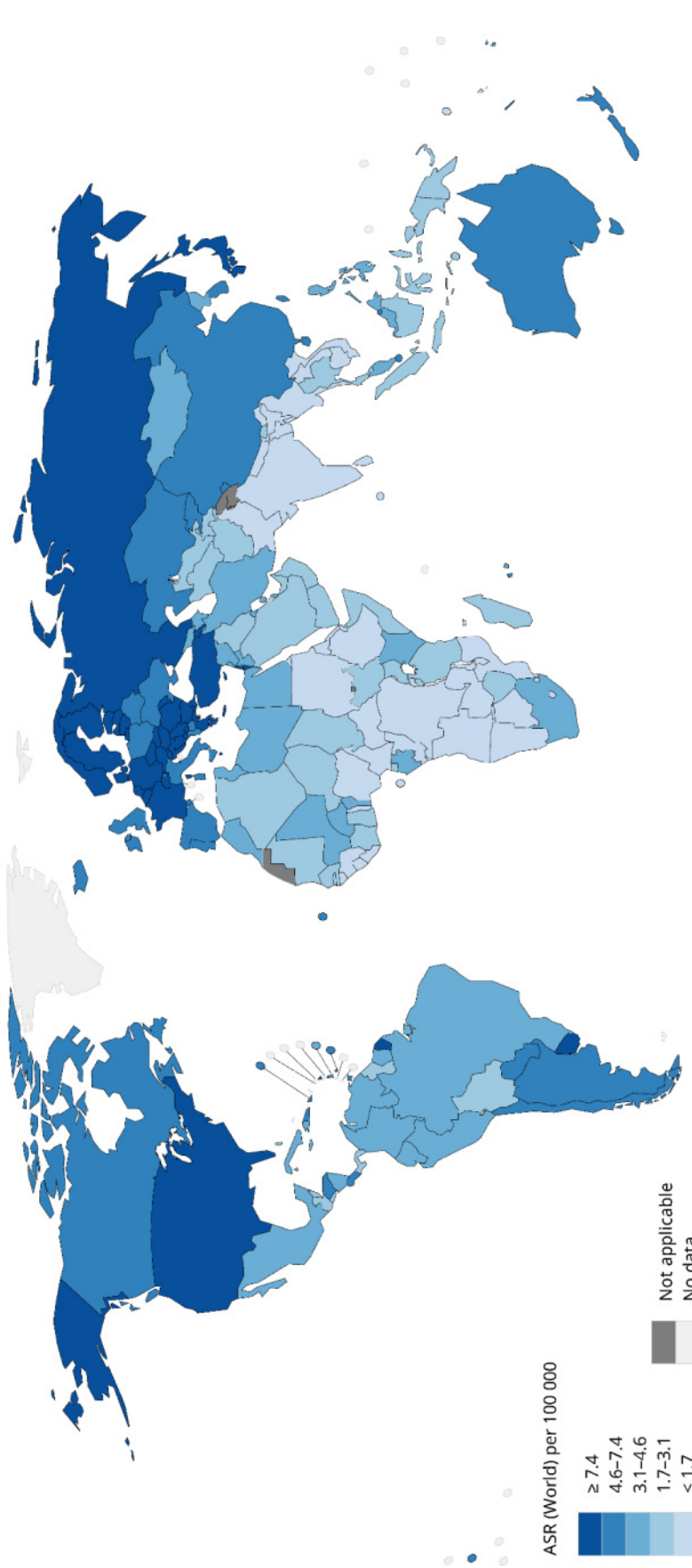


Toplam 9,2 milyon yeni vaka



Toplam 4,4 milyon ölüm

EK İ.2: Pankreas Kanserinin Yaşa Standardize İnsidans Oranları (Dünya/2020 Yılı)



World Health Organization
International Agency for Research on Cancer 2020
All rights reserved

Data source: GLOBOCAN 2020
Map production: IARC
(<http://gco.iarc.fr/today>)
World Health Organization

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Mesut ACAR

Doğum tarihi ve yeri : 15.08.1987 – Göynük / BOLU

e-posta : mesutacar87@hotmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul / Program	Yıl
Doktora	Balıkesir Üniversitesi / Biyoloji	2013-2022
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi / Biyoloji	2011-2013
Lisans	Balıkesir Üniversitesi / Biyoloji	2006-2010
Lise	Geyve Elvan Bey Anadolu Lisesi / Fen Bilimleri	2001-2004