

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



**İNSAN URG-4 (*UP-REGULATED GENE 4*) GENİNİN
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU**

DOKTORA TEZİ

ESRA TOKAY

BALIKESİR, HAZİRAN 2014

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



İNSAN URG-4 (*UP-REGULATED GENE 4*) GENİNİN
TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU

DOKTORA TEZİ

ESRA TOKAY

BALIKESİR, HAZİRAN 2014

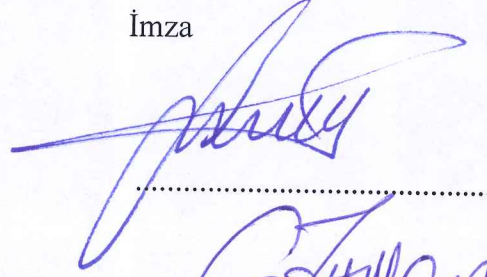
KABUL VE ONAY SAYFASI

Esra TOKAY tarafından hazırlanan “İNSAN URG-4 (UP-REGULATED GENE 4) GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 06.06.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

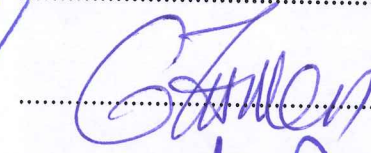
Jüri Üyeleri

İmza

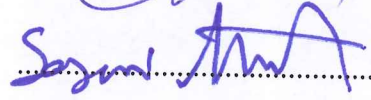
Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR



Üye
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN



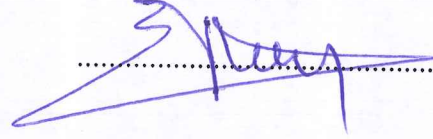
Üye
Prof. Dr. Sezai TÜRKEL



Üye
Prof. Dr. Ahmet KOÇ



Üye
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

ÖZET

**İNSAN URG-4 (UP-REGULATED GENE 4) GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONU
DOKTORA TEZİ
ESRA TOKAY
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, HAZİRAN - 2014

Up-regulated gene 4 (URG-4) geni, ilk olarak HBxAG proteinin doğal regülatörü olarak bulunmuştur. Sitokinlerle regülasyonu ve transkripsiyonel aktivitesi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

URG-4 geninin transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için, yaklaşık 530 bç'lik (-482/+63) ve minimum transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için, kısaltılarak yapılmış promotor parçalar (-109/+63, -261/+63, -344/+63) PCR'a dayalı GC zengin stratejiler uygulanarak çoğaltıldı ve pMetLuc lusiferaz haberci vektör içerisine klonlandı. 530 bç lik promotor bölgesi NCBI gen bankasına kayıt edildi. Promotor bölgesinin TATA kutusu içermediği ve % 80 GC zengin bir bölge olduğu belirlendi. Transkripsiyon faktörü (TF) bağlanma motifleri incelendiğinde özellikle SP1 gibi çok sayıda TF bağlanma bölgesi içerdiği tespit edilmiştir.

Transkripsiyonel aktivite için, URG-4 promotor parçaları, kalsiyum fosfat tekniği ile insan Karaciğer Kanser Hücre hattına (Hep3B) geçişi transfeksiyon metodu kullanılarak aktarıldı. -109/+63 promotor parçasının bazal aktivitesinin en yüksek olduğu bulundu. Ayrıca kotransfeksiyon çalışmaları, hSP1 ve hUSF transkripsiyon faktörlerinin URG-4 promotorunun transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı tespit edildi. DNA-protein etkileşim (EMSA) deneyleri, SP1 TF'nün -121/-159 bölgesine bağlandığını göstermiştir ve spesifik yarışma ve antikör süpershift deneyleri SP1'in bağlanmasını doğrulamıştır. RT-PCR deneyleri SP1 aşırı ifadesinin URG4 mRNA'sını arttırdığı da tespit edilmiştir.

URG-4 geni ve sitokinlerle ilişkisini aydınlatmak için, TGF- β ve TNF- α seçildi. Sitokinlerin etkisi hem mRNA hem de protein seviyesinde gösterildi. TGF- β sitokinin erken saatlerde URG-4 geninin ekspresyonunu mRNA ve protein seviyesinde arttırdığı ve TNF- α sitokininin ise 200Ü/mL doz uygulandığında arttırıcı etkisi olduğu görüldü. Aynı arttırıcı etki hepatoma olmayan yan model olarak seçilen prostat kanseri (PC3) hücrelerinde de tespit edildi. Yolak çalışmaları sonucunda TGF- β sitokinin MAPK/ERK yolağı üzerinden URG-4 genini etkilediği, TNF- α sitokininin ise JNK yolağıyla bağlantılı olduğu bulundu.

URG-4 *Varyant-1* cDNA'sı pCDNA3.2 vektörüne PCR'a dayalı bir teknikle klonlandı. Boş ve URG-4 genini içeren pCDNA3.2 vektörleri geçici olarak Hep3B, kalıcı olarak da Saos-2 hücrelerine transfeksiyonu yapıldı. Genin ektopik ifadesi RT-PCR, qPCR ve western metodları ile doğrulandı. Ayrıca, MTT deneyi ile, genin aşırı ifadesinin hücre proliferasyonuna arttırdığı belirlendi. Koloni formasyon deneyleri sonucunda, hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini arttırdığı tespit edildi.

ANAHTAR KELİMELER: URG-4, TGF- β , TNF- α , sitokin, promotor

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF HUMAN URG-4 (*UP REGULATED GENE 4*) GENE

PH.D THESIS

ESRA TOKAY

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, JUNE 2014

URG-4 gene was firstly found as a natural effector of HBxAG protein. There is no information about regulation by cytokines or promoter activity of URG-4 gene.

To determine transcriptional activity of URG-4 gene, 530 bp (-482/+63) promoter site of URG-4 gene and truncated deletion constructs were amplified using PCR methods with GC-rich strategies. Then cloned into pMetLuc Luciferase reporter vector. -482/+63 promoter construct of URG-4 gene was submitted to NCBI data bank. URG-4 promoter is TATAless promoter and contains 80% GC rich sequence. Transcription factor binding motifs analysis show the promoter contains many putative SP1 binding sites.

For the basal promoter activity, URG-4 promoter constructs were transiently transfected by Ca phosphate transfection methods into the Hep3B (Human Hepatoma) cells. -109/+63 URG-4 promoter construct showed the highest transcriptional activity. In addition, cotransfection analysis showed that hSP1 and hUSF upregulate URG-4 promoter constructs. DNA-protein interaction assay (EMSA) shows that SP1 transcription factor is able to bind to URG-4 promoter sites, -121/-159. Specific competition assays and antibody supershift assays confirm the binding of SP1 to the promoter. RT-PCR also indicates overexpression of SP1 upregulates URG4 mRNA expression level in Hep3B cells.

To elucidate the effect of cytokines on URG-4 gene expression, cancer-related TGF- β and inflammation-related TNF- α were chosen. The effects of cytokines on mRNA and protein levels of URG-4 gene were studied. Our results indicated that TGF- β cytokine affected URG-4 gene and 200 U/mL dose TNF- α showed upregulation of URG-4 gene expression both mRNA and protein level. The same increasing effect was determined in another cell type model, PC-3, prostate cancer cells. According to pathway inhibitory assay, it was found that TGF- β upregulates URG-4 gene through MAPK/ERK pathway and TNF- α affected by using JNK pathway.

Full length of URG-4 *Variant-1* cDNA was cloned by PCR based approach into pCDNA3.2 eucaryotic expression vector. Expression plasmid that contains URG-4 gene were transiently transfected to Hep3B and stably transfected into Saos-2 cells. URG-4 expression level was confirmed by using RT-PCR, qPCR and western method. In addition, MTT and colony forming assays, it was determined that the ectopic expression of URG-4 gene induces proliferative effects of cells.

KEYWORDS: URG-4, TNF- α , TGF- β , cytokine, promoter

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
ÖNSÖZ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genetik ve Kanser.....	1
1.2 Hücre Döngüsünün Kontrolü.....	4
1.3 URG-4 Geni.....	5
1.4 Sitokinler.....	7
1.4.1 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- β) Sitokini ve Kanser ile İlişkisi.....	7
1.4.1.1 TGF- β ve Reseptörleri.....	7
1.4.1.2 TGF- β 'nın Görevleri ve Sinyal İletim Mekanizması.....	9
1.4.1.3 TGF- β ve Kanser.....	11
1.4.1.4 TGF- β ve Karaciğer Kanseri.....	12
1.4.2 TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü) Sitokini.....	12
1.4.2.1 TNF- α Sitokini ve Reseptörleri.....	12
1.4.2.2 TNF- α Sitokini Görevleri ve Sinyal İletim Mekanizması.....	13
1.5 Çalışmanın Amacı.....	15
2. MATERYAL-METOD.....	19
2.1 Kullanılan Makine Teçhizat.....	19
2.2 Materyal.....	20
2.3 Klonlama ile ilgili teknikler.....	27
2.3.1 Hep3B Hücrelerinden Genomik DNA izolasyonu.....	27
2.3.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	28
2.3.3 Agaroz Jel Elektroferezinde DNA'nın görüntülenmesi.....	28
2.3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
2.3.5 Jelden DNA'yı geri saflaştırma.....	30
2.3.6 Ligasyon.....	31
2.3.7 Kanamisinli veya Ampisilinli Luria Broth ve Agar Petrilerinin Hazırlanması.....	31
2.3.8 <i>DH5α</i> Hücrelerinin Kompetant(Alıcı) Hale Getirilmesi.....	32
2.3.9 Transformasyon.....	32
2.3.10 Gliserol Stok Hazırlanması.....	33
2.3.11 Restriksiyon Endonükleaz kesimi.....	33
2.3.12 Küçük ölçekli plazmit izolasyonu.....	33
2.3.13 Büyük ölçekli plazmit izolasyonu.....	34
2.3.14 Fenol kloroform ve Etanol presipitasyonu.....	34
2.4 Hücre Kültürü ile ilgili Teknikler.....	34
2.4.1 Hücre kültürü Besiyerinin Hazırlanması.....	35
2.4.2 FCS veya FBS (Fetal Sığır Serumu)'nin hazırlanması.....	35

2.4.3	-80 °C Derin Dondurucuda Stoklanan Hücrelerin Açılması	35
2.4.4	Hücrelerin Pasajlanması	36
2.4.5	Hücre Sayımının Yapılması.....	36
2.4.6	Belirli Sitokinlerin Ekspresyon Deneylerinde Kullanılmak Üzere Hep3B ve PC3 Hücreleri Üzerine Uygulanması	37
2.4.7	Transfeksiyon Çalışmaları	38
2.4.7.1	Kalsiyum-fosfat Geçici Transfeksiyon Deneyleri.....	38
2.4.7.2	Lusiferaz ve Seap Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
2.4.7.3	Kalıcı transfeksiyon Çalışmaları	39
2.4.8	Sitotoksosite Deneyleri (MTT).....	40
2.4.9	Koloni Formasyon Deneyi.....	41
2.4.10	İnhibisyon Deneyleri.....	42
2.5	RNA ile ilgili Teknikler	43
2.5.1	RNA İzolasyonu	43
2.5.2	RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	43
2.5.3	RNA Jel elektroforezi	44
2.5.4	Revers Transkriptaz (RT)-Reaksiyonu	44
2.5.5	Semi quantitative (Sq) RT-PCR	45
2.5.6	qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR).....	46
2.6	Protein ile ilgili Teknikler	47
2.6.1	Western Blotting Metodu ile protein tayini	47
2.6.1.1	Hücre proteinlerinin Laemli protokolü ile Ekstraksiyonu.....	47
2.6.1.2	Proteinlerin NE-PER kiti kullanılarak Ekstraksiyonu	48
2.6.1.3	Protein Miktarının Belirlenmesi.....	48
2.6.1.4	SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı ve Örneklerin Yürütülmesi.....	49
2.6.1.5	PVDF Membrana Transfer ve Antikorlarla Muamele İşlemi.....	49
2.6.1.6	Membranların Oto Radyografi ile Görüntülenmesi	50
2.6.2	İmmunflorasan Metodu ile URG-4 Geninin Hücre İçerisindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi.....	50
2.7	DNA-Protein Etkileşim Tekniği (EMSA)	51
2.7.1	Nükleer Ekstrakt Hazırlanması	51
2.7.2	EMSA Reaksiyonu	52
2.7.2.1	Oligoların Etiketlenmesi	52
2.7.2.2	Oligoların Bağlanması	53
2.7.2.3	Poliakrilamid Jel Hazırlanması	53
2.7.2.4	Bağlanma Reaksiyonlarının Kurulması	53
2.7.2.5	Jelin Membrana Transferi ve Kroslink Aşaması.....	54
2.7.2.6	Membranın Develop Edilmesi	55
2.8	İstatistiksel Değerlendirmeler ve Verilerin Yorumlanması	55
2.9	Biyoinformatik Analiz	55
2.10	Dizi Analizi ile Doğrulama.....	56
3.	BULGULAR	57
3.1	İnsan URG-4 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonunun Belirlenmesi	57
3.1.1	Genomik DNA İzolasyonu	58

3.1.2 Promotor Bölgesinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı.....	59
3.1.3 Guanin Sitozince Yüksek Olan URG-4 Promotorunun PCR Tekniği ile Çoğaltılması.....	61
3.1.4 PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektör Sistemi'ne Klonlanması.....	73
3.1.5 Dizi Analizi ile klonlanan 5' delesyonlu promotor parçalarının doğruluğunun tespiti.....	75
3.1.6 İnsan URG-4 Promotorunun <i>In Siliko</i> Analizi.....	78
3.1.7 İnsan URG-4 Promotor Parçalarının pMet-Luc Haberci Vektörüne Alt Klonlama çalışmaları.....	83
3.1.7.1 Kotransfeksiyon Analizleri.....	88
3.1.7.1 Geçici aşırı ifade edilen (over ekspre) hUSF, hSP1 ve xC/EBP transkripsiyon faktörlerinin URG-4 mRNA düzeyine etkilerinin sqRT-PCR stratejisi ile belirlenmesi.....	89
3.1.8 DNA-protein Etkileşim çalışmaları (EMSA).....	94
3.1.8.1 EMSA Primerlerinin Tasarlanması.....	94
3.1.8.2 İnsan URG-4 Promotor Bölgesine Bağlanan Transkripsiyon Faktörlerinin EMSA Tekniği ile Belirlenmesi.....	95
3.2 İnsan URG-4 Geninin Sitokinlerle Regülasyonu.....	97
3.2.1 TGF- β Sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	100
3.2.2 Hep3B ve PC3 hücre modelinde TGF- β sitokininin etkilerinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.....	101
3.2.3 Western blotting Tekniği Optimizasyon Çalışmaları.....	103
3.2.4 TGF- β Sitokininin, Hep3B ve PC3 Hücre Modellerinde URG-4 Protein Seviyesine etkisinin Western Blot Metodu Kullanılarak Gösterilmesi.....	108
3.2.5 TGF- β sitokininin URG-4 Geni Üzerine etkisinin İmmunflorasan Tekniği Uygulanarak Gösterilmesi.....	110
3.2.6 TGF- β sitokini ve İnsan URG-4 promotor parçalarına ait bazal aktiviteleri.....	112
3.2.7 TGF- β Sitokini ile Yolak Çalışmaları.....	113
3.2.8 TNF- α sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) hücre hattı modelinin üzerine etkisinin incelenmesi.....	116
3.2.9 TNF- α sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) ve PC3 hücre hattı modelleri kullanarak URG-4 üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.....	117
3.2.10 TNF- α Sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) Hücrelerinde URG-4 Üzerine Etkisinin Protein Seviyesinde Gösterilmesi.....	120
3.2.11 TNF- α sitokini ve İnsan URG-4 promotor parçalarına ait bazal aktiviteleri.....	121
3.2.12 TNF- α sitokini ve İnhibisyon Deneyleleri.....	121
3.3 URG-4 cDNA'sının Ektopik ekspresyonu.....	124
3.3.1 URG-4 geninin çeşitli hücre hatlarındaki ekspresyonunun incelenmesi.....	127

3.3.2 URG-4 proteininin Hücre lokalizasyonunun ve protein ifadesinin Hep3B ve PC3 hücrelerinde İmunoflorasan tekniği ile gösterilmesi.....	130
3.3.3 URG-4 geni mRNA özellikleri.....	133
3.3.4 Proteine ait Biyoinformatik Özellikler	135
3.3.5 URG-4 geni <i>Varyant-1</i> cDNA'sının PCR tekniği ile çoğaltılması.....	137
3.3.6 Dizi Analizi ile URG-4 cDNA'nın Doğrulanması.....	139
3.3.7 Geçici Transfeksiyon metoduyla URG-4 cDNA'sının Hep3B hücrelerine verilmesi ve karakterizasyon çalışmaları.....	140
3.3.8 Koloni formasyon deneyi.....	143
3.3.1 NE-PER kiti ile hazırlanan çekirdek ve sitoplazmik ekstraktlarda URG-4 geni ekspresyonu.....	144
3.3.2 URG-4 cDNA'sının Kalıcı Transfeksiyon metoduyla Saos-2 hücrelerine verilmesi, MTT ve RT analiz.....	145
3.3.2.1 URG-4 cDNA'sını kalıcı olarak transfekte ettiğimiz Saos-2 hücreleri üzerine TGF- β ve TNF- α sitokinlerinin uygulanması.....	146
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	148
5. KAYNAKLAR.....	159
6. EKLER.....	168

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Hücre döngüsü kontrol noktalarının şema üzerinde gösterilmesi [15].	5
Şekil 1.2: TGF- β sinyal iletim sistemi [35]	10
Şekil 1.3: TNF- α sitokinin sinyal iletim mekanizması [47].	15
Şekil 1.4: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı	18
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi	22
Şekil 2.2: pcDNA3.2 Topo Gateway vektörün şematik gösterimi	22
Şekil 2.3: pMetLuc Reporter vektörünün şematik gösterimi	23
Şekil 2.4: pMetLuc Kontrol vektörünün şematik gösterimi	23
Şekil 2.5: pSEAP2-kontrol vector sisteminin şematik gösterimi	24
Şekil 2.6: Toma Lamı	37
Şekil 2.7: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim	41
Şekil 3.1: İnsan URG-4 geninin transkripsiyonel regülasyonu basamaklarını içeren akış diyagramı	58
Şekil 3.2: M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3: İzole edilen Genomik DNA'nın %0.8'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	59
Şekil 3.3: URG-4 promotor bölgesinin oluşturduğu en yüksek ve en düşük ΔG değerlerine sahip olan sekonder yapılar	61
Şekil 3.4: -1500/+63 primer seti, farklı $MgCl_2$ ve DNA konsantrasyonu kullanılarak yapılan genomik PCR sonucu (T_m : 60°C)	62
Şekil 3.5: -1500/+63 primer seti, farklı $MgCl_2$ ve DNA konsantrasyonu kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m : 55°C)	62
Şekil 3.6: M: SM0311, 1-2: Kesilmiş gDNA'nın %0.8'lik jel elektroforezi sisteminde görüntülenmesi	63
Şekil 3.7: Restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş genomik DNA, -1500/+63 primer seti, -1400/+63 primer seti ve farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m : 65°C)	64
Şekil 3.8: Restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş genomik DNA, -1500/+63 primer seti, -1400/+63 primer seti ve farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m : 60°C)	64
Şekil 3.9: Genome Walker kiti TM uygulama basamakları	66
Şekil 3.10: Genome Walker Kit TM I. Basamak PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü	67
Şekil 3.11: Genome Walker TM II. Basamak PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü	68
Şekil 3.12: % 6'luk Etilen glikol ve: -1500/+63 primer seti ve -482/+63 primer seti kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m : 60 °C)	69

Şekil 3.13: % 2 DMSO, % 5 DMSO, % 10 DMSO % 2.5 formamid, 1500/+63 primer seti ve -482/+63 primer seti kullanılarak yapılan genomik PCR (Tm: 60°C).....	70
Şekil 3.14: -482/+63 primer seti ve 7-deaza-GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C)	71
Şekil 3.15: -344/+63 primer seti, 7-deaza GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C) ..	71
Şekil 3.16: -261/+63 primer seti, 7-deaza GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C) ..	72
Şekil 3.17: -109/+63 primer seti, 7-deaza-GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C)	72
Şekil 3.18: -482/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pGEMTeasy vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	73
Şekil 3.19: -344/+63 URG-4 promotor parçasını içeren pGEMTeasy vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	74
Şekil 3.20: -261/+63 ve -109/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	74
Şekil 3.21: -482/+63 URG-4 promotor parçasının dizi analiz sonucu doğrulaması	76
Şekil 3.22: -344/+63 URG-4 promotor parçasının dizi analiz sonucu doğrulaması	77
Şekil 3.23: -261/+63 URG-4 promotor parçasının dizi analiz sonucu doğrulaması	77
Şekil 3.24: -109/+63 URG-4 promotor parçasının dizi analiz sonucu doğrulaması	78
Şekil 3.25: URG-4 promotor bölgesine bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörleri, başlama kodonu (ATG) ve TSS'nin şematik gösterimi.....	81
Şekil 3.27: İnsan, fare ve rat URG-4 promotor dizilerinin bioedit analiz programında karşılaştırılması	82
Şekil 3.26: İnsan URG-4 promotor bölgesinin %guanin sitozin içeriğinin gösterilmesi	82
Şekil 3.28: pMetLuc Haberci Vektörü İçerisine Klonlanarak Oluşturulan 5'delesyonlu İnsan URG-4 Promotor Parçalarının Şematik Gösterimi.....	83
Şekil 3.29: -109/+63 URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	84
Şekil 3.30: -482/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	85
Şekil 3.31: -344/+63 promotor parçasını içeren pMet-Luc vektörünün Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	85
Şekil 3.32: -261/+63 İnsan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu.....	86
Şekil 3.33: Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörlerinin Lusiferaz aktivitelerini gösteren grafik.....	87

Şekil 3.34: -482/+63 promotor parçasının farklı konsantrasyonda transfekte edildikten sonra elde edilen lusiferaz aktiviteleri	87
Şekil 3.35: URG-4 geni promotor parçalarının bazal aktivitelerinin gösterilmesi	88
Şekil 3.36: hSp1 transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor parçalarıyla birlikte transfekte edilmesi ve promotor parçalarının aktivitelerinin belirlenmesi.....	90
Şekil 3.37: hUSF transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor parçalarıyla birlikte transfekte edilmesi ve promotor parçalarının aktivitelerinin belirlenmesi.....	91
Şekil 3.38: xC/EBP α transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor parçalarıyla birlikte transfekte edilmesi ve promotor parçalarının aktivitelerinin belirlenmesi.....	92
Şekil 3.39: A: hSP1, hUSF ve xC/EBP α uygulanmış Hep3B cDNA'ları kullanılarak URG-4 ve β -aktin primerleri ile yapılan RT-PCR analiz sonucu	93
Şekil 3.40: EMSA'da İncelenen Bölge ve Buraya Bağlanan Transkripsiyon Faktörlerinin URG-4 Promotoru Üzerinde Gösterilmesi	95
Şekil 3.41: Saos-2 Nüklear ekstraktı kullanılarak yapılan EMSA sonucu	96
Şekil 3.42: Hep3B nüklear ekstrakt kullanılarak yapılan süper shift assay ve Sp1 antikoru ile promotor bölgesi arasında oluşan bağlanmaların gösterilmesi	97
Şekil 3.43: İnsan URG-4 geninin sitokinlerle regülasyonunu incelemek amacıyla izlenen basamakları gösteren akış diyagramı	99
Şekil 3.44: Çeşitli dozlarda TGF- β sitokininin Hep3B hücreleri üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi	100
Şekil 3.45: Hep3B hücre modelinde TGF- β sitokininin URG-4 geni üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.....	102
Şekil 3.46: PC3 hücre modelinde 100Ü/mL TGF- β sitokininin 24, 48 ve 72 saat zaman dilimlerinde URG-4 geni üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.	102
Şekil 3.47: PM: prestained marker 26619, 1: 1000 hücre, 2: 2000 hücre, 3: 3000 hücre, 4: 4000 hücre, 5: 5000 hücre, 6:5000 hücre	103
Şekil 3.48: PM: Fermentas 26619, 1: 10 μ g Hep3B hücre lizatı, 2: 20 μ g Hep3B hücre lizatı.....	103
Şekil 3.49: PM: Fermentas 26619, 1: 20 μ g Saos-2 hücre lizatı, 2: 30 μ g HT29 hücre lizatı.....	104
Şekil 3.50: Laemli tamponu gradient uygulamaları	104
Şekil 3.51: Transfer olan ve olmayan jellerin görüntülenmesi.....	106
Şekil 3.52: PM Prestained Marker 26619, 1; 50 μ g Hep3B hücre lizatı, 2; 50 μ g Hep3B hücre lizatı	108
Şekil 3.53: TGF- β sitokinin 3, 6, 24 ve 48 saat sonunda URG-4 geni üzerine etkisinin Hep3B hücre modelinde western metodu kullanılarak gösterilmesi	109
Şekil 3.54: TGF- β sitokinin URG-4 geni üzerine etkisinin PC3 hücre modelinde western metodu kullanılarak gösterilmesi.....	110
Şekil 3.55: TGF- β sitokinin URG-4 geni üzerine etkisi.....	111
Şekil 3.56: URG-4 promotor parçaları transfekte edilen Hep3B hücreleri üzerine etkisi	112

Şekil 3.57: Uygulanan inhibitörlerin URG-4 geni üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.....	114
Şekil 3.58: TGF- β sitokini ve inhibitörlerin URG-4 geni üzerine etkisinin protein seviyesinde western metodu ile gösterilmesi.....	115
Şekil 3.59: TGF- β sitokini ve çeşitli inhibitörlerin uygulanmış olduğu membranda Smad 2-3 transkripsiyon faktörünün protein seviyesinde ifadesinin gösterilmesi.....	116
Şekil 3.60: Çeşitli dozlarda TNF- α sitokininin Hep3B hücreleri üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi	117
Şekil 3.61: RNA jel elektroforezi sonuçları	118
Şekil 3.62: TNF- α sitokinin URG-4 geni üzerine etkisinin Real-time metodu kullanılarak mRNA seviyesinde gösterilmesi.....	119
Şekil 3.63: TNF- α sitokininin 24 saatlik zaman diliminde PC3 hücre hattı üzerine etkisinin mRNA seviyesinde Real-Time metodu kullanılarak gösterilmesi	119
Şekil 3.64: 10 Ü/mL ve 200 Ü/mL TNF- α sitokini dozunun 1,3, 6, 24, 48 ve 72. zaman sonunda URG-4 geni üzerine etkisinin protein seviyesinde gösterilmesi.....	120
Şekil 3.65: İnsan URG-4 promotor parçaları transfekte edilen Hep3B hücreleri üzerine uygulanan 200 Ü/mL dozda TNF- α sitokininin etkisinin lusiferaz aktivitesi sonuçları.....	121
Şekil 3.66: TNF- α sitokini ve çeşitli inhibitörler uygulanmış cDNA'lar kullanılarak yapılan qRT-PCR verilerinin grafik üzerinde değerlendirilmesi.....	122
Şekil 3.67: TNF- α sitokini ve çeşitli inhibitörlerin URG-4 ekspresyonu üzerine etkisinin western seviyesinde gösterilmesi.....	123
Şekil 3.68: URG-4 cDNA'sının ektopik ekspresyonu çalışma basamaklarını gösteren akış diyagramı	126
Şekil 3.69: Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının fotoğrafları.....	128
Şekil 3.70: URG-4 geninin bütün hücre hatlarında RT-PCR metodu ile ekspresyonunun incelenmesi.....	129
Şekil 3.71: Çeşitli hücre hatlarında URG-4 geninin ekspresyonunun protein seviyesinde gösterilmesi	130
Şekil 3.72: URG-4 ekspresyonunun PC3 hücre hattında IFC metodu uygulanarak gösterilmesi (Alexaflour 488 Antirabbit boyama) ..	131
Şekil 3.73: URG-4 geni ifadesinin PC3 hücre hattında alexa flour 488 florasan sekonder antikorla işaretlenerek gösterilmesi	131
Şekil 3.74: PC3 hücrelerinde çekirdek boyaması (DAPI).....	132
Şekil 3.75: PC3 hücrelerinde Çekirdek boyaması ve URG-4 boyaması olan fotoğrafların üst üste karşılaştırılması.....	132
Şekil 3.76: URG-4 Varyantlarına ait cDNA dizilerinin karşılaştırılması ve primerlerin yerinin gösterilmesi	133
Şekil 3.77: URG-4 Varyantlarına ait protein dizilerinin karşılaştırılması.....	134
Şekil 3.78: URG-4 <i>Varyant-2</i> ve <i>Varyant-4</i> 'ün çeşitli kanser hücre hatlarında ekspresyonun gösterilmesi	135
Şekil 3.79: URG-4 proteini için önerilen proteinlerin 3 boyutlu yapıları.....	136
Şekil 3.80: URG-4 <i>Varyant-1</i> 'in intron ve ekzon bölgelerinin şematik gösterimi.....	137
Şekil 3.81: URG-4 cDNA'sının agaroz jel fotoğrafı	138

Şekil 3.82: URG-4 cDNA'sının içeren pCDNA3.2 ekspresyon vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu	139
Şekil 3.83: Dizileme için hazırlanan primerlerin şema üzerinde gösterilmesi	140
Şekil 3.84: Ektopik ekspre edilmiş URG-4 genine ait MTT, RT-PCR, Real-Time ve Western bulguları	142
Şekil 3.85: URG-4 transfekte edilen hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerinin belirlenmesi	143
Şekil 3.86: Koloni formasyon deneyinin IMAGE J ile analiz sonucu	144
Şekil 3.87: Çekirdek ve sitoplazmik ekstraktlarda URG-4 ekspresyonunun gösterilmesi (N.E: Nükleer Ekstrakt, S.E: Sitoplazmik Ekstrakt)	145
Şekil 3.88: qRT-PCR metadıyla URG-4 cDNA'sı transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi	146
Şekil 3.89: URG-pCDNA3 transfekte edilmiş hücreleri kullanılarak yapılan proliferasyon deneylerine ait grafikler. A: Hücre sayımı, B: MTT datası.....	146
Şekil 3.90: TGF- β sitokini uygulanmış cDNA'larda URG-4 geni mRNA seviyesinde ekspresyon analizi.....	147
Şekil 3.91: TNF- α sitokini uygulanmış cDNA'larda URG-4 geni mRNA seviyesinde ekspresyon analizi.....	147
Şekil 4.1: URG-4 geni ifadesinin TGF- β sitokini üzerinden olası düzenlenmesi	153
Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci (1 kb) SM0311 Fermentas	168
Şekil 6.2: DNA büyüklük belirteci (100bp).....	169
Şekil 6.3: Protein büyüklük göstergesi (PAGE ruler prestained Fermentas /26616).....	170
Şekil 6.4: Protein büyüklük göstergesi (PAGE ruler prestained Fermentas /26619).....	171

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Kullanılan araç-gereçler ve Markaları	19
Tablo 2.2: Klonlama aşamasında Kullanılan Kitler ve Kimyasallar	20
Tablo 2.3: Klonlama aşamasında kullanılan Vektörler ve Temin edildikleri firmaların adları	21
Tablo 2.4: Transformasyon aşamasında kullanılan Bakteri Soyları	24
Tablo 2.5: Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitler ve kimyasallar	25
Tablo 2.6: Kullanılan hücre hatları ve Temin edilen kaynakları	25
Tablo 2.7: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmaların adları	26
Tablo 2.8: Protein çalışmalarında kullanılan Kimyasallar ve Temin Edildikleri Firmaların Adları	26
Tablo 2.9: Kullanılan Antikorların İsimleri ve Temin Edildikleri Firmaların Adları	27
Tablo 2.10: Hep3B hücrelerinden DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve kimyasallar	27
Tablo 2.11: Agaroz jel elektroforezi sırasında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar	28
Tablo 2.12: PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)'da kullanılan dNTP karışımının hazırlanışı	29
Tablo 2.13: Promotor PCR döngü koşulları	30
Tablo 2.14: Hücre Kültürü çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	34
Tablo 2.15: Kullanılan Sitokinlerin Adları ve Katalog Numaraları	37
Tablo 2.16: Transfeksiyon aşamasında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar	38
Tablo 2.17: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	40
Tablo 2.18: Kullanılan inhibitörlerin Adları, Hazırlanışı ve Temin edilen firmaların adları	42
Tablo 2.19: RNA jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	44
Tablo 2.20: Normalizatör Amaçlı Kullanılan Primerlere Ait Bilgiler	46
Tablo 2.21: Protein Çalışmalarında Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler	47
Tablo 2.22: SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı	49
Tablo 2.23: Nükleer ekstrakt hazırlanırken kullanılan çözeltiler	51
Tablo 2.24: EMSA çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar	52
Tablo 2.25: Bağlanma Reaksiyonlarında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	54
Tablo 2.26: Dizileme aşamasında kullanılan primerler ve primerlere ait diziler	56
Tablo 3.1: Kullanılan Promotor Primerleri	60
Tablo 3.2: Genome walker™ 1. Aşama PCR'da kullanılan PCR bileşenleri	66
Tablo 3.3: I. Basamak PCR döngü koşulları	67
Tablo 3.4: İkinci aşama PCR'da kullanılan program	68
Tablo 3.5: URG-4 promotor bölgesine muhtemel olarak bağlanan transkripsiyon faktörleri	79
Tablo 3.6: EMSA deneylerinde kullanılan primerler ve dizileri	94

Tablo 3.7: Kullanılan Hücre, Laemli Miktarları ve Proteinlerin Konsantrasyonları.....	105
Tablo 3.8: Temin edilen Sigma Antikoru ile Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	107
Tablo 3.9: Varyant 1 cDNA'sının Klonlanması Aşamasında Kullanılan cDNA Primerleri	138
Tablo 3.10: Dizileme için oluşturulan primerlerin listesi	140
Tablo 6.1: URG-4Promotor Bölgesi Restriksiyon Haritası	172
Tablo 6.2: Trankripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgeleri	175
Tablo 6.3: URG-4 Varyant 1 mRNA'sı restriksiyon haritası.....	183

SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

URG-4	Up Regulated Gene 4
AP1	Adaptör primeri 1
GSP1	Gen spesifik primeri 1
GSP2	Gen spesifik primeri 2
dNTP	deoksiribonükleotidtrifosfat
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
EMSA	Electromobility Shift Assay
DEPC	Dietilpirokarbonat
mRNA	mesajcı ribonükleik asit
UV	Ultraviyole
Rpm	Rotary per minute
SP1	Stimule edici faktör 1
O.D.	Optik densite
Nm	nanomol
µg	mikrogram
ng	nanogram
Ct	cycle treshold
TGF-β	Transforme edici büyüme Faktörü
TNF-α	Tumor Necrosis Factor: Tümör nekroz Faktörü

ÖNSÖZ

Doktora eğitim hayali benim için lise yıllarında başlamıştı. O zaman ki hayallerimi gerçekleştirebilmem için bana bu fırsatı sunan, her zaman bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, olumsuz düşündüğüm zamanlarda pozitif yönde beni tekrar yoluma döndüren biricik hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez izleme toplantılarında eksikliklerimi anlayışla karşılayıp, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan saygı değer hocalarım Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a ve Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda sadece deneysel çıkmazlarımızı değil de bütün bir hayatı paylaştığımız, birlikte neşelenip, birlikte ağladığımız başta Hoca'larım olmak üzere Dr. Ayla Solmaz AVCIKURT'a, Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a, Yrd. Doç. Dr. Sümeyye A. TÜRKOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Elif SAVAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Bahar SUNAY'a daha sonra arkadaşlarım Merve KARAMAN'a, Sevgi BAYSAL'a, Fatma POYRAZLI'ya, Gizem GÜLER'e, Mihrap KAYA'ya, Sinem GÜLTEKİN'e, Ceylan TOPRAK'a, ve Gamze GÜNGÖR'e çok teşekkür ederim.

Hayatsal çıkmazlarımı, dertlerimi, hüznümü ve sevincimi paylaştığım ablam yerine koyduğum canım hocam Meltem ALPER'e ve Kardeşlerim Tuğşen AYDEMİR, Ece CEYLAN ve Derya OKUYAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Okul hayatımda yanımda olan ve beni destekleyen canım ailem; başta babam Nazif SOLMAZ'a, ağabeylerim Nedim SOLMAZ ve Metin SOLMAZ'a, biricik ablam Arzu PAK'a ve ikizim Aslı SOLMAZ'a yürekten teşekkür ederim. Kardeş kuzenlerim Efsun DEDEOĞLU ve Gizem DURUT'a çok teşekkür ederim.

Doktora dönemim boyunca beni destekleyen ikinci ailem olan babam Mustafa TOKAY ve Annem Nuray TOKAY'a yürekten teşekkür ederim.

Bütün hayatımda hep yanımda olan, hep iyi yönde eleştiren ve beni güzel şeyler yapabileceğim konusunda yüreklendiren canım Kocam Feyzullah TOKAY'a yürekten teşekkür ederim.

Benim her şeyim, hayallerim, bugünüm ve geleceğim olan canım annem Nevin SOLMAZ'ı rahmetle anıyorum.

Bu tez çalışması biricik oğlum Kerem TOKAY'a ithaf edilmiştir.

1. GİRİŞ

1.1 Genetik ve Kanser

Kanser, hücre seviyesinde genetik bir bozukluk, mutasyonlarla gen ifadesinin değişiminden dolayı hücrelerin kontrolsüz bölünmesi olarak ifade edilebilir. Kontrolsüz olarak bölünen bu hücreler farklı şekil ve anormal büyüklükleriyle kendi özgürlüklerini ilan ederek komşu hücreleri öldürmeye ve hızlıca yayılmaya başlarlar. Böylece vücudun savunma sistemini ele geçirirler ve kişiyi diğer hastalıklara karşı güçsüz hale getirirler [1].

Kanser hücreleri normal hücrelerden morfolojik olarak oldukça farklıdır. Çok fazla mitoz geçirmelerinden dolayı büyük ve hiperkromatik nükleusları bulunmaktadır. Normal düzenli sıralanıştan yoksundurlar ve dediferansiasyon (anaplazi) eğilimleri vardır [2]. Kanser hücrelerinde, kaynaklandıkları normal hücrelerin biyokimyasından, embriyonal hücrelerin biyokimyasına doğru dönüş olur. Dokulara farklılaşma sırasında o dokuya gerekli genler ekspre olurken, diğer bazı genler represyona uğrarlar. Ancak kanserli hücrelerde bu genlerin yeniden ekspre olduğu gözlenmiştir. Metastaz özelliği ile kanser hücreleri bir dokudan başka bir dokuya lenf veya kan yoluyla yayılabilirler. Metastaz tümörleri primer tümörlerden daha çok ölümlere sebebiyet verirler. Kanser tipine göre metastaz yapacakları organ değişir. Örneğin göğüs ve prostat kanserleri genellikle kemiğe metastaz yaparlar [2].

Her yıl milyonlarca insanı vaktinden önce öldüren kanser, kalp hastalıklarının ardından gelen ikinci büyük hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) her yıl yarım milyon insanın kanserden öldüğünü bildirmektedir. Erkeklerde kanserden ölümlerin başında akciğer kanseri, kadınlarda kanserden ölümlerin başında meme kanseri gelmektedir. Her iki cins için de ikinci sırada kalın bağırsak kanseri vardır. Bundan sonra sırasıyla tehlikeli organlar erkekte prostat, mide; kadında uterus, akciğer ve overdir [2].

Kanser hastalığı oluştuğu yere göre tiplendirilir ve her tipinin kendine özgü semptomları, sinyalleri, hastalık seyri ve tedavi yöntemleri bulunmaktadır [1].

Kanser, DNA seviyesinde tek nükleotid değişimi gibi küçük ölçekli veya kromozom kazanımı ya da kaybı, viral genomun hücre genomuna entegre olması, kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi büyük ölçekli genomik değişikliklerden; RNA seviyesinde transkripsiyonal regülasyonun bozulması, mRNA'nın işlenmesi hasarı sonucu mRNA yarı ömrünün değişmesi; protein seviyesinde ise DNA ve mRNA'da meydana gelen değişimler sonucu protein yapısının bozulması ya da proteinlerin inaktivasyonu gibi etkenlerden doğar. Ailesel kanser formlarında mutant allelin bireyde homozigot halde bulunmasıyla yani kalıtsal yol ile kansere yatkın olma durumu bulunurken; sporadik formda ise kişiide bireysel olarak ortaya çıkması söz konusudur. Mutasyonlar kanser riskini arttırdığı gibi; iyonize radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi çevresel ajanlar mutasyon oranını arttıırırlar [3].

Hücre döngüsünün düzenlenmesi kanser genetiği ile yakından ilişkilidir. Hücre döngüsünün kontrolü, protein kinaz ve siklinler, tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenler ile sağlanmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesine neden olurlar. Protein kinaz ve siklinler birbiriyle etkileşerek CDK (Siklin Bağımlı Kinaz) molekülünü oluşturur ve hücre döngüsünü belli noktalarda düzenlerler. Tümör supresör genler ise hücre bölünmesini baskırlar yani gerektiğinde hücre bölünmesini durdururlar. Tümör supressör genlerden biri olan p53 geni neredeyse insan kanser tiplerinin %50'sinde mutant formdadır [4]. Bununla beraber RB1 (Retinoblastoma) tümör supresör geninin sentezlediği pRb proteini hücre döngüsünün bütün evrelerinde görev almaktadır. Örneğin osteosarkoma hücrelerinin RB mutasyonundan dolayı pRb üretemediği ve bu sayede farelerde tümör oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir [5].

Protoonkogenler mutasyonlar ile onkogenlere dönüşerek kontrolsüz hücre bölünmesini uyarırlar. Normal hücrelerde protoonkogenler hücre döngüsü regülasyonunu büyüme faktörü, büyüme faktörleri reseptörleri, DNA sentezini düzenleyiciler ve transkripsiyon düzenleyici proteinler olarak sağlarlar [6]. Protoonkogenler mutasyona uğrayarak sürekli çalışır hale gelirlerse hücre durmadan bölünmeye uyarılır.

Onkogenler, nokta mutasyonları, translokasyonlar ve aşırı gen ifadesi gibi mekanizmalar sebebiyle değişerek protoonkogenlerden köken alırlar. Hücre proliferasyonunu arttırarak tümör oluşumuna sebebiyet verirler. Onkogenler ürünlerinin fonksiyonlarına göre sınıflandırılmışlardır. Büyüme faktörü olanlar, reseptör ve non-reseptör protein-tirozin kinazlar, (Epidermal Growth Faktör reseptör, bcr/abl onkogen), kinaz aktivitesinden yoksun reseptörler (anjiotensin reseptör) ve sitoplazmik protein serin kinazlar (raf/mil ailesi), G proteini ile bağlantılı membran proteinleri (ras ailesi) , sitoplazmik düzenleyiciler (crk onkogeni) ve transkripsiyon faktörleri (Myc, Fos, Jun) gibi [7]. Yapılan bir çalışmada kemiğe metastaz yapmış prostat kanserli hastalarda primer kanserde p21 gözlenmezken, metastaz hücrelerinin %20'sinde bu protein gözlenmiştir [7].

Kromozomal bozukluklar çeşitli kanser tipleriyle ilişkilidir. Kromozomal bozukluklardan olan anöploidi kanser hücrelerinde sıklıkla karşılaşılan bozukluklardan birisidir. Bütün kromozom takımının kazanımı yada kaybı, kardeş kromatitlerin düzgün ayrılabilmesi gibi hatalı mitoz bölünmeden kaynaklanırlar.

Translokasyonlar kanser üzerinde etkili olan diğer bir kromozomal mutasyonlardandır. En iyi çalışılan örneklerden biri kronik miyelogenoz lösemi (KML) ile ilişkili olan kromozom 9 ve 22 arasındaki translokasyondur. Janet Rawley bu translokasyonun sadece KML ile ilişkili beyaz kan hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir. Bununla beraber lenfoma hastalığı, kromozom 8'de bulunan c-myc geninin kırılarak diğer kromozomlarda immünglobulin genlerinin yanına göç etmesiyle lenfoit hücrelerin lösemik hücrelere dönüşmesi sonucu oluşmaktadır [3,8].

Kromozomların üzerinde yetmişden fazla kırılma bölgeleri tespit edilmiş ve bu bölgeler her bireyde değişkenlik göstererek spesifik pozisyonlarda lokalize olmuştur. Bu kırılma bölgelerinin çeşitli kanser tipleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. FRA3B sıklıkla bulunan kırılma bölgesidir ve bunu FRA16D>FRA6E>FRA7G>FRAXB>diğerleri takip eder. FRA3B'de lokalize olan FHIT geninin ve FRA16D'de yerleşmiş WWOX geninin inhibisyonu meme, ovaryum, mide, akciğer, prostat gibi kanserlerin gelişimine katkısı olduğu yapılan çalışmalar sonucunda analiz edilmiştir [7]. AT tekrarlarınınca zengin olan bu kırılma bölgeleri çeşitli trans-acting proteinler ile düzenlenirler. Kinaz ATR proteini, BRCA1 ve RAD51 gibi proteinlerin inhibe olmaları DNA hasarlarına ve kırılma bölgelerinde

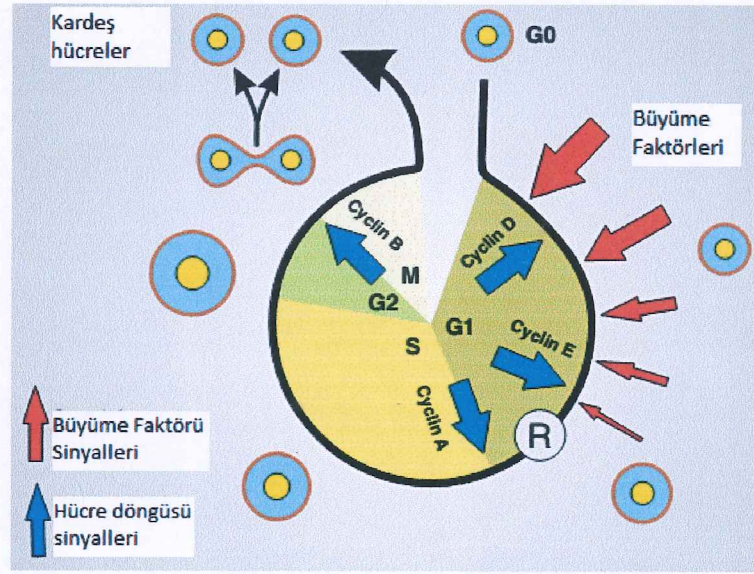
kırıklar oluşmasına neden olmaktadır. Bunlara ek olarak alkol ve kafeini fazla tüketilmesi ve sigara kullanılması gibi çevresel faktörlerde kırılan bölgelerin kararsızlığını etkilemektedir [7].

1.2 Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücre döngüsü, hücre bölünmesine öncülük eden ardı ardına tekrarlanmış basamaklardan oluşur. Hücre döngüsünde bir basamak başlar biter ve onu takiben diğer basamak başlar. Hücre döngüsü içerisinde bulunan kontrol noktaları, replikasyonun ve hücre bölünmesinin en doğru şekilde gerçekleşmesini sağlayan mekanizmaları içerir [9].

Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazlarını içermektedir. Hücre döngüsü çeşitli noktalarda siklin ve CDK kompleksleri ile düzenlenirler. CDK (Siklin Bağımlı Kinazlar) iki alt ünitelerden oluşan heterodimerik serin treonin kinaz sınıfına ait proteinlerdir [10]. Katalitik alt ünite ve düzenleyici alt ünitelerden oluşur. CDK'lar hücrede sürekli olarak ekspres olurlar ve siklin proteinleri ile regüle edilirler. Siklin bağlı kinaz proteinleri hücre döngüsü geçiş noktalarında görev yaparlar. CDK aktiviteleri siklin proteininin miktarıyla kontrol edilir. E3 ubiquitin ligazlar hücre durgun halde kalacaksa siklinleri yıkarlar [10-11].

Hücre döngüsü kontrol noktaları G1/S, G2/M ve M kontrol noktası olmak üzere 3 tanedir. Replikasyon (G1/S) kontrol noktasında replikasyonun başlaması, replikasyon çatalının kararlılığı ve DNA lezyonları kontrol edilir. G2/M kontrol noktasında replikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi ve Mitoz kontrol noktasında ise, kromozomların ve kardeş hücrelerin oluşması kontrol edilmektedir.[13]. Hücre döngüsü kontrol noktaları ve burada görev alan proteinler Şekil 1.1'de gösterildiği gibidir. Hücre döngüsünün hangi yönde ilerleyeceğine sinyal sistemleri karar vermektedir. Hücre gelen sinyale göre 4 farklı yol üzerinden ilerleyebilir. Bunlar apoptoz, farklılaşma, senesans ve hücre büyümesidir. Bu işlemler, protoonkogen ve baskılayıcılar olarak bilinen sistemlerle dinamik olarak kontrol altındadır [14-15].



Şekil 1.1: Hücre döngüsü kontrol noktalarının şema üzerinde gösterilmesi [15].

1.3 URG-4 Geni

Up Regulated Gene 4 (URG-4) 7. kromozomun kısa kolunda (7p13) bulunan ilk olarak hepatosellüler karsinoma hücrelerinde tespit edilen bir gendir. Hepatit B virüsü hepatosellüler karsinomada etiyolojik bir ajandır. Moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte tümör gelişiminde oldukça önemli bir risk olan bu virüs, HbxAg adında bir protein sentezlemektedir. Bu genin ekspresyonunun hepatosellüler karsinoma hücreleri ve virüs ile enfekte olmuş karaciğer dokusunda arttığı buna tezat olarak enfekte olmayan karaciğer dokusunda düşük olduğu analiz edilmiş ve dolayısıyla bu genin HbxAg'nin doğal bir efektörü olabileceği düşünülmüştür [16].

Bir diğer adı URGCP (Upregulated gene cell proliferation) olarak bilinen bu genin insanlarda üç tane varyantı bulunmaktadır. Varyant 1 mRNA'sı 3609 bç (NM_017920), varyant 2 mRNA'sı 3831 bç (NM_001077664) ve varyant 3 mRNA'sı (NM_001077663) 3636 bç uzunluğunda olup her üçü de yaklaşık 104 kda ağırlığında mitokondriyal protein sentezlemektedir. URG-4 geninin farelerde (*Mus musculus*) iki varyantı bulunmuştur. Varyantlar sırasıyla 5115bp ve 5531bp mRNA uzunluğuna sahiptirler. Bununla beraber sığırlarda (*Bos taurus*) 3523 bp

uzunluğunda, kurbağalarda (*Xenopus leavis*) 5463 bç ve sıçanlarda (*Rattus novegicus*) 3492 bç uzunluğunda mRNA'ları tespit edilmiştir.

URG-4'ün hücrel yerleşimi ve fonksiyonu konusunda çok fazla bir şey bilinmemektedir. URG-4 geninin osteosarkoma dokularında ekspre olduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsünün Geç G1 fazı ve S evrelerinde maksimum ekspre olan ve DNA polimeraz δ enzimine yardımcı PCNA proteini, neoplazma hücrelerinde büyüme markırı olarak kullanılmaktadır. Osteosarkomlu dokularda URG-4 ekspresyonu ile birlikte bu proteinin arttığı bulunmuştur. Buradan yola çıkarak hücrelerde büyümeyi arttırıcı etki yaptığı tespit edilen URG-4 geninin osteosarkomlu hastalarda önemli bir markır olabileceği düşünülmüştür [17].

Bu genin mide kanseri hücrelerinin büyümesini arttırdığı ve bunu siklin D1 (Hücre döngüsü Düzenleyici Protein) geninin ekspresyonunu arttırarak başardığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda normal mide epitelyum hücreleri ve mide kanseri hücrelerindeki ekspresyonunun karşılaştırılması sonucu kanser hücrelerinde daha fazla ekspre olduğu tespit edilen genin, onkojenik karakterde olabileceği varsayılmaktadır. Bununla beraber PCNA ile ilişkisi bu kanser tipi içinde önerilmektedir [18].

Siklin D1 ve URG-4 ile yapılan başka bir çalışmada, HepG2 ve Ges-1 hücre hatları kullanılmış ve genin bu hücre hatlarındaki ekspresyonunun siklin D1 ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. URG-4 siRNA'larla susturulduğunda HepG2 hücrelerinin büyümesinin azaldığı aynı zamanda siklinD1 ekspresyonunda azaldığı bulunmuştur. Doku kültürü ve deney fareleri ile yapılan deneylerde bu genin hücre büyümesini ve yaşayabilirliğini kontrol ettiği ve bu yüzdende tümör oluşumuyla bağlantılı olması üzerinde durulmuştur [19].

Yapılan bir analizde URG-4 polipeptidinin 690-697 aminoasitleri aralığında ATP/GTP bağlanma motifi bulundurduğu ifade edilmiş ve yapılan fonksiyon deneyleriyle URG-4 proteininin bağlanma yada hidroliz etme gibi işlevleri olmadığı gösterilmiştir [16]. Bunun dışında URG-4 proteinin yapısı ve işleyişi hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamaktadır.

Hepatokarsinomlu hücrelerle yapılan başka bir çalışmada, URG-4 geninin over ekspresyonu sağlandığında proliferasyonu tetiklediği ve susturulduğunda ise

karşıt bir etki yaptığı bulunmuştur. Aynı zamanda aşırı ifade olduğunda hücrelerin G1 fazından S fazına geçiş yapmasını p21 ve p27 proteinlerini ekspresyonunu azaltarak, siklin D1'i ise arttırarak sağlamakta olduğu tespit edilmiştir. FOXO3a transkripsiyon faktörünü ifadesini azaltarak Akt yolağı üzerinden hücre döngüsünü etkilediğı vurgulanmaktadır [20]

miRNA'lar ve URG-4 geni ilişkisini inceleyen başka bir makalede miR-1274b, miR-4286, miR-3926, miR-4271, miR-320d, miR-3134, miR-3663-5p ve miR-3664 seviyelerinin URG-4 geni varlığında ve yokluğunda değıştiğı saptanmıştır [21].

1.4 Sitokinler

Sitokinler, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyici salgılanan glikoproteinlerdir. Embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, hematopoez ve bağışıklık sistemi gibi önemli biyolojik süreçlerde görev alırlar. Sitokinler hedef hücrelere sinyallerini hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak iletirler. Hücre sel cevap sitokininin tipi ve hücreye bağımlıdır [22-23].

1.4.1 Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- β) Sitokini ve Kanser ile İlişkisi

1.4.1.1 TGF- β ve Reseptörleri

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) bir sitokindir. TGF- β ailesinin insan, fare, kurbağa ve diğ er omurgalılarda yaklaşık 30 üyesi bulunmaktadır. Aile BMP/GDF ve TGF- β /Activin/Nodal olarak iki genel dala ayrılmıştır. Ailenin üyelerinin bazıları hücre tipine göre az veya kısa zaman dilimlerinde ekspre olmaktadır. TGF- β sitokini adını soft agarda fibroblast büyümesini stimule ettiğı için almıştır [24,25].

TGF- β sitokini salgılanan bir polipeptittir. TGF- β 1 TGF- β süper ailesinin prototipidir. İlk olarak sığı r böbreğı, insan plasentas ı ve insan trombositlerinden

saflaştırılmıştır. Biyolojik olarak aktif olan formu 25 kDa polipeptit, iki alt ünitenin (12.5 kDa) disülfid bağlanmasıyla oluşmuştur. Sitokinin bütün türlerdeki aktif formunun aminoasit dizisi oldukça korunmuştur. TGF- β 2 ilk olarak insan glioblastoma hücrelerinden saflaştırılmıştır. TGF- β 2'nin olgun formu TGF- β 1 proteinine %74 dizi benzerliği göstermektedir. Ailenin 3. üyesi olan TGF- β 3 dokulardan ya da hücrelerden izole edilememiştir ancak rekombinant formlardan saflaştırılmıştır. Her iki üyesine de yüksek benzerlik göstermektedir [26]. Kanser hücrelerinde TGF- β 1 proteini, TGF- β 2 ve β 3'den daha yoğun olarak bulunur. TGF- β 1'in ilk olarak inaktif latent disülfid bağlı homodimerik formu salgılanır. Bu form diğer ekstrasellüler proteinlere bağlı bulunur. Olgun biyoaktif ligandın oluşabilmesi için latent kompleksten C-terminal homodimerik polipeptidin yıkılması gerekir. Trombospondin veya integrin reseptörlerinin bunun yanı sıra kalpain, katepsin D, şimaz, elastaz, endoglikozit F, kallikrein, MMP-9, nötraminidaz ve plazmin proteinleri olgun TGF- β oluşumunda direkt olarak etkili olduğu varsayılmaktadır [27].

Olgun TGF- β sitokini membrana bağlı proteinlerle interaksiyona girer. Bunlar TGF- β Tip I, Tip II ve Tip III reseptörler olarak bilinirler. Moleküler ağırlığı en küçük olan Reseptör I 65 kDa'dur. Reseptör II 85-95 kDa ve Reseptör III 280-330 kDa ağırlığındadır. Birçok hücre tipi Tip I ve Tip II reseptörleri içerir ancak Tip III reseptörünü ekspre etmez. Epitelyal karaciğer hücrelerinin bazıları mutant formlarda Tip I ve Tip II reseptörlerini bulundurabilir [28-30].

5 farklı Tip I reseptörü bulunur. Bu reseptörler TBRI (ALK5), TSR-1 (ALK-1), ActRIB (ALK-4), ActRI (ALK-2), BMPRIA (ALK-3), BMPRIB (ALK-6) ve ALK-7 isimleriyle bilinirler. Bütün bu reseptörler 53 kDa ağırlığındadır. Sisteince zengin ekstrasellüler bölge içeren transmembran glikoprotein olan bu reseptörler glisin serin açısından zengin GS motiflerini ve C terminal ucunda serin treonin kinaz domainlerini içerirler [31].

Tip II reseptörleri 7 farklıdır [31]. Bunlar TBRII, ActRIIA, ActRIIB, BMPRII ve AMHR olarak adlandırılmışlardır. 60 kDa ağırlığında olan bu reseptörler Tip I reseptörlere benzerlik göstermektedirler. Bu reseptörlerde de sisteince zengin bir bölge ve serin treonin kinaz domainleri bulunur. Tip I ve Tip II reseptörleri hücre yüzeyinde homodimer olarak bulunurlar. TGF- β süper ailesinde genellikle sinyal iletimi bu şekilde gerçekleşir [32].

Tip III reseptörleri betaglikan ve endoglin içerir [32].

1.4.1.2 TGF- β 'nın Görevleri ve Sinyal İletim Mekanizması

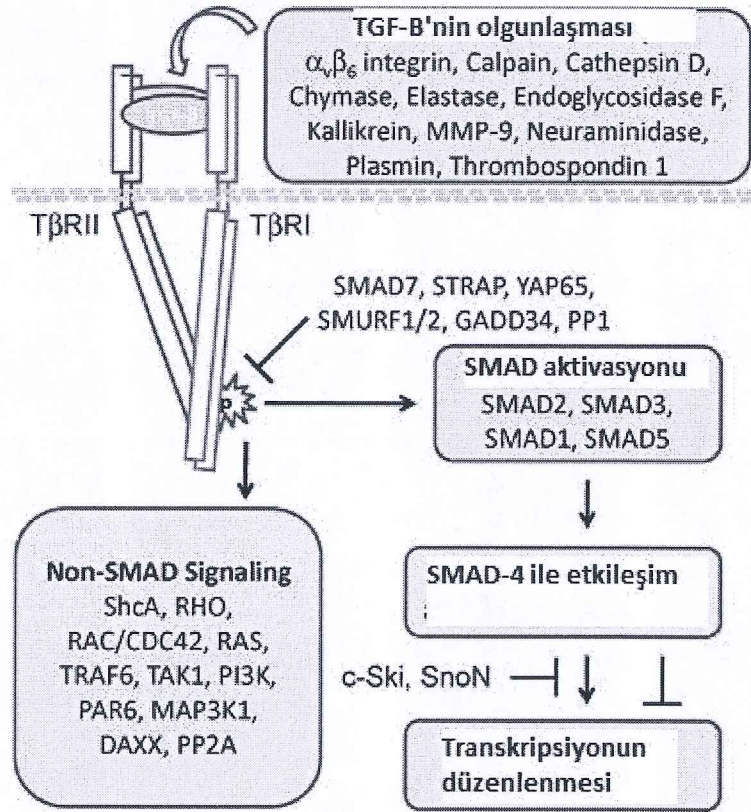
Hemen hemen bütün hücre tiplerinde TGF- β sitokininin hücre büyümesi, farklılaşma ve adhezyon gibi biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir. TGF- β sitokini hücre tipi ve büyüme koşullarına bağlı olarak ikili olarak etki gösterebilir. Hücre çoğalmasını stimüle edebilir yada inhibe edebilir. Hücre büyümesinin yanı sıra ECM (Extracellular matrix; ekstrasellüler matriks) üretimini arttırmak gibi önemli bir görevi daha bulunmaktadır. TGF- β sitokini kollojeni fibronektin, laminin ve proteoglikanlar gibi birçok ECM komponentlerinin salgılanmasını arttırabilir. Hücre fenotipinin belirlenmesinde önemli olan bu sitokin, keratinositler, bronşial hücreler ve kolon karsinoma hücreler gibi epitelyum hücrelerinin farklılaşmasında pozitif etki gösterir [26]. Hem parakrin hem de otokrin etki gösteren TGF- β sitokini tümör oluşturma ve aynı zamanda anti-tümör aktivitesinden dolayı TGF- β paradoksu olarak literatüre geçmiştir [33].

Olgun ligand, proteoglikan, β glikan ve Tip III reseptörüyle bağlantı kurar. Dimerik TGF- β Tip II ve Tip I reseptörlerinin oluşturduğu homodimerik komplekse bağlanır. Reseptörlerin alt üniteleri transmembran domainleri içerir. TGFRII kinaz sürekli olarak fosforillenmiş şekildedir ve TGFRI'in katalitik bölgesini serin treonin rezidülerinden fosforilize eder. TGFRI'de meydana gelen konformasyonel değişim ile katalitik merkez aktive olur [31-35].

TGF- β sinyal iletimi SMAD-bağımlı ve Smad-bağımsız olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. Smadlar N-terminal Mad homoloji (MH1), orta linker ve C-terminal (MH2) domainlerini içeren hareketli proteinlerdir. MH1 domaini nükleer lokalizasyon, DNA bağlanma ve protein-protein interaksiyon işlemlerini gerçekleştirir. Linker (bağlanma) domaini ise diğer düzenleyici fosforilasyon sinyal kinazların bağlanma yeridir. (MAPKs, Ubikitin ligazlar). MH2 domaini ise fosfo serin bağlanma gibi büyük protein protein interaksiyonlarını içerir. Smad 2 ve 3 SARA (Smad anchor for receptor activation) proteinine bağlanır. SARA'nın üç önemli görevi bulunmaktadır. Birincisi SMAD'ları sitoplazmada tutmak, ikincisi MH2 domaininde oluşana nükleus iletim sinyalini kapatmak, üçüncüsü ise aktif olan reseptörlerle SMAD'ları birleştirmektir [37]. Tip I reseptörü Smad 2 veya 3'ün C terminal domainindeki serin rezidülerini fosforiller. Co-smad olarak bilinen Smad 4 ile birleşerek trimerik protein kompleksi oluştururlar. Ancak R-Smad-CoSmad kompleksleri nükleusa gelip DNA'ya direk olarak bağlanabilirler. Aynı zamanda

smad yolağının negatif regülatörleri olan 3 protein bulunmaktadır Bunlar, I-smad olarak bilinen Smad-7, Smurf ve fosfotazlardır. TGF- β sitokini SMAD proteinleri aracılığıyla hücre büyümesinde görev alan siklin bağımlı kinazları inhide eden p15 ve p21 proteinlerini aktifleştirerek tümör baskılayıcı görevini üstlenir [38].

Smad yolağının yanı sıra TGF- β diğer intrasellüler yollar olan MAPK'lar, PI3K ve Ras süper ailesinin üyelerini de aktive edebilirler. Genellikle epitel hücrelerde TGF- β sinyali RAS aracılığıyla iletilir. Map kinaz yollarının TGF- β tarafından nasıl aktive olduğu bilinmemektedir. Yeni keşfedilmiş olan TAKI (TGF- β aktive edici kinaz) ve TABI (TGF- β bağlanma proteini) MAP kinaz kinaz kinaz proteinlerinin MAP kinaz üzerinden sinyal iletimini sağladığı ve TGF- β uygulandığında aktif forma geldiği bilinmektedir. TGF- β sinyal iletim sistemi ve komponentleri Şekil 1.2'de verildiği gibidir [26].



Şekil 1.2: TGF- β sinyal iletim sistemi [35].

1.4.1.1 TGF- β ve Kanser

TGF- β sinyali kanserli hücrelerde tümörijeniteyi regüle eder. Tümör içerisinde matriks ve stromal sinyaller kanserin regülasyonu için gereklidir. Bu sinyaller TGF- β sitokinini de içerir. TGF- β sitokini kanserli hücrelerde erken evrede tümörijeniteyi baskımlarken, geç evrede tümörijeniteyi artırır [27].

TGF- β bazı hücre tiplerinde epitelyal, endotelyal ve lenfositlerde hücre proliferasyonunu inhibe eder ve tümör baskılayıcı olarak görev yapar. TGF- β 'nın tümör baskılayıcı etkisi c-Myc ifadesini baskılayarak olur. Ayrıca apoptozis ile ilgili bazı genleri aktive eder. Örn: p21, DAPK, GAD45 β [27].

Bazı kanser tiplerinde TGFBR1, TGFBR2, SMAD-2 ve SMAD-4 komponentleri aktif olmayabilir. Tip II reseptörü, sitoplazmik bölgedeki kinazı kodlayan bölgede karakteristik kısa adenin bazı tekrarları içermektedir. Kanser hücrelerinde reseptörün bu bölgesi mutant reseptörlerin oluşmasına neden olur. Pek çok kanser tipinde bu bölgede mutasyon tespit edildiği için bu bölge *sıcak nokta* olarak bilinmektedir. Adenomadan karsinomaya geçişte meydana gelen bir mutasyon tipidir. Birçok TGF- β dienci neoplastik hücreler R1 ve R2 ekspresyonunu azaltırlar. Prostat kanseri hücrelerinde Tip II reseptörünün mutant olmasından dolayı reseptörün bu hücrelerde aşırı ekspresyonu sağlanmış ve bu durumda hücreler kaspaz 1 yolağı üzerinden apoptoza yönelmiştir [28]

Tip II reseptörü gibi Tip I reseptörünün kinaz domaininde de mutasyonlar meydana gelebilir. Meydana gelen bu pseudoreseptör BAMBI olarak adlandırılır. *Xenopus* embriyosunda tanımlanmıştır. Memelilerdeki ortoloğu 'NMA' diye isimlendirilmiştir. Metastatik portansiyeli artan hücrelerde TGF- β sinyalinin azalmasıyla birlikte NMA'da azalır. Bazı kanser tiplerinde ise TGF- β 'nın hücre büyümesini inhibe edici aktivitesi olmayıp invazyon ve metastazı kolaylaştıran etkisi bulunur [39,40]

Tümör stromasında indüklenen Hepatosit Growth Factor: Hepatosit büyüme faktörü (HGF), Platelet Derived Factor: Trombosit kaynaklı Faktör (PDGF) gibi mitojenik faktörler bulunur ve TGF- β indirekt olarak bu faktörlerle bağlantılıdır. Kanserli hücrelerde TGF- β , MEK1, TAK1, MAPK, PI3K, Ras, RhoA, PP2A ve SMAD'lar gibi diğer sinyal yollarını harekete geçirebilir [41].

Tümör oluşumunda TGF- β sitokinini ile yapılan bazı çalışmalar ışığında önerilen bazı bilgiler bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, TGF- β enjekte edilmiş

farelerin tümör formasyonunun arttığı gözlenmesi, ikincisi TGF- β 'yı aşırı ifade eden hücrelerin ECM komponentlerini ve adhezyon reseptörlerini yüksek seviyede sentezlemesi ve üçüncüsü ise deri tümörlerinde malignanter ilerlemenin arttırmasıdır.

TGF- β sitokini epitelden mezenşimal karaktere geçişi indükler [42-44]. Epitelden mezenşime geçiş onkojenik Ras veya reseptör tirozin kinazlar tarafından indüklenmektedir. Son zamanlarda buna ek olarak RTK/Ras ve TGF β /BMP sinyalleri ile de kontrol edildiği bulunmuştur [31].

1.4.1.2 TGF- β ve Karaciğer Kanseri

Kanser çeşitlerinden karaciğer karsinoması kadın ve erkeklerde 5. yaygın olan kanser tipidir. Dünyada ölümlere sebebiyet vermesi açısından 3. sırada yer alan bu hastalıkta tümörün başlangıcı ve ilerlemesi hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak tümör oluşumunun TGF- β yollarıyla arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Normal karaciğer hücrelerinde de TGF sitokini salgılanır. Ancak karsinomada ekspresyonunda bir artış olduğu rapor edilmiştir [44].

Drazen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Tip II reseptörü açısından mutant olmayan duyarlı ve tipII reseptörü açısından mutant olan dirençli Hep3B hücreleriyle çalışmışlardır. Yaptıkları analiz sonucunda duyarlı olan formda tumor formasyonu yavaşlarken, dirençli olan formda daha hızlı gerçekleşmektedir. Yaptıkları microarray analizi sonucunda dirençli formlarda duyarlı formlara göre 6 farklı gen ekspre ettikleri ve bu genlerin stimulatörünün TNF- α olduğu keşfedilmiştir [46].

1.4.2 TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü) Sitokini

1.4.2.1 TNF- α Sitokini ve Reseptörleri

TNF- α sitokini 3 monomer içeren Tip II transmembran glikoproteindir [47]. Membranda öncül polipeptid dizisi sağlayan 76 aa oldukça iyi korunmuş hidrofobik bölgedir. Olgun olmayan formu 26 kDa ağırlığında Pro TNF- α olarak bilinir. Bu protein MMP7, MMP10, ADAM10 ve TACE (Matelloprotease TNF- α converting enzyme: Matelloproteaz TNF- α dönüştüren enzim) gibi enzimler tarafından kesilerek

olgun forma dönüştürülür. Suda çözünebilir olan TNF homotrimer yapıda ve 52 kD ağırlığındadır [48].

TNF sitokini yüksek afinite ile transmembran reseptör I (TNFRI, p55 ve TNFSF1A), transmembran TNF (TmTNF) ve transmembran reseptör II (TNFRII, p75, TNFSF1B)'ye bağlanır. TNF sitokini bir çok biyolojik aktivitesini TNFRI'e bağlanarak gösterir [49].

TNFRI 454 aa uzunluğunda, 21 aa sinyal peptid dizisi, bunu takip eden ekstrasellüler domain (ECD) 191 aa, transmembran domain (TMD) 23 aa ve intrasellüler domain (ICD) 219 aa kısımlarından oluşur. TNFRI ve TNFRII reseptörlerinin ekstrasellüler kısımları birbirlerine oldukça benzerdir. Ancak ICD kısımları birbirlerine önemli derecede benzerlik göstermezler. Bu ayrıntı, bu iki reseptörün uzak sinyal iletimi mekanizmalarında görev aldığı kanıtıdır. TNFRI intrasellüler domaininde homofilik protein- protein interaksyonu için gerekli olan sitoplazmik ölüm domaini adı verilen bir kısım daha içerir. Bu kısım TNF tarafından indüklenen apoptozis için gereklidir. TNFRII ise 235 aa ekstrasellüler domain, 30 aa transmembran domaini, 174 aa sitoplazmik domain içerir [50]

TNFRI reseptörü lenfoma sisteminde ve nerdeyse vücuttaki bütün hücrelerde bulunur. TNFRII reseptörü ise oldukça spesifiktir. T düzenleyici hücreler, endotel hücreler, langerhans adacıkları ve insan mezenşimal kök hücreleri gibi kısımlarda ekspre olur. Bu hücreler aynı zamanda TNFRI de sentezlerler. Bu sayede hücrenin ölüm ve yaşam mekanizmalarını dengelerler [50,51].

Bu reseptörler proliferasyon, migrasyon, enflamasyon ve hücre ölümü gibi hücrede önemli etkileri başlatabilirler. Proenflamasyon ve patojen öldürme gibi faaliyetler TNFRI üzerinden NFK β transkripsiyon faktörü ile ilişkili olarak gerçekleşirken TNFRII ise daha çok enflamasyonun baskılanması şeklinde sinyal iletimi gerçekleştirir [51].

1.4.2.2 TNF- α Sitokini Görevleri ve Sinyal iletim Mekanizması

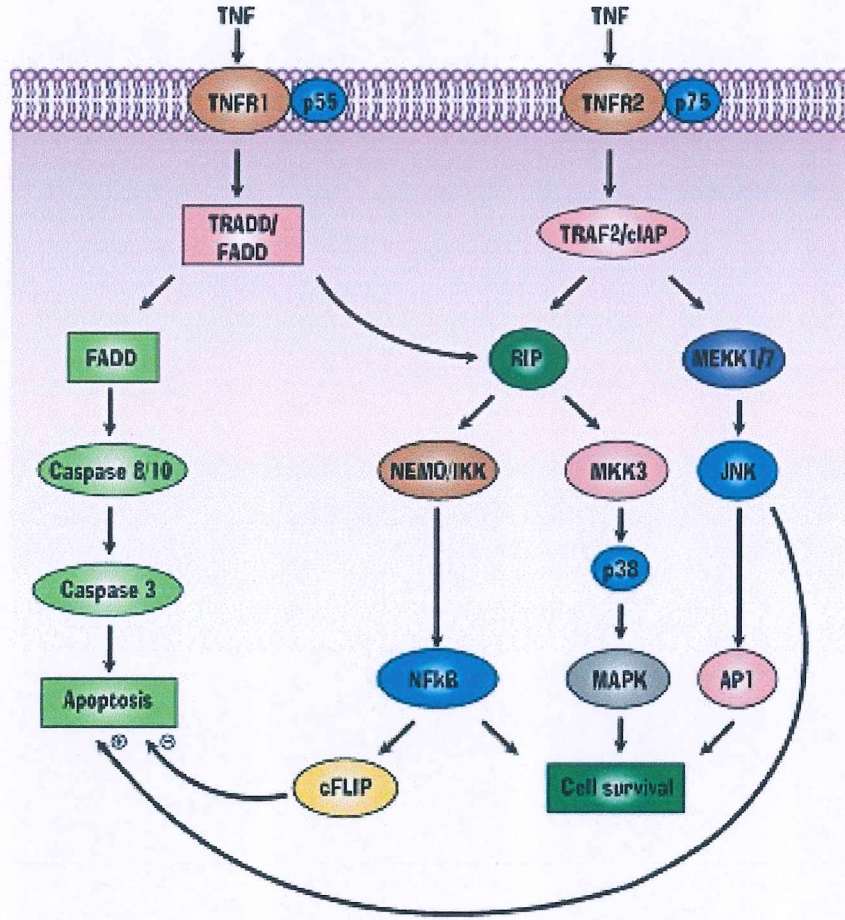
Hücre büyümesi, tümör oluşumu, tümörijenite, enflamasyon, viral replikasyon, septik şok ve otoimmün gibi fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan pleiotropik bir sitokindir [52].

TNF- α sitokini enflamasyona cevap ve başışıklığın başlaması gibi işlevleri olan önemli bir sitokindir. Kaspazlar, NFK β ve MAP kinazlar gibi değişik sinyal iletim yolaklarını içerir[53-55]. Sitokinin sinyal iletim mekanizması Şekil 1.3'de verildiği gibidir.

TNF- α sitokini TNFRI reseptörüne bağlandığında TRADD (TNFRI Bağlantılı Ölüm domaini: TNFRI-associated Death Domain) ve FADD (FAS bağlantılı ölüm Domaini: FAS-associated death domain) adaptör proteinleri aktive olur. TRADD ve FAD adaptör proteinleri TNFRI'de bulunan ölüm domainlerine bağlanır ve kaspaz yolağı aktive olur. İkinci apoptotik yolak TRADD'ın RIP (Receptor interacting protein: Reseptör ilişkili protein) adı verilen proteini aktive etmesiyle başlar [47].

TNFRII TNRI'den farklı olarak ölüm domainini içermez. Sitoplazmik domaininde bulunan bağlanma domainini TRAF-2 bağlanır. TRAF-2, TRAF 1, TRAF-3, cIAP1 ve cIAP2'yi aktive eder. Bu proteinler hücre yaşayabilirliğinde görev alan diğer sinyalleri de aktive edebilirler. Aynı zamanda NFK β inhibitörü olan IKK α tarafından serbest bırakıldığında çekirdek içerisine girer ve hücre yaşayabilirlik mekanizmaları açılır [47] (Şekil 1.3).

TNF- α TNFRII reseptörüne bağlandığında ise öncü yaşayabilirliği kontrol eden transkripsiyon faktörü olan NFK β aktive eder [47].



Şekil 1.3: TNF- α sitokininin sinyal iletim mekanizması [47].

1.5 Çalışmanın Amacı

URG-4 geni hepatokarsinomlu hücrelerde HbxAg proteininin doğal efektörü olarak bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda ise kemik ve mide kanseri hücrelerinde ekspresyonunun arttığı tespit edilmiş ve proliferatif ajan hatta bir onkogen olabileceği vurgulanmıştır. Hücre döngüsü ile yakından ilişkili olduğu düşünülen bu genin siklin D1 gen ifadesini arttırdığı ve bunu AKT yolağı üzerinden etkilediği de bulgular arasındadır. Kanserli hücrelerde ekspresyonu artan bu genin hakkında oldukça kısıtlı bilgi bulunmaktadır.

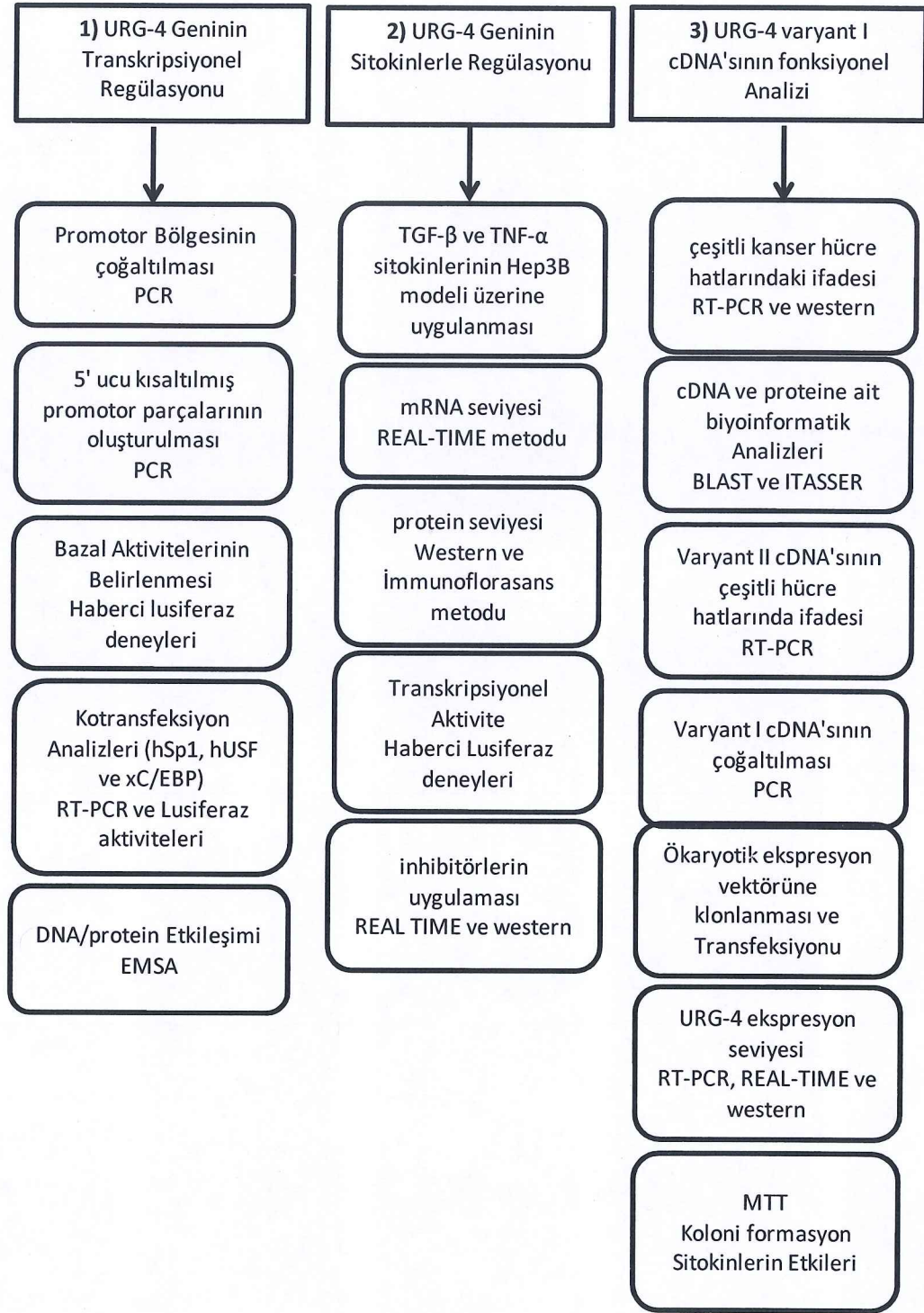
- (i) Genin regülasyonu aydınlatılmamış olup promotör bölgesi ve buraya bağlanan transkripsiyon faktörleri bilinmemektedir.
- (ii) Bununla beraber sitokinlerden ekspresyonunun nasıl etkilendiği konusunda da herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tezde planlanan çalışmalar 3 kategoride incelenebilir. Kapsamla ilgili akış diyagramı Şekil 1.4'de sunulduğu gibidir.

Tezin ilk kapsamında URG-4 geninin promotor bölgesi biyoinformatik yöntemle belirlenerek, promotor bölgesi PCR'a dayalı bir teknikle çoğaltılıp, transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için lusiferaz haberci vektörüne klonlandı. Ayrıca fonksiyonel olan promotor bölgesi, kısaltılarak yapılan promotor parçalarının oluşturulmasıyla belirlendi. Bu promotor parçalarının oluşturulması için PCR'a dayalı strateji kullanıldı. URG-4 promotor bölgesi biyoinformatik olarak analiz edilerek potansiyel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri tespit edildi. Fonksiyonel promotor parçalarına hangi transkripsiyon faktörlerinin etkili olduğunun anlaşılması amacıyla promotor bölgesinde potansiyel bağlanma bölgesi olan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon plazmitleri ve promotor parçalarını taşıyan haberci vektörler ile beraber transfekte edildi ve promotor aktivitesine olan etkileri incelendi. EMSA analizi ile promotor bölgelerinde DNA protein etkileşimleri analiz edildi. Bağlanmaların spesifikliği yarışma deneyleri ve antikor süpershift analizleri ile doğrulandı. Ayrıca transkripsiyonel aktivitede fark oluşturan transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi olan (over ekspre) hücrelerde URG-4 geni ekspresyonu mRNA düzeyinde RT-PCR analizi ile tespit edildi.

Tezin ikinci kapsamında, ise seçilen bazı sitokinlerin (TGF- β ve TNF- α) URG-4 geni üzerine etkisi mRNA ve protein düzeyinde belirlendi. Kullanılan ana model olarak insan Hepatoma (Hep3B) hücreleridir. Kullanılan sitokinlerin Hep3B hücreleri üzerinde etkileri MTT deneyi ile belirlendi. Ayrıca uygulanan sitokinlerin URG-4 mRNA üzerine etkileri farklı zaman dilimlerinde qRT-PCR tekniği ile belirlenip, protein seviyelerinde etkileri de immunflorasan ve western blot tekniği ile gösterildi. Uygulanan TGF- β ve TNF- α sitokinlerinin transkripsiyonel düzeyde etkileri promotor parçaları ile transfekte edilmiş hücreler üzerinde tespit edildi. Elde edilen etkinin sadece karaciğer hücrelerine spesifik olup olmadığı belirlenebilmesi için prostat kanser modelinde de (PC-3) mRNA ve protein düzeyinde çalışmalar yapıldı. Tespit edilen etkinin hücre içi hangi yolları kullandığının belirlenmesi amacıyla, JNK, PI3K, MAPK yolak inhibitörleri ve TGF- β yada TNF- α sitokinleri uygulanmasının ardından URG-4 ekspresyonunda ki değişimler mRNA ve protein düzeyinde belirlendi.

Tezin 3. kapsamında, URG-4 geninin cDNA'sının fonksiyonel analizi için cDNA'nın farklı hücre hatlarında ifadeleri RT-PCR ve western blot tekniği ile belirlendi. cDNA larının biyoinformatik analizi ile karşılaştırılması ve farklı olan *varyant- 2* ve *Varyant- 4*'ün ekspresyon seviyesinin farklı hücrelerde tespiti RT-PCR tekniği ile belirlendi. URG-4 proteininin hücrede lokalizasyonu immun floresans tekniği ile gösterildi. URG-4 proteinin 3 boyutlu yapısı biyoinformatik olarak I-TASSER analizi ile tespit edilerek, olası fonksiyonel domainleri tespit edildi. Ayrıca URG-4 *Varyant-1* cDNA sı PCR'a dayalı teknikle ökaryot ekspresyon vektörüne klonlandı ve hücrelere geçici ve stable (kalıcı) olarak transfeksiyonu yapıldı. URG-4 geninin aşırı ifadesi geçici transfeksiyonu Hep3B hücrelerine uygulandı. Genin aşırı ifadesi RT-PCR, qRT-PCR ve western blot ile doğrulanması yapıldı. MTT analizi ile hücre proliferasyonu test edildi. Koloni formasyon deneyleri ile URG-4 genini ektopik olarak ifade eden hücreler, koloni oluşturma yetenekleri belirlendi. Kalıcı (stable transfeksiyon) transfeksiyon deneyleri Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirildi. Kalıcı transfekte edilen URG-4 qRT-PCR, RT-PCR analizi ile doğrulandı. URG-4 geni ektopik ifadesinin hücre proliferasyonuna etkileri MTT analizi ile belirlendi. TNF- α ve TGF- β sitokinlerinin etkileri URG-4 genini ektopik ifade eden hücrelerde de RT-PCR stratejisi ile araştırıldı.



Şekil 1.4: Tez kapsamında yapılan çalışma basamaklarını özetleyen akış diyagramı

2. MATERYAL-METOD

2.1 Kullanılan Makine Teçhizat

Tez çalışması sırasında kullanılan araç-gereçler ve Markaları Tablo 2.1’de gösterildiği gibidir.

Tablo 2.1: Kullanılan araç-gereçler ve Markaları

Cihazın Adı	Markası
Elektroforez tankı	Apelex, İngiltere
Elektroforez için güç kaynağı	Consort/İngiltere
Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica/ İspanya
pH metre	WTW/Almanya
Isıtıcı blok	FALC/İtalya
Thermo cycler	Techne progene, İngiltere
Mikro santrifüj	Sigma laborzentrifügen, Almanya
Sıcak Su banyosu	Elektromag/Türkiye
Vorteks	Elektromag/Türkiye
Buz makinesi	Fiocchetti, İtalya
Buzdolabı(-20) ve(+4)	Profilo/Türkiye
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL,Almanya
Santrifüj	Hettich Zentrifügen, Almanya
Luminometre	Thermo
Light cycler 485	Roche Diagnostic
Qubit florimetre	İnvitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1/(Comecta Sa)

Tablo 2.1: (Devam) Kullanılan araç-gereçler ve Markaları

Otoklav	Hirayama/Japonya
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging system
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
-80 derin dondurucu	Thermo
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair
Horizontal çalkalayıcı	GFL, Almanya
Laminar air flow	TelstarBİOII/ İspanya
Mikroskop	Nikon eclipse

2.2 Materyal

Klonlama aşamasında kullanılan kitler ve kimyasallar Tablo 2.2'de verildiği gibidir. Tablo 2.3'de bu aşamada kullanılan vektörler ve temin edildikleri firmaların adları bulunmaktadır. Transformasyon aşamasında kullanılan bakteri soyları Tablo 2.4'de verildiği gibidir.

Tablo 2.2: Klonlama aşamasında Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

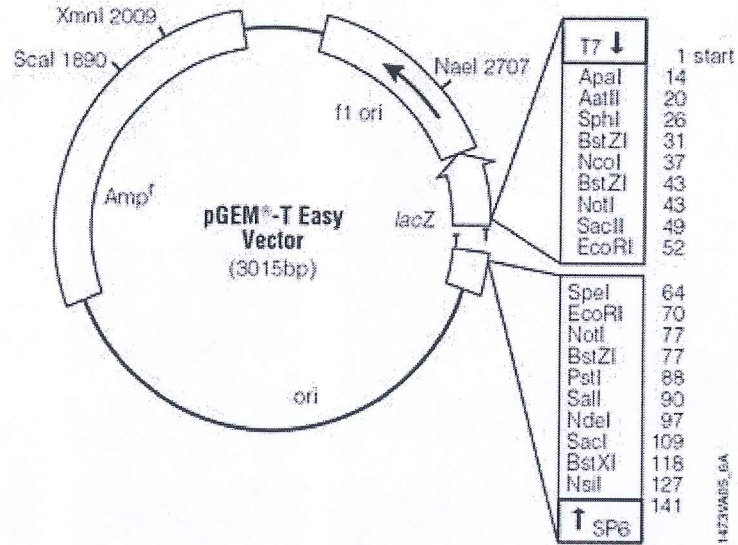
Malzemenin Adı	Firmanın Adı
T4 DNA ligaz	NEB, Fermentas
Ligaz buffer	NEB, Fermentas
Restriksiyon endonükleazlar (xhoI, HindIII, XbaI, ApaI)	Fermentas
Amfisilin antibiyotiği	Sigma
Kanamisin antibiyotiği	Sigma
LB broth	Pronadisa
Agar	Pronadisa
10mm petri plakaları	isolab
50 ve 15mL falkonlar	isolab
Mini prep küçük ölçekli plazmit izolasyon kiti	Fermentas

Tablo 2.2: (Devam) Klonlama aşamasında Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

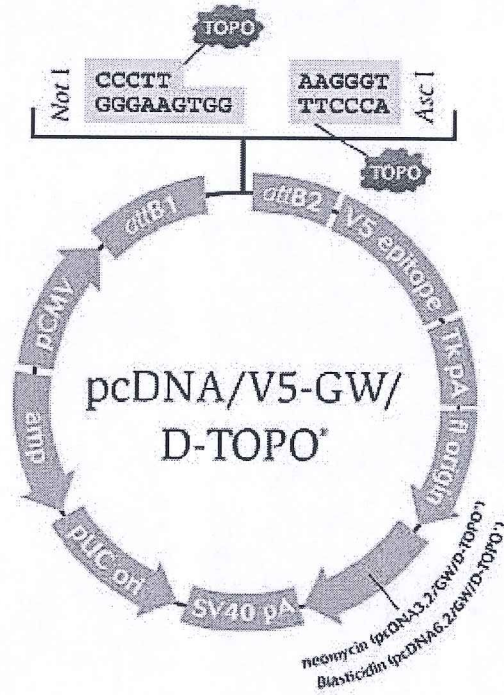
Maxi prepbüyük ölçekli plazmit izolasyon kiti	Fermentas
Jelden geri purifikasyon kiti	Fermentas
Proteinaz K	Sigma
Sature Amonyum asetat (NaAc)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
EDTA	Sigma
Tris base	Sigma
Kuvartz 96well plate	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Agaroz	Fluka
Borik asit	Merck
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	Fermentas
MgCl ₂ (25mM)	Fermentas
Taq+KCl Tamponu	Fermentas
Taq polimeraz	Fermentas
Betain	Sigma
7-deaza GTP	İnvitrogen
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
Gliserol	Merck
6X yükleme boyası	Fermentas

Tablo 2.3: Klonlama aşamasında kullanılan Vektörler ve Temin edildikleri firmaların adları

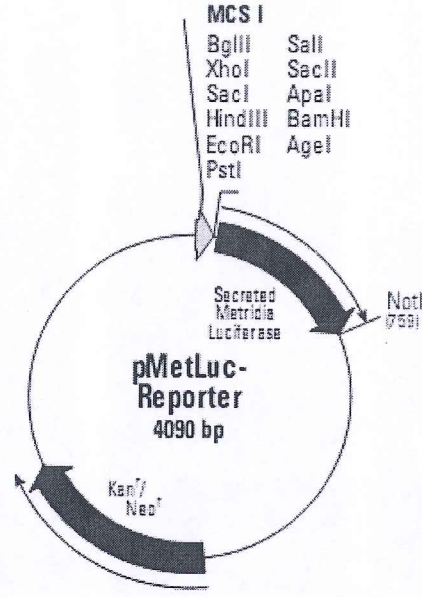
Vektörün adı	Temin edilen Firmanın adı
pGEMT®easy	Promega
pMetLuc Reporter	Clontech Laboratories
pMetLuc Kontrol	Clontech Laboratories
Seap-2 kontrol	Clontech Laboratories
pcDNA™3.2/V5 Gateway	Life Technologies



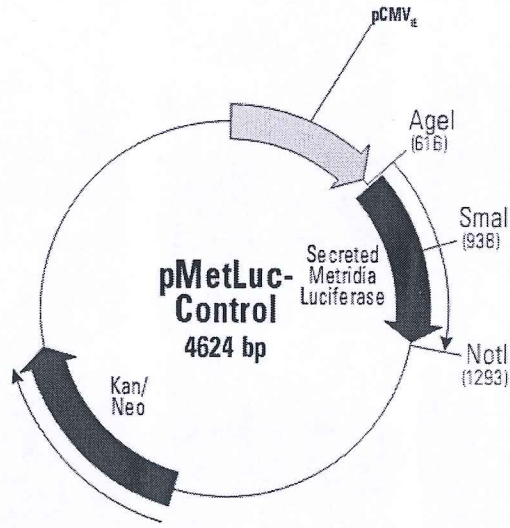
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi



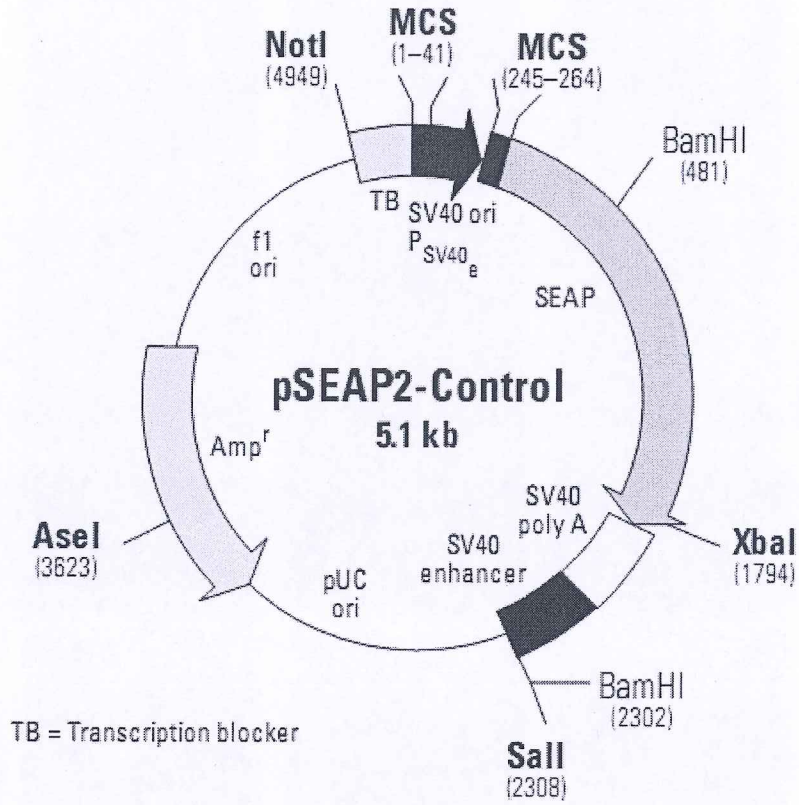
Şekil 2.2: pcDNA3.2 Topo Gateway vektörün şematik gösterimi



Şekil 2.3: pMetLuc Reporter vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.4: pMetLuc Kontrol vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.5: pSEAP2-kontrol vector sisteminin şematik gösterimi

Tablo 2.4: Transformasyon aşamasında kullanılan Bakteri Soyları

Bakteri suşları	Genotip
XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)]
DH5-α	dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1

Tablo 2.5: Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kitler ve kimyasallar

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Highclone/Gibco
FCS (Fetal Sığır Serum)	Sigma
L-Glutamin	Sigma
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma
Tripan blue	Sigma
75 ve 25cm ² 'lik flasklar	Corning
10-25mL Serolojik pipetler	Corning
0,22 mikron filtre	Sartorius
0,45 mikron Büyük filtre	Sartorius
50-15mL falkon	Corning
Bovin serum albumin	Sigma
Tripan mavisi	Sigma

Tablo 2.6: Kullanılan hücre hatları ve Temin edilen kaynakları

Hücre Adı	Temin edilen Kaynak
Hep3B (Human Hepatoma Cell line)	Dr. Dipak Ramji, Cardiff Üniversitesi, İNGİLTERE
MCF-7(Human breast adenocarcinoma cell line)	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet D.GÜRHAN
Isckawa	Çapa Tıp Fakültesi öğretim üyesi Ayhan Bilir
HL60	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet D.GÜRHAN
Hela	Dr. Dipak Ramji, Cardiff Üniversitesi, İNGİLTERE
Huvec	Dr. Ayşe Begüm Tekinay , Bilkent Üniversitesi
Mg-63(Human Osteosarcoma Cell line)	Cardiff Üniversitesi (İngiltere) Dr. Kenneth Brown
Saos-2 (Human Osteosarcoma Cell line)	Cardiff Üniversitesi (İngiltere) Dr. Kenneth Brown
PC3 (Human prostate cancer cell line)	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Doç Dr. Kemal KORKMAZ
DU-145 (Human prostate cancer cell line)	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Doç Dr. Kemal KORKMAZ
HT-29 (Human Colon Carcinoma)	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. İsmet D.GÜRHAN

Tablo 2.7: RNA çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmaların adları

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
RNA izolasyon kiti	Fermentas
MOPS	Merc
DEPC	Sigma
Formaldehit	Sigma
Reaksiyon tamponu	Fermentas
oligodT	Fermentas
Ribolock inhibitörü	Fermentas
Geri Transkriptaz enzimi	Fermentas

Tablo 2.8: Protein çalışmalarında kullanılan Kimyasallar ve Temin Edildikleri Firmaların Adları

Malzemenin Adı	Firmanın Adı
Trizma Base	Sigma Aldrich
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Merck
Glisin	Merck
Metanol	Merck
Akrilamit- Bisakrilamit	Fisher Scientific
Yağsız Süt tozu	Chem Cruz
Tween -20	Sigma Aldrich
Tetramethylethylenediamine(TEMED)	Sigma
Gliserol	Merck
2-Merkaptoetanol	Sigma
ECL	Pierce
PVDF membran	Milipore
Page ruler plus prestained Ladder	Fermentas
Amonyum persülfat	Merc
Nuklear fraksiyon kiti	Thermo scientific

Tablo 2.9: Kullanılan Antikorların İsimleri ve Temin Edildikleri Firmaların Adları

Antikor adı	Antikor tipi	Temin edilen firma ve katalog no
Human URG-4 Rabbit poliklonal antikor	Primer	Sigma/ SAB2104235
Human anti-URG-4 Rabbit poliklonal antikor	Primer	Abcam / ab103323
Human anti-Beta aktin Rabbit poliklonal antikor	Primer	Abcam / ab8227
Smad 2-3 mouse monoklonal antikor	Primer	Santa cruz/ sc-133098
Sp1 Antikor rabbit polyklonal	Primer	Santa cruz/ sc-59
Goat pAB to Rb IgG antikor	Sekonder	Abcam / ab97069
Goat Antimouse IgG/HRP	Sekonder	Santa cruz
Alexa flour 488 anti rabbit antikor	Sekonder	Life Technologies

2.3 Klonlama ile ilgili teknikler

2.3.1 Hep3B Hücrelerinden Genomik DNA izolasyonu

Tablo 2.10: Hep3B hücrelerinden DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Proteinaz K 10mg/ml	0,01 g Proteinaz K 1 mL dH ₂ O'da çözülür. -20°C'de saklanır.
Sature Amonyum Asetat (NH₄Ac)	74 g NH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda yaklaşık 40°C'de çözülür. Filtrasyon ile steril edilir. +4 °C'de saklanır.
Nüklei Lizis Buffer	10 mM Tris Base, 400 mM NaCl, 2mM Na ₂ EDTA (pH:8.2). 121°C'de 20 dk (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edilir. +4°C'de saklanır.

75 cm² flasklarda yetiştirilmiş olan Hep3B hücreleri Tripsin-EDTA (TE) çözeltisi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra üzerine % 10 FCS'li medyum eklenerek 3.500 rpm'de 5 dk boyunca çöktürüldü. Üstteki medyum dikkatlice uzaklaştırılarak çökelti üzerine 250 µL nüklei lizis tamponu, 20 µL %10

SDS ve 20 µL proteinaz K eklendi ve tüp alt üst edilerek karışması sağlandı. 1.5 mL ependorf tüp 72°C su banyosunda 10 dk inkübe edildi ve ardından 175 µL amonyum asetat çözeltisi eklenerek 30 sn süresince çalkalandı. Oda ısısında 15 dk bekletilen örnekler 4.500 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant temiz bir ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 2 katı oranında % 96'lık etanol eklendi. Ependorf yavaşça alt üst edilerek DNA'nın belirlediği gözlemlendi. 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj basamağından sonra çökelti üzerine 250 µL % 75'lik etanol eklenerek DNA yıkandı. 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra çöken pelet (DNA) açık havada kuruması için bekletildi. Bu aşamadan sonra 100 µL steril dH₂O'da çözülerek -20°C'de saklandı [56]. Basamaklarda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı Tablo 2.10'da belirtildiği gibidir.

2.3.2 DNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen DNA 1:40 oranında steril dH₂O ile sulandırıldı. Kuvartz 96 kuyucuklu plaka kullanılarak A₂₆₀ ve A₂₈₀ dalga boylarında absorbans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlendi. DNA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı [57].

$$\text{DNA miktarı} = 50\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/ml DNA}$$

2.3.3 Agaroz Jel Elektrofrezinde DNA'nın görüntülenmesi

Tablo 2.11: Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Çözeltinin Adı	Hazırlanışı
5X/L TBE tamponu pH:8.0	54 g Tris Base, 27,5 g Borik Asit, 20 mL 0,5 M EDTA (pH:8.0) tartılır. Üzeri dH ₂ O ile 1 L'e tamamlanır.
DNA ladder 500µL DNA ladder (0.5 µg/µL)	100 µL DNA ladder (50 µg)(1 hacim), 200 µL yükleme boyası (2 hacim) 200 µL steril dH ₂ O'da (2 hacim) çözülür.
% 0.8'lik agaroz jel	0,4 g agaroz tartılarak 50 mL 0,5 X TBE'de çözülür. 40 – 45°C'ye soğuduktan sonra 2,5 µL etidyum bromür eklenerek tanka dökülür.
Et-Br Stok Solüsyonu: (10 mg/mL)	10 mg/mL olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlanır. Koyu renkli ışık geçirmeyen bir şişede muhafaza edilir.

DNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla % 0,8'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla jel elektroforezi aparatına uygun miktarda 0,4 g agaroz tartılarak TBE tamponunda (0,5X) çözüldükten sonra kaynatıldı. 45-50°C 'ye kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyon 0,5 µg/mL olacak şekilde Et-Br eklendi. Et-Br 'ün iyice karışması sağlandı. Tarakların önceden yerleştirilmiş olduğu agaroz jel elektroforezi aparatına jel döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılıp aparat elektroforez tankına yerleştirildi. 0,5 X TBE tamponu ile elektroforez tankı dolduruldu. Örnekler yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. 80 V'ta yürütülerek transilluminator jel görüntüleme sisteminde görüntülendi ve değerlendirildi. Yapılan PCR denemeleri de aynı şekilde jel elektroforezi kullanılarak yürütüldü [58]. Bu aşamada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 2.11'de gösterildiği gibidir.

2.3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tablo 2.12: PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)'da kullanılan dNTP karışımının hazırlanışı

Malzemenin Adı	Hazırlanışı
dNTP karışımı (10mM)	Her bir nükleotitten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 µL alınır ve steril dH ₂ O eklenerek 100 µL'ye tamamlanır.

Çoğaltılan bölgeye spesifik olarak tasarlanmış ve 100 ng/µL sulandırılmış olan primerlerden 1 µL olacak şekilde kullanıldı. 1 ve 2 mM olacak şekilde MgCl₂ konsantrasyonları denendi. Son hacim 50 µL; 10 X Taq+KCl tamponundan 5 µL, 5 U/µL Taq polimeraz enziminden 1 µL, 10 mM dNTP stoğundan (Tablo 2.12) 1 µL koyularak karışım hazırlandı. Aynı zamanda URG-4 promotor bölgesi oldukça GC zengin olduğundan bu materyallere ek olarak çeşitli PCR kitleri ve PCR güçlendiricileri kullanıldı. 7-deazaGTP 0,5 µL (50 µM), Betain 13 µL, DMSO 2.5 µL (%5) eklenerek 21.5 µL dH₂O ile tamamlandı. Kullanılan PCR döngü koşulları Tablo 2.13'de verildiği gibidir [59,60].

Tablo 2.13: Promotor PCR döngü koşulları

Segment	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	1	94	3 dk
2	35	94	1 dk
		58-60	45 sn
		72	1 dk
3	1	72	10 dk

2.3.5 Jelden DNA'yı geri saflaştırma

Bu aşamada Fermentas™ marka jelden geri purifikasyon kiti kullanıldı. PCR sonucunda elde edilen ve jel elektroforezinde görüntülenen DNA parçaları fazla UV ışığına maruz bırakmamak koşuluyla kesilerek gramajı belli olan 2 mL ependorf tüpleri içerisine alındı. Kitin içeriğinde bulunan bağlama tampon içerisinde önerdiği miktarda (Örn: 100 mg jel 100 µL bağlama Tamponu) 50°C-65°C arası sıcaklıkta inkübe edilerek jelin tamamen erimesi sağlandı. Tamamen erimesi gerçekleştiğinde solüsyonun 700 µL'si kolona yüklendi. 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj yapıldı. Bu işlem solüsyonun tamamı bitinceye kadar tekrarlandı. Kolonun altında biriken süzüntü atıldı. Aynı kolon içerisine 500 µL yıkama tampon koyuldu ve 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj gerçekleştirildi. Süzüntü atıldı. Aynı işlem bir kere daha tekrar edildi. Kalan etanol kirliliğinden kurtulmak için kolon boş olacak şekilde 1 dk 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Elüsyon amacıyla kolon yeni bir ependorf tüpü içerisine alındı. Ilıtmış olan 40 µL dH₂O içerisine elüent alındı.

2.3.6 Ligasyon

Jelden geri saflaştırdığımız promotor parçalarının 3' ucunda taq polimeraz enziminin eklediği poli A kuyruğu bulunmasından dolayı lineer vektör olan ve 3' ucunda poliT kuyruğu içeren pGEM-T Easy (Promega) vektörüne klonlama işlemleri ligasyon ile gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin pGEM-T Easy vektör sistemi'ne ligasyonu 20 µL son hacme 10X ligasyon tamponundan 2 µL (1X), 50 ng/µL'lik pGEM T Easy vektörden 1µL, ~100 ng/µL jelden kazanılmış DNA (16 µL) ve 3U/µL'lik T4 DNA ligaz enziminden 1 µL eklenerek yapıldı. Alt klonlama için pMetLuc (CLONTECH) vektörüne ligasyon işlemleri spesifik enzimlerle kesilmiş ve jelden geri saflaştırılmış promotor DNA'sı miktarı değiştirilerek, 20 µL son hacimde 10 X ligasyon tamponundan 2 µL(1X), 50 ng/µL'lik pMetLuc vektörden 3 µL, ve 3 U/µL'lik T4 DNA ligaz enziminden 2µL eklenerek yapıldı. Ligasyon reaksiyonları +4°C 'de 16 saat inkübasyona bırakıldı [58].

2.3.7 Kanamisinli veya Ampisilinli Luria Broth ve Agar Petrilerinin Hazırlanması

LB agar üretici firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O 'da çözülerek hazırlandı. 121 °C 'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra 50 mg/mL kanamisin stoğundan, son konsantrasyonu 30 µg/mL veya 100 mg/mL ampisilin stoğundan 100 mg/mL olacak şekilde eklendi. Köpürmeyecek şekilde karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Petrilerin etrafı parafillenerek +4 °C buzdolabına ters çevrilerek ve ışık almayacak şekilde muhafaza edildi.

Luria broth firmanın önerdiği şekilde tartılarak 1000 mL dH₂O'da çözüldü ve 121 °C 'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi.

2.3.8 DH5α Hücrelerinin Kompetant(Alıcı) Hale Getirilmesi

Klonlamada kullanılacak DH5α hücreleri bir gece önceden 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapılarak 37°C 'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. 100 mL taze LB sıvı besiyeri içerisine önkültürden 5 mL inoküle edildi. OD₆₀₀ = 0.5- 0.6 değerleri arasına ulaşınca bakteri süspansiyonu 4°C 'de, 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bakteri süspansiyonu ile eşit hacimde 0,1 M CaCl₂ solüsyonundan eklendi ve mikro pipet yardımıyla dikkatlice karıştırılarak pelet çözüldü. 25 dk buz üzerinde beklemeye bırakıldı. 3000 rpm'de 5 dk, 4°C 'de santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti başlangıç hacminin 1/10'i kadar hacimde 0,1 M CaCl₂ ile tekrar çözüldü ve 1-4 saat buz üzerinde bekletildi. Eşit hacimde %40'lık gliserol eklenerek dikkatlice karıştırıldı. Buz üzerinde bekleyen ependorflara paylaştırılarak -80°C 'de derin dondurucuda saklandı [58].

2.3.9 Transformasyon

Her ligasyon reaksiyonu için 2 adet kanamisinli LB Agar petri hazırlandı. Kompetant hücreler -80 °C 'den çıkarılarak buza kondu ve 5 dk çözünmesi beklendi. Transformasyon tüpüne 5 µL ligasyon reaksiyonu ve 50 µL kompetant hücre eklendi. Buzda 40 dk inkübasyona bırakılan hücreler daha sonra 42°C 'ye ayarlanmış su banyosunda 90 sn çalkalanmadan tutularak ısı şokuna tabi tutuldu ve takiben 2 dk buzda bekletildi. Bu sürenin bitiminde, önceden 37°C 'ye ılıtılmış olan LB medyumdan 950 µL eklenerek 1,5 saat 37 °C 'de çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. Bu sürenin sonunda transformasyon kültürününün 150 µL'si petrilere yayıldı. Artan transformasyon kültürü 3.000 rpm 'de 5 dk santrifüjlenip 100 µL LB medyumda çözülmek suretiyle tekrar petriye yayıldı. 15-20 dk petrilerin yayılan transformasyon kültürünü emmesi beklendi. Daha sonra petriler ters çevrilerek 37°C'deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerin rekombinant olup olmadığı, bu kolonilerden izole edilen plazmitin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonrasında belirlendi [61].

2.3.10 Gliserol Stok Hazırlanması

30 µg/mL kanamisin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak önkültür hazırlandı. %30'luk steril gliserol çözeltisi hazırlandı. Bek alevi yanında ependorflara önkültür ile eşit hacimde gliserol çözeltisi eklenerek -80°C'ye kaldırıldı [62].

2.3.11 Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Son hacmi 20 µL olacak şekilde 4 µg plazmit, NEB XhoI ve HindIII enzimleri 1U/µL, 1X NEB tampon veya fermentas 1X R tamponu, % 10 BSA (Eğerki NEB stratejisi kullanılmışsa) ve dH₂O ile tamamlanarak kesim işlemi 37°C'de bir gece boyunca bekletilerek yapıldı [62].

2.3.12 Küçük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Bir gece 37°C'de çalkalayıcı etüvde inkübe edilmiş önkültür 2 mL'lik ependorflara paylaştırılarak 8000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendi. Total olarak 6 mL önkültürden elde edilmiş çöküntü GeneJet Plazmit minprep™ kitinin önerdiği şekilde 250 µL resüspanسیون tamponunda çözüldü. 250 µL lizis tamponu eklenerek vizkoz ve sümüksü yapının oluşması sağlandı. Bunu takiben 350 µL nötralizasyon tamponu eklenerek beklemeden en yüksek devirde (13.500 rpm) 5 dk süresinde santrifüjlendi. Süpernatant dikkatlice Genejet kolona yüklendi ve 13.500 rpm'de santrifüj yapıldı. Bu işlem süpernatant bitinceye kadar tekrar edildi. Kolona 500 µL yıkama tamponu yüklendi. 1 dk santrifüj yapıldı. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı ve etanol kalıntılarında kurtulmak amacıyla kolon bir kez daha boş olarak santrifüjlendi. Son olarak kolon yeni bir ependorf tüpüne alındı ve 40 µL dH₂O içerisine elüsyon alındı [63].

2.3.13 Büyük Ölçekli Plazmit İzolasyonu

Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan endotoksinlerden arındırılmış, temiz ve yüksek konsantrasyonda plazmit DNA'sının saflaştırılmasında büyük ölçekli plazmit izolasyonu stratejisi uygulandı. Genejet Fermentas maxiprep kitinin™ önerdiği şekilde yapıldı [64].

2.3.14 Fenol-kloroform ve Etanol Presipitasyonu

Kesim reaksiyonundan sonra DNA'yı saflaştırabilmek için kullandığımız bu prosedürde son hacmin 1/10 kadar sodyum asetat çözeltisi (Tablo 2.10) eklendi ve iyice karıştırıldı. 2 veya 2,5 katı soğuk % 96'lık etanol eklenerek tekrar karıştırıldı. -20°C buzdolabında 2 saat beklettikten sonra 15 dk 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra pelet 1 mL % 70'lik etanolde çözüldü. En yüksek devirde 15 dk santrifüj aşamasından sonra pelet açık havada kuruması için bekletildi. Kuruduktan sonra 50-30 µL dH₂O'da iyice çözüldü [58].

2.4 Hücre Kültürü ile ilgili Teknikler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmaların adları Tablo 2.5'de belirtildiği gibidir. Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması işlemleri sırasında Tablo 2.14'de verilen çözeltiler kullanılmaktadır.

Tablo 2.14: Hücre Kültürü çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Çözeltinin Adı	Hazırlanışı
Tripsin-EDTA	0,25 g tripsin 0,2 g EDTA 100 mL dH ₂ O/1XPBS içerisinde çözülür ve 0,22 µm filtreler yardımıyla süzülür. - 20°C'de saklanır.
1X PBS	Önerilen miktarda PBS tableti dH ₂ O içerisinde çözülerek hazırlanır. 121°C'de 20 dk otoklavlanarak steril edilir.

2.4.1 Hücre kültürü Besiyerinin Hazırlanması

Hücre Kültürü deneylerinde kullanılan hücre hatları için ticari olarak temin edilen DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı. Glutamin içeren besiyeri içerisine FCS %10 olacak şekilde eklenerek kullanıldı.

2.4.2 FCS veya FBS (Fetal Sığır Serumu)'nin hazırlanması

Stok serum ilk kullanımdan önce 56 °C 'de 1 saat ısı ile inaktive edildi. 0,22 µm 'luk filtreden geçirilerek steril edildikten sonra kullanıldı. -20 °C 'de muhafaza edildi.

Gibco firmasından temin ettiğimiz FCS +4°C'de bir gece bekletilip tamamen eridikten sonra 56 °C'de 1 saat ısı ile inaktive edildi.

2.4.3 -80 °C Derin Dondurucuda Stoklanan Hücrelerin Açılması

Su banyosu önceden 37°C'ye ayarlanarak çalışmada kullanılacak olan DMEM ve FCS su banyosunda ılıtıldı. Hücre soyu ile çalışmaya başlanılmadan en az yarım saat önce steril kabin çalıştırıldı. % 70'lik teknik alkol ile steril kabinin iç yüzeyi temizlendikten sonra ılıtılan FCS ve medyumun dış yüzeyleri % 70'lik alkol ile temizlenerek steril kabin içine alındı. Kullanılacak olan medyuma % 10 oranında FCS, filtreden geçirilerek eklendi. -80°C derin dondurucudan çıkarılan hücre hatları su banyosunda çözüldükten sonra pastör pipeti yardımıyla falkon içindeki medyuma aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti belli bir miktar taze medyumda çözülerek eşit oranda flasklara paylaştırıldı. Daha sonra gerekli miktarda medyum hücrelerin paylaştırıldığı flaskların içine eklendi. (75 cm² flasklar için 15 mL ve 25 cm² flasklar için 5 mL). Hücreler % 5 içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörün içinde büyümeye bırakıldı.

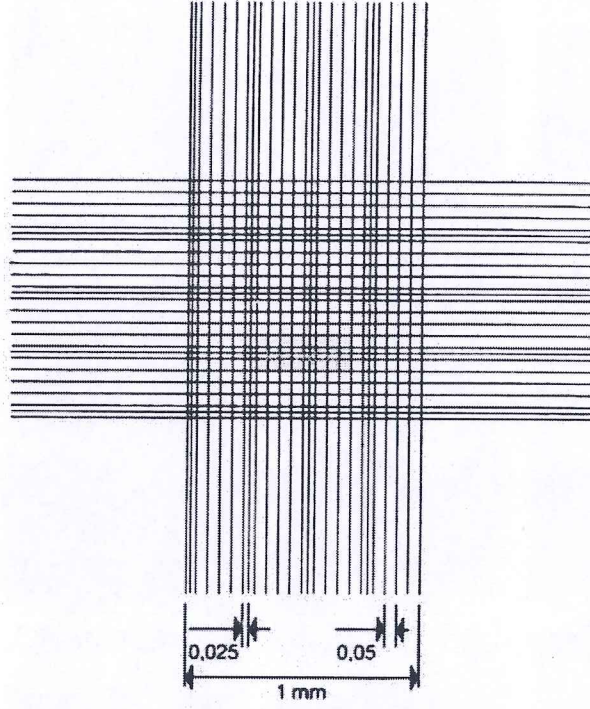
2.4.4 Hücrelerin Pasajlanması

Flask içinde %80 sıklıkta olan hücreler pasajlandı. Bu amaçla flask içindeki süspansiyon hücre kültürü falkona aktarılarak 1000 rpm 'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan medyum uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücre pelleti belirli miktarda taze medyumda (%10 FCS içeren) çözüldü. Hücre süspansiyonu flaslara eşit olarak paylaştırıldıktan sonra gerekli miktarda medyum flaslara eklenildi.

2.4.5 Hücre Sayımının Yapılması

RNA izolasyonu için yeterli miktarda hücreyi alabilmek için Tripan Mavisi ve Toma Lamı yardımıyla hücre sayımı yapıldı. Bu işlem için ilk olarak flaskın içeriği falkona aktarıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Üstte kalan pelet uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücre pelleti 6 mL medyumda çözüldü. Hücreler falkonda homojen bir şekilde çözüldükten sonra hücre süspansiyonundan 30 µL alınarak bir ependorfa koyuldu. Aynı ependorfa 30 µL Tripan Mavisi eklendikten sonra 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Pipetaj yapılarak hücrelerin ependorfta homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra Bu karışımdan 10 µl alınarak Şekil 2.6'da gösterilen Toma lamına aktarıldı. Mavi renge boyanan hücreler ölü olduklarından sayıma dahil edilmedi. Görüntü alanındaki canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Sayım sonucu 1 mL'deki hücre miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

1 mL'deki hücre sayısı = Alanda sayılan hücre miktarı x 10⁴ x Seyreltme faktörü



Şekil 2.6: Toma Lamı

2.4.6 Belirli Sitokinlerin Ekspresyon Deneylerinde Kullanılmak Üzere Hep3B ve PC3 Hücreleri Üzerine Uygulanması

Tablo 2.15: Kullanılan Sitokinlerin Adları ve Katalog Numaraları

Sitokin Adı	Temin edildiği firma	Katalog numarası
TGF- β	Invitrogen/Gibco	483184S
TNF- α	Invitrogen/Gibco	300/01A

mL'deki hücre sayısı hesaplandıktan sonra 25 mL'lik flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde % 0,1 BSA içeren DMEM ile paylaşırma işlemi yapıldı ve 24 saat sonra hücreler % 0,1 BSA içeren medyum ile tazelendi. Daha sonra her bir flaska 10 Ü/mL, 100 Ü/mL, 200 Ü/mL ve 500 Ü/mL TGF- β ve TNF- α sitokinleri ayrı ayrı uygulandı. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72. saatler sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Peletler -80°C'de daha sonra RNA izolasyonunda kullanılmak üzere saklandı. Hepatoma olmayan hücre modeli olarak seçilen PC3 (Prostat kanseri) hücreleri ise BSA'lı medyuma karşı dayanıksız olup öldükleri için serum açlığı FCS miktarı %3'e düşürülerek sağlandı.

2.4.7 Transfeksiyon Çalışmaları

Tablo 2.16: Transfeksiyon aşamasında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Adı	İçeriği	Marka
2 mM CaCl ₂	14,7 g tartılır, 50 mL'ye dH ₂ O ile tamamlanır. Otoklav yapılır, filtre edilir. +4 °Cde saklanır.	J.T Baker
2X Hepes (pH:7,05 – 7,12)	1,6 g NaCl, 0,04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,3 g HEPES tartılarak 100 mL'ye dH ₂ O ile tamamlanır. olmalıdır. Otoklav yapılır, filtre edilir.-20 °C de saklanır	Sigma
Ready to glow Dual Secreted Reporter Assay kiti™	10X Substrat stok solüsyonu, Reaksiyon tampon, 5X dilüsyon Tamponu, Seap substrat solüsyonu	Clontech Laboratories
Fugene HD™	FuGENE® HD Transfeksiyon ajanı	Promega

2.4.7.1 Kalsiyum-fosfat Geçici Transfeksiyon Deneyleri

Bu çalışma için öncelikle Hep3B hücreleri 12 kuyucuklu plakalara 250,000 sayıda olacak şekilde paylaştırıldı ve bir gece boyunca inkübatörde bekletildi. Transfekte edilecek DNA ve 2 M CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2X HEPES eklenerek yarım saat presipitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA:Kalsiyum fosfat presipitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Plaka hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon medyumunu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze % 10 FCS'li medyum eklendi. 48 saat sonra hücreler medyumunu alınarak promotor aktivitesi lusiferaz ve seap aktivitesine bakılarak belirlendi [58]. Bu aşamada kullanılan çözeltiler Tablo 2.16'da verildiği gibidir.

2.4.7.2 Lusiferaz ve Seap Aktivitesinin Belirlenmesi

İnsan URG-4 genine ait 5' ucu kısaltılarak oluşturulmuş promotor parçalarının bazal aktivitesini belirlemek amacıyla Dual-core lusiferaz reporter assay kiti™ (Clontech) içerisinde bulunan 10 X substrat tamponu, Reaksiyon tamponu ile 1/10 oranında sulandırılarak kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalara transfeksiyon medyumundan 50 µL alındı ve 5 µL 1X Substrat/Reaction tamponundan eklendi ve sonuçlar luminometrede okundu. Seap aktivitesi için ise öncelikle 96 kuyucuklu plakalara 25 µL hücre kültürü medyumunu eklendi. 5 X dilüsyon tampon 1X'e ddH₂O ile dilüe edildi ve 75 µL 1Xdilüsyon tampon örnekler eklendi ve plaka aliminyum folya ile sarılarak 65⁰C'de 30 dk bekletildi. 2-3 dk buzda bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirildi. Oda sıcaklığına getirilmiş olan SEAP substrat solusyonundan 100 µL eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 10-60 dk (ortalama 30 dk) bekletildi. İşlem sonunda plaka luminometrede okutuldu. Elde edilen değerler Microsoft excel programı kullanılarak değerlendirildi [65]. Çalışma 384'lük plakalarda okuma gerçekleştirmek için 10 kat seyreltilerek okuma gerçekleştirilecek şekilde optimize edildi.

2.4.7.3 Kalıcı transfeksiyon Çalışmaları

2.4.7.3.1 Vektörün Linerizasyonu

Son hacim 120 µL olacak şekilde, 12,5 µL (50 µg) pCDNA3.2 boş vektörü™, B tamponu 12 µL (1X), XbaI enzimi (10 Ü/ µL) 10 µL ve Apa I enzimi (10 Ü/µL) 5 µL koyularak reaksiyon dH₂O ile tamamlandı. URG-pCDNA3 vektörü ise 50 µg plazmit DNA içerecek şekilde XbaI enzimi kullanılarak tango tampon içerisinde son hacim 100 µL olarak gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.14'de anlatıldığı şekilde etanol presipitasyonu yöntemiyle DNA saflaştırıldı.

2.4.7.3.2 Fugene HD™ ile Transfeksiyon

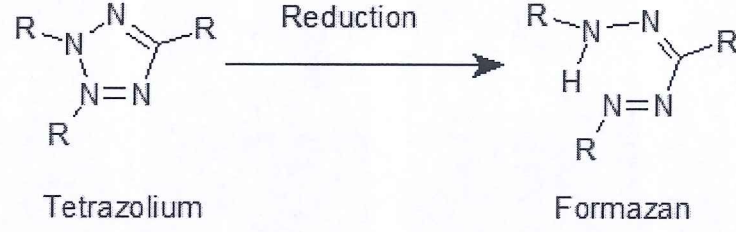
Saos-2 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 500.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Bir gece 37°C’de hücreler inkübe edildikten sonra kuyu başına 2 µg plazmit DNA’sı (pCDNA3 ve URG-pCDNA3), 6 µL Fugene-HD™ reagent içeren 200 µL DMEM karışımı hazırlandı ve kuyucuklara uygulandı. Genetisin (G418) antibiyotiği ile transfekte olan hücreler seçildi. Genetisin™ konsantrasyonu transfeksiyon ertesi gününde ilk önce, 800 µg/mL uygulandı. 2 hafta boyunca 3 günde bir aynı doz uygulamaya devam edildi. Bunu uygularken transfeksiyon yapılmamış hücreler de kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Plazmit içermeyen hücreleri öldüren bir doz uygulanarak, taşıyan hücreler seçilmiştir. Sonra, 600 µg/mL Genetisin™ antibiyotiği içeren medyumla hücreler yetiştirilmeye devam edildi. Bu antibiyotik konsantrasyonu her hücre için optimize edilmelidir.

2.4.8 Sitotoksisite Deneyleri (MTT)

Tablo 2.17: Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Çözeltinin Adı	Hazırlanışı
MTT solüsyonu	5 mg/mL olacak şekilde steril PBS içerisinde çözülerek hazırlanır. +4 °C’de muhafaza edilir.
0,004 M HCl içeren izopropanol	500 mL izopropanol (2- Propanol) son hacim içerisine 210 µL HCl eklenir. Oda sıcaklığında saklanır.

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntem olan MTT metodu canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan MTT 'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır.



Şekil 2.7: MTT metodunda gerçekleşen kimyasal değişim

Öncelikle hücreler 24 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 250.000 hücre olacak paylaştırıldı. Bir gece inkübatörde inkübe edilip hücreler tutunduktan sonra 10 Ü/mL, 100 Ü/mL, 200 Ü/mL, 500 Ü/mL olacak şekilde TNF- α ve TGF- β sitokini uygulandı. Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücrelerin bulunduğu ortama, optimizasyon sonucu belirlenen son konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat 37°C, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırıldı. 0,004 M HCl içeren izopropanol ile kristaller çözüldü ve UV spektro okuyucu ile 550 nm dalga boyunda absorbans alındı. Sonuçlar Microsoft excel programı kullanılarak grafiklendirildi [66,67].

2.4.9 Koloni Formasyon Deneyi

Hep3B hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 2,000 ve 3,000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Bu plakalara 1 µg URG-pCDNA vektörü ve 1 µg boş pCDNA vektörü geçici kalsiyum fosfat transfeksiyon metodu uygulanarak transfekte edildi. Transfeksiyon aşamasından iki hafta sonra hücreleri içeren kuyular PBS ile yıkandı ve metilen mavisi boyası kullanılarak boyandı. Saf su ile yıkanarak boya uzaklaştırıldı. Plakalar invert mikroskop kullanılarak (20 X'lik büyütme) görüntülendi. Sonuçlar IMAGE J programı kullanılarak analiz edildi.

2.4.10 İnhibisyon Deneyleri

Tablo 2.18: Kullanılan inhibitörlerin Adları, Hazırlanışı ve Temin edilen firmaların adları

Adı	Stok hazırlanışı	Temin edilen Firma
Wortmanin	1 mg Wortmanin 1160 μ L DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20°C 'de doku kültürü buz dolabına konuldu. Ana stok 2mM olarak hazırlanmış oldu.	Cell Signalling
Sikloheksimid	1 g olarak satın alınan cycloheksimid'den 0,01 g tartıldı ve 1 mL suda çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20°C 'de doku kültürü buz dolabına konuldu. Ana stok 1 mg/mL olarak hazırlanmış oldu.	Santa Cruz
Sp600125 (JNK inhibitörü)	Ana stok 20 mM olacak şekilde DMSO'da çözülerek hazırlandı.	Sigma
MekI (Mek inhibitörü)	1,5 mg olarak satın alınan MEK1 280 μ L DMSO içerisinde çözüldü. Daha sonra ependorflara bölünerek -20°C 'de doku kültürü buz dolabına konuldu. Ana stok 20mM olarak hazırlanmış oldu.	Sigma

PI3K yolağının inhibitörü wortmannin, MAPK/ERK yolağı inhibitörü MEKI ve JNK yolak inhibitörü SP600125 kullanıldı. Hep3B hücreleri 6 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı ve plakaların yüzeyine tutunmaları için bir gece 37°C inkübatörde bekletildi. 2 mM wortmannin stoğundan 1 μM , 20 mM MEKI stoğundan 10 μM ve 20 mM SP600125 inhibitöründen 20 μM olacak şekilde kuyucuklara uygulandı. Uygulamadan 6 saat sonra protein lizati için hücreler Laemli tamponu

içerisinde kazındı. RNA peleti için ise Tripsin/EDTA (TE) ile hücreler kaldırıldıktan sonra santrifüjlendi. Daha sonra kullanılmak üzere -80°C’de saklandı.

2.5 RNA ile ilgili Teknikler

2.5.1 RNA İzolasyonu

-80’de pellet olarak bekletilen Hep3B hücre hattından Fermentas Gene jet RNA izolasyon kitinin™ önerdiği şekilde RNA izolasyonu yapıldı.

Başlamadan önce lizis tampon içerisine β -merkaptotanol veya DTT eklenmesi gerekmektedir. 1mL lizis tamponu için 20 μ L 14,3 M β -merkaptotanol veya 2 M DTT eklendi. Pelet halindeki hücrelere, her bir örnek için 600 μ L Lizis tampon eklendi. 10 sn vorteks yapıldı. Daha sonra 360 μ L etanol (% 96-100) eklenerek pipetaj yapıldı. Kolonlar hazırlandı. Maksimum 700 μ L lizat kolona aktarıldı. 13.500 rpm’de 1 dk çöktürüldü. Çökelti atıldı. Bütün lizat bitene kadar aynı kolonda örnekler çöktürüldü. Kolon, 2 mL’lik yeni ependorfa yerleştirildi. 700 μ L yıkama tampon 1 eklendi. 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. Çökelti atıldı. 600 μ L yıkama tamponu 2 eklendi. 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı ve çökelti atıldı. 250 μ L yıkama tampon 2 eklendi. 13.500 rpm’de 2 dk santrifüj yapıldı. Kalan etanolün uzaklaştırılması için ependorflar ilave 1 dk 13.500 rpm’de santrifüjlendi. Kolon yeni bir ependorfa içerisine alındı. 35-40 μ L steril dH₂O eklenerek 2 dk inkübasyona bırakıldı. 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldı. RNA’lar elüsyon alındıktan sonra beklemeden buza alındı. RNA’lar -80°C dolapta muhafaza edildi.

2.5.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA 1:40 oranında RNaz içermeyen dH₂O ile sulandırıldı. Kuvartz 96 kuyucuklu plaka kullanılarak A₂₆₀ ve A₂₈₀ dalga boylarında absorbans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak RNA’nın saflığı belirlendi. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Aynı zamanda bazı RNA’ların miktarları qubit cihazı ve standartları kullanılarak belirlendi.

$$\text{RNA miktarı} = 40\mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL RNA}$$

2.5.3 RNA Jel elektroforezi

Tablo 2.19: RNA jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

Tamponun Adı	Hazırlanışı
FA jel tamponu	0,2 M MOPS pH:7,0 0,05 M EDTA pH:8,0 0,01 M NaAc pH: 7,0 DEPC'li su ile 1 L'ye tamamlanır.
FA tank tamponu	10 X FA jel tamponu 100 mL (1X) % 37'lik 12,3M Formaldehit 900 μL koyularak DEPC'li su ile 1L'ye tamamlanır.

İzole edilen RNA örnekleri RNaz enziminin etkilerine karşı açık olduğundan kullanılan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırıldı. Cam malzemeler % 0,1 DEPC içeren suda 12 saat bekletildikten sonra otoklavlandı. Elektroforez tankı % 0,5'lik SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi ile yıkandı. RNaz içermeyen su ile durulandı. Saf etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

Jelin yapımı için 0,5 g agaroz tartılıp 10 X'lik jel tamponunda çözüldü. RNaz içermeyen steril dH_2O ile 50 mL 'ye tamamlandı. Jel kaynatıldıktan sonra 50°C 'ye kadar soğuması beklendi. % 37'lik (12,3 M) formaldehitten 0,9 mL eklendi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. 10 mg/mL Et-Br stok solüsyonundan 1 μL eklendi. Jel elektroforezinin kasetine uygun büyüklükteki taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel kasete döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi. RNA örnekleri önce 70°C 'de 10 dk ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dk buzda bekletildi. Örnekler jele yüklenerek 1X FA Jel tamponu içerisinde 80 V'ta 40 dk yürütüldü.

2.5.4 Revers Transkriptaz (RT)-Reaksiyonu

Fermentas reaksiyon tamponu, oligodT, ribolock inhibitörü, dNTP ve reverse transkriptaz bileşenleri önerildiği miktarlarda kullanılarak cDNA sentezi

gerçekleştirildi. RT reaksiyonunun birinci basamağı son hacim 12,5 µL olacak şekilde; 1µL Oligo dT primer (200 pmol), 1 µg/mL olacak şekilde RNA kalıbı ve dH₂O ile tamamlanarak gerçekleştirildi. 70°C 'de 5 dk ön inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon tüpüne 4 µL (1X) 5X Reaksiyon tamponundan, 25 U/µL ribolock inhibitör stoktan 5 µL (20 Ü/mL), 10 mM dNTP karışımı stoğundan 2 µL (1mM), 1 µL reverse transkriptaz eklenerek RT'nin ikinci basamağı gerçekleştirildi. Bu bileşenler ilave edildikten sonra 25°C'de 5 dk, 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan cDNA'lar daha sonra kullanılmak üzere -80°C buzdolabında muhafaza edildi.

2.5.5 Semi quantitative (Sq) RT-PCR

cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak URG-4 genine spesifik ekspresyon primerleri ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. 50 µL'lik total hacimde 1 µL cDNA, 2,5 mM MgCl₂, 1X KCl reaksiyon tamponu, 5 Ü/mL taq polimeraz ve 100 ng/µL URG-4 spesifik primerler eklenerek gerçekleştirildi. Başlangıç denatürasyon basamağı 94°C 2 dk; 28-30-32 döngü 94°C 30 sn, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn; uzama basamağı 72°C 5 dk programda olacak şekilde PCR gerçekleştirildi.

Normalizasyon amaçlı aynı reaksiyon bazı çalışmalarda insan β-mikroglobulin, β-aktin ve GAPDH primerleri kullanıldı.

β-mikroglobulin geni için program 94°C 2dk; 19 döngü 94°C 60 sn, 60°C 30 sn, 72°C 45 sn; uzama basamağı 72°C 5 dk olacak şekilde çalıştırıldı. β-aktin primerleri için PCR programı 94°C 2 dk; 19 döngü 94°C 30 sn, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn; uzama basamağı 72°C 5 dk uygulandı.

GAPDH primerlerinin kullanıldığı PCR programı β-aktin primerleriyle aynı olup Tm derecesi değiştirilerek uygulandı. 20 µl sabit hacimde % 2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Kullanılan normalizatör primerleri Tablo 2.20'de verildiği gibidir.

Tablo 2.20: Normalizatör Amaçlı Kullanılan Primerlere Ait Bilgiler

Normalizatör primerler	Dizisi (5'-3')	Ürün (bp)
URG-4	F CTTTCATCCTGAGTCCCTACCG R GCCGTTCTGCTGCATTTCG	472
URG-4 var2	F CAGAGTTAAGAACCACTATTCTCAGGAGTT R CTTCGACCACTAGTCAGCAAGGCC	179
β -aktin	F TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA R CAA GAA AGG GTG TAA CGC AAC	461
İnsan β -mikroglobulin	F TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC R CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC T	315
GAPDH (Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz)	F CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG G R AGT CTT CTG GGT GGC AGT GAT GG	455

2.5.6 qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR)

Real-time PCR çalışmaları 10 μ L son hacimde 5 μ L SYBR® Green PCR Master Mix, 1 μ L cDNA, 100 ng/ μ L 'lik ileri ve geri primerleri stoğundan 0,5'er μ L ve 3 μ L dH₂O kullanılarak yapıldı. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirildi [56]. Buna göre her bir cDNA en az üç tekrarlı olarak ilgili gen ve internal kontrol insan β -mikroglobulin primerleri ile çalışıldı. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. İnternal kontrol genin Ct ortalamasından ilgili genin Ct ortalaması çıkarıldı. Daha sonra elde edilen değer 2'nin üssü olacak şekilde kuvveti alındı. Elde edilen kontrol grubu kendine bölündü ve 1 sayısı elde edildi. Daha sonra ilgili saatte çalışılan deney sonucu kontrol değerine bölündü ve 1'in katı şeklinde sonuçlar elde edildi ve sütun grafiği çizildi.

2.6 Protein ile ilgili Teknikler

Western blotlama tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler Tablo 2.21'de gösterildiği gibidir.

Tablo 2.21: Protein Çalışmalarında Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler

Tampon ve çözeltinin Adı	Hazırlanışı
Laemli Tamponu	0,125 M Tris-HCl (pH:6,8), % 4 (w/v) SDS, % 10 (v/v) Gliserol, % 10 (v/v) β -2-Merkaptoetanol
%10 ayırma jeli tamponu	1,5 M Tris-HCl (pH:8,8), %10 (w/v) SDS.
Üst yığma jeli Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 (w/v) SDS
Yükleme boyası	1,4 g Tris, 4 g SDS, 20 g Sükroz, 4 mg Bromfenol mavisi, pH:6,8'e ayarlanarak 100 mL'ye tamamlanır.
Jel Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 (w/v) SDS
10X TBS(Tris Buffered Saline) Tamponu	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7,4
Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
Boyama çözeltisi	0,25 g Coomassie Brilliant Blue 250, 100 mL % 95'lik Etanol, %10 Asetik Asit
Stripping Tamponu	1 M Glisin, % 1 SDS, pH: 2,5

2.6.1 Western Blotting Metodu ile protein tayini

2.6.1.1 Hücre proteinlerinin Laemli protokolü ile Ekstraksiyonu

İki tip lizat hazırlama işlemi gerçekleştirdik. Bunlardan birincisi, sitokin uygulanmış ve -80°C 'de muhafaza edilen hücre pelletleri ilk olarak soğuk PBS'de çözülerek 4.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet Laemli tamponunda iyice pipetaj ile lizis edildi ve sonra buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Son aşamada ise 13.000 rpm $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk santrifüj yapıldı. İkincisinde ise 6'lı plakalara paylaştığımız hücrelerle yaptığımız deneylerde direk

olarak hücreleri PBS ile iki kez yıkadıktan sonra 500 µL Laemli tamponu koyarak kazıyıcı yardımıyla kazıdık. Kazıdığımız sümüksü hale gelen hücreleri 1,5 mL'lik ependorflara alarak 15.000 rpm'de 5 dk santrifüjledik. Süpernatantı western blotting deneylerinde kullandık.

2.6.1.2 Proteinlerin NE-PER kiti kullanılarak Ekstraksiyonu

75 cm² flask içerisinde % 95 dolu halde olan hücreler Nüklear ve sitoplazmik ekstraksiyon kitinin (NE-PER)TM önerdiği şekilde tripsinizasyon tekniği ile kaldırıldı ve 5.000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. 2.000.000 hücre için 200 µL soğuk CER I solüsyonundan eklendi ve 15 sn vortekslendi. 10 dk buzda bekletildikten sonra 11 µL soğuk CER II eklendi. 5 sn vorteks aşamasından sonra 1 dk buzda bekletildi. 5 sn tekrar vortekslendi ve 5 dk 16.000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant yani sitoplazmik ekstrakt soğuk yeni bir tüpe dikkatlice alındı. -80°C'de muhafaza edildi. Elde edilen pelet soğuk CER solüsyonundan 100 µL eklenerek 15 sn vortekslendi. 10 dk buzda bekletildi. 3 defada daha aynı işlem tekrar edildi. En son aşamada 15 sn vortekslenerek 10 dk 16.000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant yeni bir tüpe dikkatlice alındı. Nüklear ekstrakt olan süpernatant daha sonra EMSA ya da protein deneylerinde kullanılmak üzere -80°C'de 10 µL alikot edilerek muhafaza edildi.

2.6.1.3 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu Qubit (Invitrogen)TM protein deteksiyon kiti ile florimetrik olarak belirlendi. Bu amaçla kitin içeriğinde bulunan protein tamponu (199 µL) ve protein reagent (1 µL) birleştirilerek reaksiyon tamponu oluşturuldu. İlk olarak cihaza protein standartları okutulurken standart eğri oluşturulması sağlandı. Daha sonra reaksiyon tamponu ile protein örneğimiz 40 kat sulandırılarak son hacim 200 µL olacak şekilde hazırlandı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Son konsantrasyon 30-50 µg olacak şekilde jele yüklendi.

2.6.1.4 SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı ve Örneklerin Yürütülmesi

Tablo 2.21’de belirtildiği şekilde % 10 ayırma jeli malzemeleri karıştırılarak hazırlandı. Camlar roche jel yükleme aparatlarına sıkıştırılarak jel dökmek için hazır hale getirildi. % 10 ayırma jeli 1000 µL pipet kullanılarak camların arasından yukarıdan 1 mL kadar boş kalacak şekilde döküldü. Donması için 10-15 dk bekletildi. Sonrasında hazırlanan Üst yığma jeli ayırma jelinin üzerine dökülerek taraklar yerleştirildi ve soğumaya bırakıldı. Son hacim 30 µL’de 5 µL 2X yükleme boyası ve 30-50 µg protein lizati koyularak örnek 100°C’de 5 dk kaynatıldı. Jel kuyucuklarına son hacim 30 µL olacak şekilde yüklendi. İlk 15 dk 90 V akımda daha sonra yaklaşık 1,5 saat 120 V akımda yürütüldü.

Tablo 2.22: SDS-PAGE Jelinin Hazırlanışı

Malzemeler	%10 ayırma Jeli	Üst yığma jeli
%10 ayırma jeli tamponu	2,5 mL	-
Üst yığma jeli Tamponu	-	2,5 mL
Akrilamit Bisakrilamit (37:1)	2,5 mL	1,25 mL
ddH ₂ O	5 mL	6,14 mL
%10 APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

2.6.1.5 PVDF Membrana Transfer ve Antikorlarla Muamele İşlemi

Transfer sandviçi malzemeleri ve membran ise metanolde bir dk aktive edildikten sonra transfer tamponunda ıslatılarak sünger-kurutma kağıdı-jel-membran-kurutma kağıdı- sünger olacak şekilde sıralandı ve transfer tankı içerisine yerleştirildi. Tank transfer tamponu ile dolduruldu ve bir gece boyunca +4°C’de 15V akımda yürütüldü. Daha sonra membran % 5 süt tozu içeren 1 X TBST tamponunda bloklandı. Bloklama işleminden sonra 3’er kez 10’ar dk arayla 1 X TBST tamponu ile yıkandı. 5 µg/mL olacak şekilde URG-4 antikor ve normalizasyon amaçlı 1/5000

dilüsyonda beta aktin antikorunu membranlara uygulandı. Primer antikor ile 1 saat oda sıcaklığında membran muamele edildikten sonra URG-4 için sekonder antikor 1/5000 Antirabbit olacak şekilde, beta aktin için ise 1/5000 Antimouse olacak şekilde yine 1 saat oda sıcaklığında uygulandı ve aynı şekilde membran 3'er kez 10'ar dk arayla 1 X TBST tamponu ile yıkandı.

2.6.1.6 Membranların Oto Radyografi ile Görüntülenmesi

Membranlar ilk olarak ECL substratı ile bir dk süresince muamele edildi ve kasetlere yerleştirildi. Karanlık odada film membran üzerine basıldı ve manual olarak önce develop tamponunda 2 dk, fixer tamponunda 1 dk ve su içerisinde 30 sn bekletildikten sonra kuruması için bekletildi.

2.6.2 İmmunflorasan Metodu ile URG-4 Geninin Hücre İçerisindeki Lokalizasyonunun Belirlenmesi

24 kuyucuklu plakalara (250.000/kuyucuk) PC3 hücreleri eşit olacak şekilde paylaştırıldı. Aynı zamanda bu kuyucuklara yuvarlak lameller yerleştirildi. Sitokin uygulaması yapılacaksa bir gün sonrasında belirlenen konsantrasyonlarda yapıldı. Sitokin uygulamasından 24 saat sonra kuyucuklar 2 kere PBS ile yıkandı. % 4'lük paraformaldehit ile hücreler fiske edildi. Membranların zayıflatılması amacıyla % 0,2 Triton X100 içeren PBS ile 15 dk boyunca muamele edildi. 2 kere PBS ile yıkandı. % 10 BSA içeren PBS ile spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 60 dk bloklama işlemi gerçekleştirildi. PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra 1/50 dilüsyon oranında URG-4 antikoruyla hücreler bir gece boyunca humidity chamber denilen nemlendirilmiş kutu içerisinde +4°C'de inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yıkılarak primer antikor uzaklaştırıldı. Son konsantrasyon 3 µg/mL 488 Alexa flour antirabbit sekonder antikor 30 dk uygulandı. PBS ile yıkama işleminden sonra yuvarlak lameller lamellar üzerine damlatılmış olan mounting medyum üzerine hücreler arada kalacak şekilde kapatıldı. Görüntüler florasan mikroskobu kullanılarak elde edildi [68].

2.7 DNA-Protein Etkileşim Tekniği (EMSA)

2.7.1 Nükleer Ekstrakt Hazırlanması

EMSA tekniği uygulamasında ilk aşama nükleer ekstrakt hazırlama işlemidir. Bu aşamada kullanılan çözeltiler Tablo 2.23’de verildiği gibidir.

Tablo 2.23: Nükleer ekstrakt hazırlanırken kullanılan çözeltiler

TEN solüsyonu	40 mM Tris-HCl (pH:7,5) 1 mM EDTA 150 mM NaCl
A Tamponu	10 mM HEPES (pH: 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, Proteaz Inhibitor Kokteyli (Roche)
C Tamponu	20 mM HEPES (pH: 7,9), 420 mM NaCl, 1,5mM MgCl ₂ , 0,2 mM EDTA, % 25 gliserol 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF Proteaz Inhibitor Kokteyli (Roche).

75 cm² flask içerisinde % 95 doluluğa erişmiş olan Hep3B ve Saos-2 hücreleri 10 mL soğuk PBS ile iki kere yıkandı. 3 mL TEN çözeltisi ile hücreler kaplandı ve 5 dk buz üzerinde bekletildi. Hücreler kazıyıcı yardımıyla süspanse edildi ve 2 ependorfa eşit olarak paylaştırıldı. 14.000 rpm’de 20 sn +4 soğuk santrifüjlendi. Pelet 1,5 mL soğuk PBS ile yıkandı ve 5 dk +4 soğuk olarak santrifüjlendi. Pelet 50 µL A tamponu içerisinde insülin iğnesi kullanılarak lizis edildi. 14.000 rpm’de 20 sn +4°C soğuk santrifüjlendi. Pelet 60 µL C tamponu içerisinde süspanse edildi. 30 dk buzda bekletildi. 14.000 rpm’de 5 dk soğuk santrifüjlendi ve süpernatant 10 µL olarak alikot edilerek daha sonra kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi [58].

2.7.2 EMSA Reaksiyonu

Oligoların etiketlenmesi, birbirine bağlanması, bağlanma reaksiyonlarının kurulması gibi aşamalarda Tablo 2.24’de gösterildiği gibidir.

Tablo 2.24. EMSA çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Malzemenin adı	İçeriği	Markası
Kemiluminesans EMSA kit (LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit)™	10X Bağlanma tamponu, Poli dIdC (dIdC), % 50 Gliserol, ,1 M KCl, 100 mM MgCl ₂ , 200 mM EDTA (pH: 8.0), 5X Yükleme Tamponu	Thermo Scientific
Pierce Biotin 3' Ucu DNA Etiketleme Kiti™	5X TdT Reaksiyon Tamponu, Terminal Deoksinükleotidil Transferase (TdT), Biotin-11-UTP	Pierce
Kemiluminesans Nükleik asit tanıma kiti (Chemiluminescent Nucleic acid Detection module)™	Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroksidaz Konjugat, kemiluminesans Substrat, Luminol/Enhancer Solüsyon, Stable Peroksid Solüsyonu, Bloklama Tamponu, 4X Yıkama tamponu, Substrat Dengeleme Tamponu	Thermo Scientific

2.7.2.1 Oligoların Etiketlenmesi

Kitin içeriğinde bulunan TdT enzimi ilk olarak 2 Ü/mL olacak şekilde reaksiyon tamponuyla sulandırıldı. Reaksiyon son hacmi 50 µL; 5X Reaksiyon tamponundan son konsantrasyonları 1 X, 1 µM oligo 100 nM, 5 µM Biotin 11-UTP 0,5 µM, 2 U/µL dilüe edilmiş TdT enzimi 0,2 U/µL olacak şekilde kuruldu. Reaksiyon 37°C 30 dk inkübe edildi. Sonraki aşamada 0,2 M EDTA (pH:8.0) ekleyerek reaksiyon durduruldu. 50 µL kloroform-izoamil alkol (24:1) tamponu reaksiyondan TdT enzimini uzaklaştırmak için eklendi. 2 dk santrifüj basamağından sonra ayrılmış olan fazlardan üst faz kullanmak üzere temiz bir ependorfa alındı. Etiketlenmiş prob daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

2.7.2.2 Oligoların Bağlanması

Çift zincirli oligo parçaları oluşturmak üzere, oligoların bağlanması işlemi yapıldı. 1 pmol/ μ L olacak şekilde sulandırılmış olan ileri ve geri oligolardan eşit miktarda alınıp reaksiyon 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Primerler oda sıcaklığına geldiğinde daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

2.7.2.3 Poliakrilamit Jel Hazırlanması

Son hacim 6 mL olacak şekilde 600 μ L 5X TBE [0,5 X final], 0,9 mL 40% poliakrilamit solüsyonu [%6 final], 30 μ L % 50 gliserol, 0,6 μ L TEMED, 60 μ L % 10 APS [% 0,25 final] ddH₂O su ile tamamlanarak jel hazırlandı ve döküldü.

2.7.2.4 Bağlanma Reaksiyonlarının Kurulması

Tablo 2.23'de belirtildiği şekilde Saos-2 veya Hep3B nüklear ekstraktı içeren bağlanma reaksiyonları kuruldu. Reaksiyon spesifikliğini belirlemek için bazen yarışma bazende supershift deneyleri gerçekleştirildi. Supershift deneylerinde bu bölgeye bağlandığı düşünülen SP1 antikoru kullanıldı. Reaksiyon 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Oda sıcaklığında beklemiş olan örneklerin üzerine kitin içeriğinde bulunan yükleme boyasından 5 μ L koyularak hazırlanmış olan poliakrilamit jele yüklendi. Jel 100 V akımda yürütüldü [69].

Tablo 2.25: Bağlanma Reaksiyonlarında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Malzemeler	Miktarları
10X Bağlanma Tamponu	2 µL (1X)
1 µg/µL poly dIdC	1 µL
1M KCl	1 µL
100 mM MgCl	1 µL
Nükleer Ekstrakt (Hep3B veya Saos-2)	... µL (5 µg)
1 pmol/µL Biotinle etiketlenmiş oligolar (Sıcak prob)	1 µL
<i>Opsiyonel</i> Yarışma deneylerinde kullanılan etiketlenmemiş spesifik transkripsiyon faktörlerine ait oligolar (Soğuk prob)	5 µL (500 kat)
<i>Opsiyonel süpershift bağlanmalar için SPI antikoru</i> µL (1/400-1/800)
<i>dH₂O</i> µL
<i>Toplam</i>	20 µL

2.7.2.5 Jelin Membrana Transferi ve Kroslink Aşaması

8x10 cm'lik naylon membran jel büyüklüğünde kesilerek 0,5 X TBE içerisinde 10 dk bekletildi. transfer işlemi -10°'ye soğutulmuş olan 0,5 X TBE içerisinde 100 V akımda bir saat süresince gerçekleştirildi. Membranın yüzünü streç film ile kaplandı ve yüzü aşağı gelecek şekilde transilluminatore koyuldu ve 15 dk süresince 302 nm UV altında bekletildi.

2.7.2.6 Membranın Develop Edilmesi

Membran ilk olarak kitin içeriğinde olan 20 mL bloklama tamponunda 15 dk yatay çalkalayıcıda karıştırılarak bekletildi. 66,7 µL Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate antikoru bloklama tamponu içerisine eklendi ve 15 dk süresince çalkalandı. Membran kitte bulunan yıkama tamponu ile dört kez yıkandıktan sonra 30 mL substrat dengeleme tamponu eklenerek 5dk çalkalandı. Biotin işaretli DNA, ECL kullanılarak görüntülendi. Film banyo salüsyonunda görüntülenerek sonuçlar elde edildi.

2.8 İstatistiksel Değerlendirmeler ve Verilerin Yorumlanması

Tekrarlı olarak çalışılmış veriler Minitab 14 programı kullanılarak değerlendirildi. Buna ilişkin p ve standart sapma değerleri belirlendi ve belirlenen değerler ile sütun grafikleri çizildi. Western metodu verileri, RT-PCR jel elektroforez bantları, sitokin uygulanmış iimmunflorasan dataları ve koloni formasyonları fotoğrafları IMAGE J [70] programı kullanılarak değerlendirildi ve grafikler oluşturuldu.

2.9 Biyoinformatik Analiz

Genin mRNA özellikleri, başlama ve bitiş kodonları, ekzon ve intron bölgeleri ve muhtemel promotor bölgesi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresi üzerinden analiz edildi. promotör konstraktlarının oluşturulması için manual olarak tasarlanan primerlerin spesifik olup olmadığı <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresi üzerinden test edildi. Restriction mapper version 3 programı ile restriksiyon haritası belirlendi. Promotor bölgesinin % GC içeriği (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) adresi üzerinden belirlendi.

<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form> programı kullanılarak oluşturduğu sekonder yapılar analiz edildi. Bu bölgeye bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörleri Mathinspector programı kullanılarak belirlendi.

2.10 Dizi Analizi ile Doğrulama

PCR'a dayalı bir teknikle çoğaltılan promotor parçaları PGEM-T Easy vektörüne TA klonlama strateji ile klonlanma işleminden sonra elde edilen plazmitler restriksiyon enzimleri ile kesilerek rekombinant olup olmadığı belirlendi. Rekombinant olduğunu düşündüğümüz plazmitler herhangi bir mutasyon olup olmadığını tespiti için REFGEN/ANKARA dizileme merkezine vektöre ait dizileme primerleri gönderilerek kontrol edildi. Kullanılan dizileme primerleri Tablo 2.25'de verildiği gibidir. Elde edilen ham data BİOEDİT programı kullanılarak analiz edildi.

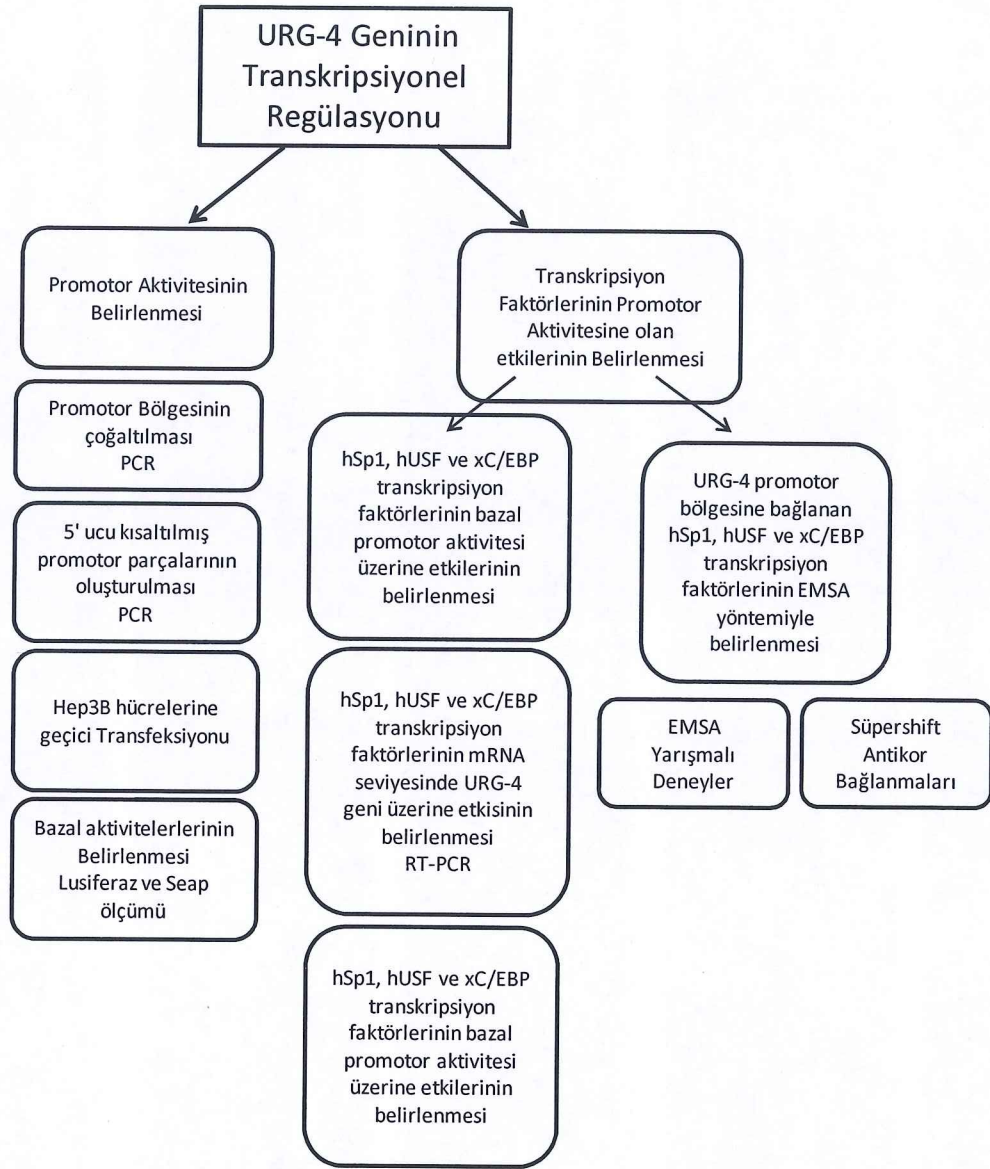
Tablo 2.26: Dizileme aşamasında kullanılan primerler ve primerlere ait diziler

Primerin Adı	Tm (°C)	Primer Dizisi (5'- 3')	Uzunluk (bç)
pMetLuc Dizileme Primeri	68°C	AGT TAT TAC TAG CGC TAC CGG AC	23bç

3. BULGULAR

3.1 İnsan URG-4 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonunun Belirlenmesi

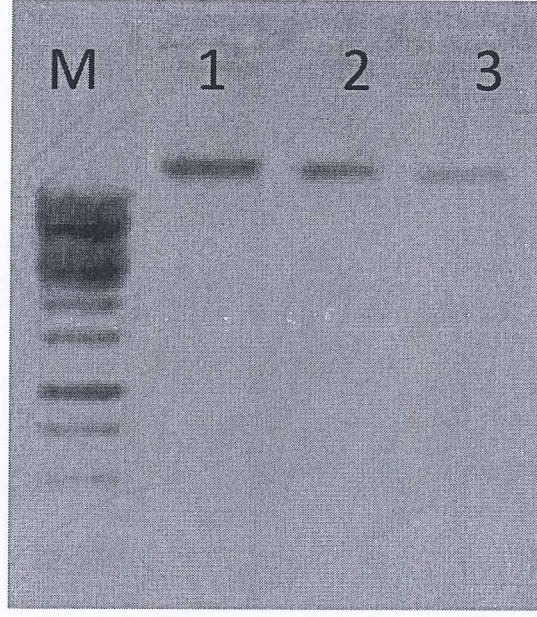
İnsan URG-4 geninin transkripsiyonel düzeyde regülasyonunun aydınlatılması amacıyla öncelikle muhtemel promotor bölgesi gen bankasında kayıtlı olan NM_017920 varyant 1 cDNA'sından yararlanılarak tespit edildi. Yaklaşık 544 bp'lik bu bölge spesifik primerler kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltıldı. Bu çalışma ile insan URG-4 geninin promotor bölgesi transkripsiyonel aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla lusiferaz tabanlı ökaryotik haberci vektör sistemine ilk olarak klonlandı. Transkripsiyonel açıdan en aktif bölgenin belirlenmesi amacıyla da en büyük promotor parçası 5' ucundan farklı büyüklüklerde kısaltıldı. Farklı uzunluklarda hazırlanan promotor parçalarının bazal aktiviteleri yapılan geçici transfeksiyon çalışmalarıyla belirlendi. Promotor bölgesi üzerinde muhtemel bağlanma dizileri bulunan farklı transkripsiyon faktörlerinin (hUSF, xCEB/P γ , hSP1) URG-4 promotor aktivitesine olan katkıları kotransfeksiyon çalışmalarıyla belirlendi. Ayrıca ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak URG-4 mRNA'sına etkileri RT-PCR ile belirlendi. Bu transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığı DNA-protein etkileşimi stratejisine dayalı olarak yapılan radyoaktif olmayan EMSA (Elektromobility Shift Assay) tekniği ile tespit edildi. Ayrıca yarışma deneyleri ile bağlanmanın özgünlüğü tespit edildi. Şekil 3.1'de insan URG-4 geninin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amacıyla izlenen çalışma basamakları akış diyagramı şeklinde özetlenmektedir.



Şekil 3.1: İnsan URG-4 geninin transkripsiyonel regülasyonu basamaklarını içeren akış diyagramı

3.1.1 Genomik DNA İzolasyonu

İnsan *URG-4* promotorunun klonlanması amacıyla öncelikle Bölüm 2.3.1’de belirtilen şekilde Hep3B hücrelerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA Bölüm 2.3.3’de anlatıldığı şekilde % 0,8’lik agaroz jelde yürütülerek görüntüldü. Spektrofotometrik olarak konsantrasyonu ve saflığı belirlendi.



Şekil 3.2: M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3: İzole edilen Genomik DNA'nın %0.8'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

3.1.2 Promotor Bölgesinin Belirlenmesi ve Primer Tasarımı

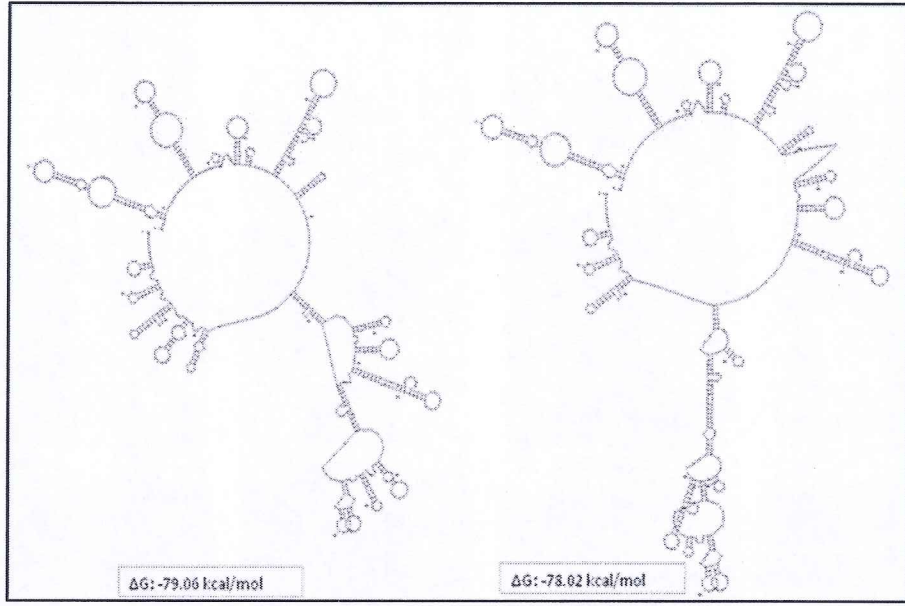
URG-4 geni 7. kromozomun kısa kolunda (43.915.000 bç-43.965.000 bç) lokalize olmuştur. Gen bankasında kaydedilmiş üç farklı varyantı bulunmaktadır. *URG-4* genine ait promotor bölgesi belirlenirken *Varyant-1*'e ait mRNA dizisi kullanıldı. Bu dizide translasyonun başlangıç bölgesinden itibaren yaklaşık 1500 bç'lik yukarıda bulunan bölge olası promotor olarak belirlendi.

Promotor bölgesinin amplifikasyonunda kullanılacak olan primerler farklı promotor uzunluklarını çoğaltacak şekilde hazırlandı. Primerlerin saç tokası, Tm, % GC ve NCBI Blast analizleri yapıldı. Haberci vektör sistemine doğru oryantasyonda klonlamanın yapılabilmesi amacıyla primerlerin 5' uçlarına belirlenen enzimlerin tanıma dizileri eklendi. Bu sebeple öncelikle promotor bölgesine ait restriksiyon haritası Restriction Mapper Version 3 programı kullanılarak hazırlandı (Bkz: Ek-E). Bu analize göre *URG-4* geninde çalışılması planlanan 1500 bç'lik bölgeyi kesmediği tespit edilen enzimlerden *HindIII*'e ait tanıma dizisi ileri primere ve *XhoI*'e ait tanıma dizisi de geri primere eklendi. Tasarlanan primer dizilerine ait bilgiler Tablo 3.1'de verildiği gibidir.

URG-4 promotorunun çoğaltılmasında çok sayıda primer dizaynının nedeni, URG-4 promotor bölgesinin oldukça yüksek GC oranına sahip olduğu biyoinformatik olarak belirlendi. Ayrıca, standart PCR reaksiyonları ile çoğaltılmasındaki başarısızlıklar bize bu promotor bölgesinin oldukça kompleks sekonder yapılar içeriyor olabileceğini göstermiştir. Bu açıdan, dizinin oluşturduğu muhtemel sekonder yapılar <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form> adresi üzerinden tespit edildi. Şekil 3.3’de en yüksek (-79.06)ve en düşük (-78.02) ΔG değerine sahip formları gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan Promotor Primerleri

Lokasyon	Primer dizileri (5'-3')	Ürün büyüklüğü (bp)
-1500/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev ATCTCCTTCATTTCACTCCCTCGAG	1563
-1400/+63	Forw: AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAG Rev: CTCGAGCCTCAAACCTCTCCTAACTCTGGTCCTCCTGG	1463
-1038/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev CTCGAGTAATTGGTGGAGCCAGATT	1101
-736/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev CTCGAGACAATGGTTACATTGTCCA	799
-482/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev CTCGAGGTGCTTCGCATTGCCTAGAGCT	545
-344/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev CTCGAGAAGGCCTTACGCTTCAGGG	407
-261/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev CTCGAGTTATCCTACAGCTTTGGCA	324
-109/+63	Forw AAGCTTCGACGCCATGAGCGCAGCGAGGTC Rev CTCGAGGCCACCTTACCCACCT	172



Şekil 3.3: URG-4 promotor bölgesinin oluşturduğu en yüksek ve en düşük ΔG değerlerine sahip olan sekonder yapılar

3.1.3 Guanin Sitozince Yüksek Olan URG-4 Promotorunun PCR Tekniği ile Çoğaltılması

i. Bağlanma Sıcaklığı ve $MgCl_2$ (Magnezyum klorür) Miktarının Optimizasyonu

Primerlerin bağlanma sıcaklığı polimeraz zincir reaksiyonunun başarıyla gerçekleşebilmesi için önemli etkenlerden bir tanesidir. $4*(G+C) + 2*(A+T)$ formülüyle hesaplanabilir. Bağlanma sıcaklığının optimize edilmesi amacıyla $50^{\circ}C$, $58^{\circ}C$, $60^{\circ}C$ ve $62^{\circ}C$ olacak şekilde farklı bağlanma sıcaklıkları ile çalışıldı. Bunun yanı sıra farklı genomik DNA (50 ng-300 ng) ve $MgCl_2$ (1-2 mM) konsantrasyonları da denendi. $MgCl_2$ DNA polimeraz enziminin kofaktörüdür. PCR verimliliğini arttırmaktadır. Ayrıca tüm PCR reaksiyonlarında, insan β -aktin primer setleri kullanılarak normalizatör gen kullanılmıştır. Pozitif gene ait primer bilgileri Tablo 3.1’de belirtilmiştir. Ayrıca her PCR reaksiyonunda DNA içermeyen negatif kontrol de dahil edilmiştir.

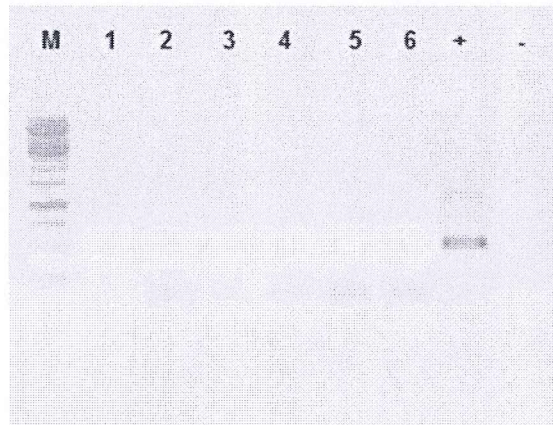
Farklı primer setleri ile yapılan PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’te verildiği gibidir. Bağlanma sıcaklığının,

genomik DNA ve $MgCl_2$ miktarlarının optimizasyonu istenilen bölgenin amplifikasyonu için yeterli olmamıştır.



Şekil 3.4: -1500/+63 primer seti, farklı $MgCl_2$ ve DNA konsantrasyonu kullanılarak yapılan genomik PCR sonucu (T_m : 60°C)

M: 1kb marker (SM0311), 1: 1mM $MgCl_2$ -30 ng gDNA, 2: 2mM $MgCl_2$ -30 ng gDNA, 3: 1mM $MgCl_2$ -60 ng gDNA, 4: 2mM $MgCl_2$ -60 ng gDNA, 5: 1mM $MgCl_2$ -120 ng gDNA, 6: 2mM $MgCl_2$ -120 ng gDNA, +: pozitif kontrol (GAPDH)

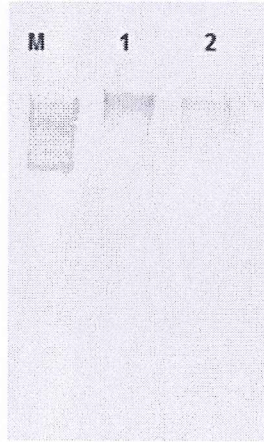


Şekil 3.5: -1500/+63 primer seti, farklı $MgCl_2$ ve DNA konsantrasyonu kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m : 55°C)

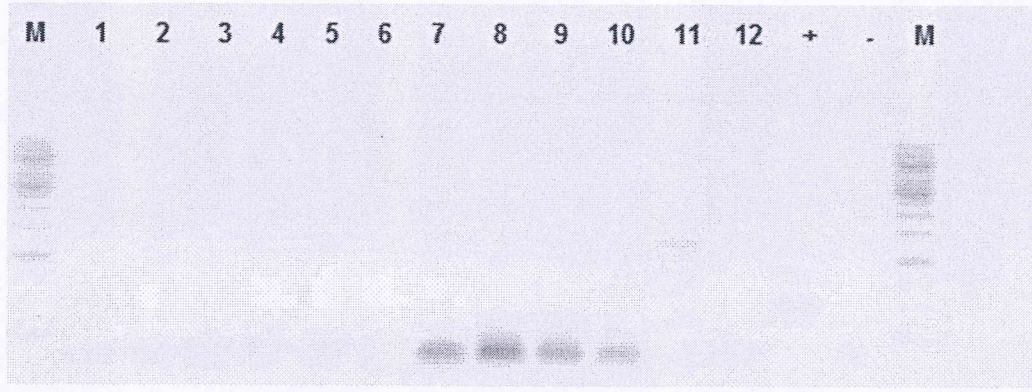
M: 1kb marker (SM0311), 1: 1mM MgCl₂. 30 ng DNA, 2:2mM MgCl₂. 30 ng gDNA, 3: 1mM MgCl₂. 60 ng, 4: 2mM MgCl₂.60 ng, 5: 1mM MgCl₂.120 ng, 6: 2mM MgCl₂.120 ng +: pozitif kontrol(GAPDH), -: negatif kontrol

ii. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesiyle Elde Edilen Ürünün Kalıp Olarak Kullanıldığı PCR Amplifikasyonları

PCR çoğaltılmasında sonuç elde edilememesinden dolayı genomik DNA'yı parçalara ayırarak kullanmak üzere genomik DNA restriksiyon endonükleazlarla kesime tabi tutulmuştur. Genomik DNA, URG-4 promotor bölgesini içeriden kesmediği belirlenen *Xho*I ve *Hind*III enzimleri kullanılarak 100 µL son hacimde Bölüm 2.3.11'de anlatıldığı şekilde kesildi (Şekil 3.6). Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesime uğratılan DNA PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı. PCR'ye ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 3.7 ve 3.8'de verildiği gibidir.

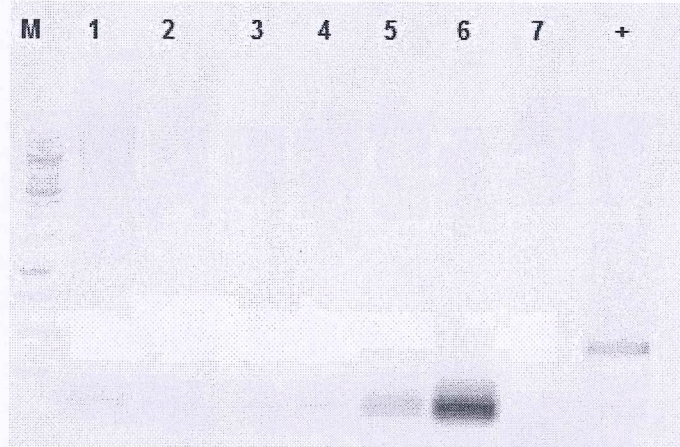


Şekil 3.6: M: SM0311, 1-2: Kesilmiş gDNA'nın %0.8'lik jel elektroforezi sisteminde görüntülenmesi



Şekil 3.7: Restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş genomik DNA, -1500/+63 primer seti, -1400/+63 primer seti ve farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m: 65°C).

M: SM0311, 1-2: 1 mM MgCl₂, 3-4: 2 mM MgCl₂, 5:1 mM MgCl₂, kesilmiş gDNA, 6: 2mM MgCl₂, kesilmiş gDNA, 7: -1400/+63 primer seti, 1 mM MgCl₂, 8: -1400/+63 primer seti 2 mM MgCl₂, 9-10: 1500/+63 primer seti ve -1400/+63 primer seti birlikte, 2 mM MgCl₂ 11: -1500/+63 primer seti ileri primeri- -1400/+63 ileri primeri, 1 mM MgCl₂, 12: -1500/+63 primer seti geri primeri- -1400/+63 geri primeri, 1 mM MgCl₂, +: pozitif kontrol, -: Negatif Kontrol



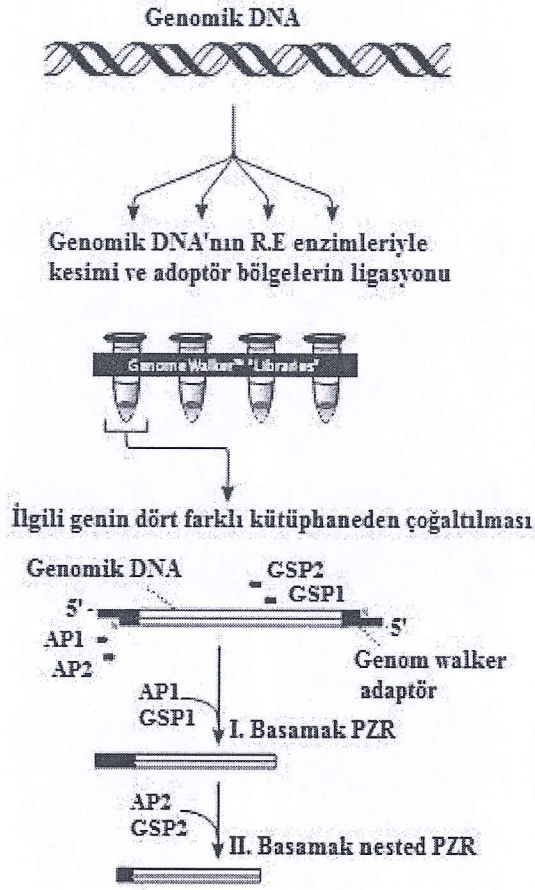
Şekil 3.8: Restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş genomik DNA, -1500/+63 primer seti, -1400/+63 primer seti ve farklı MgCl₂ konsantrasyonları kullanılarak yapılan genomik PCR (T_m: 60°C).

M: SM0311, -1500/+63 primer seti, 1: 60 ng gDNA, 1 mM MgCl₂, 2: 60 ng gDNA, 2 mM MgCl₂, 3: 120 ng kesilmiş gDNA, 1 mM MgCl₂, 4: 120 ng kesilmiş gDNA, 2

mM MgCl₂, 5: -1400/+63 primer seti, 120 ng kesilmiş gDNA, 1mM MgCl₂, 6: 120 ng kesilmiş gDNA, 2 mM MgCl₂, 7: -1500/+63 primer seti ileri primeri, -1400/+63 ileri primeri, 1 mM MgCl₂, +: pozitif kontrol

iii. İnsan Genome Walker Stratejisi

İnsan Genom Walker Kiti™ (Clontech) restriksiyon enzimleri ile kesilmiş dört farklı genomik DNA kütüphanesi (EcoRV, DraI, PvuII ve SspI) ve iki adet adaptör primeri içermektedir. Protokol her bir kütüphane için iki basamaklı bir PCR gerektirmektedir. Kit protokolünün önerdiği basamaklar Şekil 3.9'da verildiği gibidir. I. basamak PCR çalışmasında kitte bulunan adaptör primer 1 (AP1) ve URG-4 promotor bölgesine spesifik primer -1500/+63 (Gen Spesifik primer 1(GSP1) yerine) kullanıldı. PCR bileşenleri miktar, konsantrasyonları ve PCR döngü koşulları Tablo 3.2 ve 3.3'te verildiği gibidir. PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.10'da verildiği gibidir.



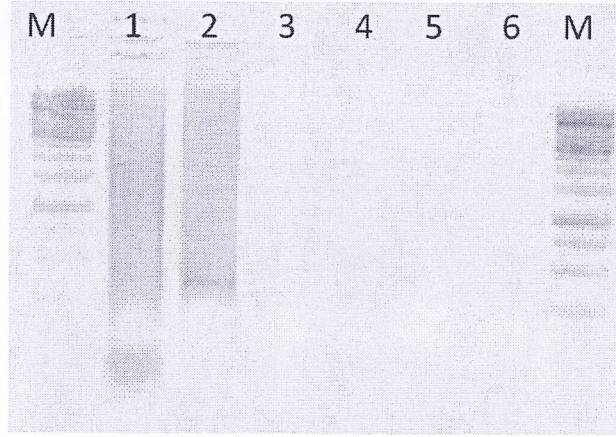
Şekil 3.9: Genome Walker kiti™ uygulama basamakları

Tablo 3.2: Genome walker™ 1. Aşama PCR'da kullanılan PCR bileşenleri

	1	2	3	4
gDNA kütüphanesi	EcorVI	DraI	SSp	PVUII
PCR bileşen ve miktarları (µL)				
10X PCR Buffer	5	5	5	5
25 mM MgCl₂	1	1	1	1
dNTP(10mM)	1	1	1	1
GSP 1	1	1	1	1
AP1	1	1	1	1
Hotstart Taq DNA Polimeraz (5 U/ µL)	1	1	1	1
dH₂O	39	39	39	39
Son hacim	50	50	50	50

Tablo 3.3: I. Basamak PCRdöngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü sayısı
94	25	7
72	4	32
94	25	
67	4	
67	4	1



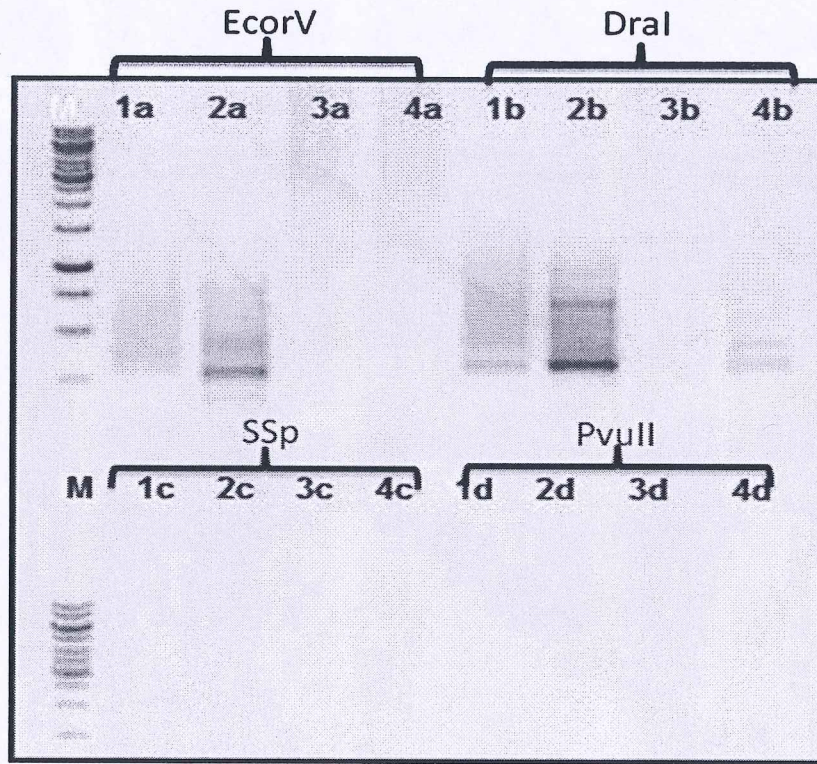
Şekil 3.10: Genome Walker Kit™ I. Basamak PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: SM0311,1: *EcoRV*, 2: *DraI*, 3: *SspI*, 4: *PvuI* kütüphaneleri kalıp olarak kullanılarak çalışılan PCR reaksiyonlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüleri 5: pozitif kontrol, 6: negatif kontrol

II. basamak PCR reaksiyonlarında, I. basamak PCR'den elde edilen ürünler 10 kat seyreltilerek kalıp olarak kullanıldı. Adaptör primer 2 (AP2) ve GSP2 yerine sırasıyla URG-4 promotor bölgesinde -1500/+63'lik bölgenin amplifikasyonu için tasarlanan ileri ve geri primerler kullanıldı. PCR reaksiyonlarında kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları Tablo 3.2'de belirtildiği gibidir. PCR'da kullanılan döngü koşulları Tablo 3.4'te verildiği gibidir. PCR'a ait jel elektroforez görüntüsü şekil 3.11'de verildiği gibidir. Çalışmalar başarısızlıkla sonuçlandığından çeşitli PCR kuvvetlendiriciler çalışmaya dahil edildi.

Tablo 3.4: İkinci aşama PCR’da kullanılan program

Sıcaklık (°C)	Zaman (Dk)	Döngü sayısı
94	25	5
72	4	18-22
94	25	
67	4	
67	4	1

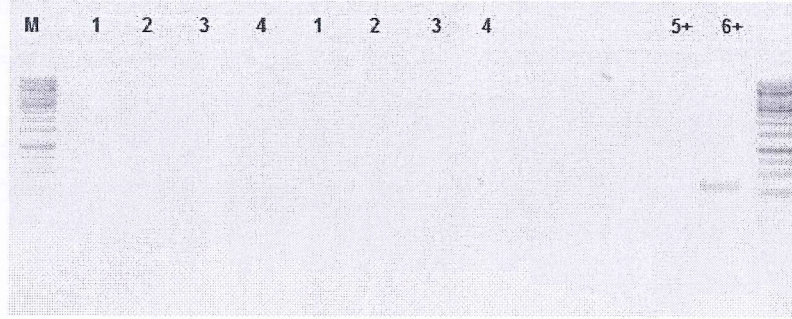


Şekil 3.11: Genome Walker™ II. Basamak PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: 1kb marker (SM0311), a: *EcorV* cDNA kütüphanesi, b: *DraI* cDNA kütüphanesi, c: *SSpI* cDNA kütüphanesi kalıp olarak kullanılarak yapılan PCR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü d: *PvuII* cDNA kütüphanesi, 1: -1500/+63 ileri primeri, 2: -1400/+63 ileri primeri, 3: -1500/+63 geri primeri, 4: -1400/+63 geri primeri ve AP2 primer setleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları.

iv. Çeşitli PCR Kuvvetlendiricileri Kullanılarak Yapılan PCR çalışmaları

URG-4 promotor bölgesi guanin ve sitozin (GC) açısında zengin bir bölge olmasından dolayı oldukça güçlü sekonder bir yapı oluşturmaktadır. Sekonder yapının denatürasyonu ve denatüre olduktan sonra DNA'nın çift zincirleri arasında hidrojen bağlarının oluşumunu engellemek amacıyla etilen glikol (% 6), formamid (% 2,5 ve % 5)ve DMSO (% 2,5, % 5, % 10) gibi kimyasallar farklı konsantrasyonlarda PCR reaksiyonuna eklendi. Elde edilen sonuçlar % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13). Buna göre pozitif kontroller haricinde hiç bir amplifikasyon elde edilemedi.



Şekil 3.12:% 6'luk Etilen glikol ve: -1500/+63 primer seti ve -482/+63 primer seti kullanılarak yapılan genomik PCR (Tm: 60 °C)

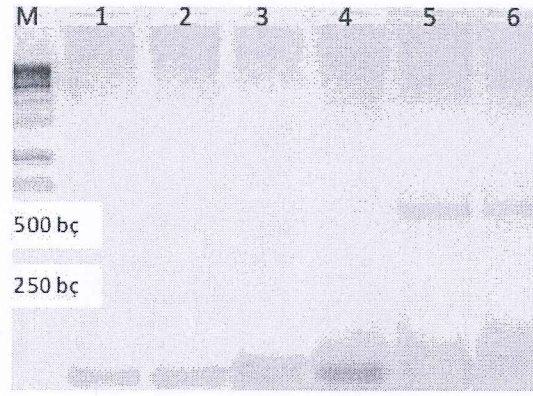
M: SM0311, 1-2: -1500/+63 primer seti, %6 Etilen glikol - 3-4: -545/+63 primer seti, %6 Etilen glikol, 5+: pozitif kontrol (GAPDH primer seti+ % 6 etilen glikol), 6+: pozitif kontrol (GAPDH primer seti)



Şekil 3.13: % 2 DMSO, % 5 DMSO, % 10 DMSO % 2.5 formamid, 1500/+63 primer seti ve -482/+63 primer seti kullanılarak yapılan genomik PCR (Tm: 60°C).

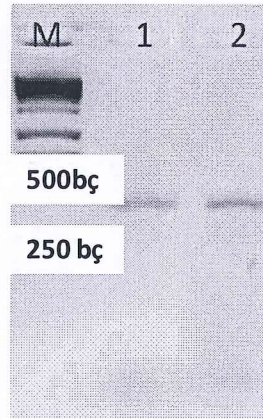
M: SM0311, 1: -1500/+63 primer seti- % 2 DMSO, 2; -482/+63 primer seti-% 2 DMSO, 3: -1500/+63 primer seti-% 5 DMSO, 4: -482/+63 primer seti-% 5 DMSO, 5: -1500/+63 primer seti-% 10 DMSO, 6: -482/+63 primer seti-% 10 DMSO, 1a; -1500/+63 primer seti-% 2.5 formamid, 2a; -482/+63 primer seti -% 2.5 formamid

DMSO ve formamid gibi kuvvetlendiricilerle yapılan PCR çalışmaları başarılı olamayınca Betain, 7-deaza-GTP ve DMSO kombinasyonu kullanılarak Bölüm 2.3.4'de anlatıldığı şekilde yapılan PCR sonucunda yaklaşık 530 bp uzunluğunda (-482/+63) insan URG-4 promotor bölgesi başarılı bir şekilde çoğaltıldı. 5' kısaltılmış insan URG4 promotor parçaları Tablo 3.1'de verilen primer setleri (-344/+63, -261/+63 ve -109/+63) kullanılarak aynı yöntemle hazırlandı. Sonuçlar % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. (Şekil 3.14, 3.15, 3.16 ve 3.17)[71].



Şekil 3.14: -482/+63 primer seti ve 7-deaza-GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C)

M: SM0311, 1-2: -1500/+63 primer seti, 3-4: -1400/+63 primer seti, 5-6: -482/+63 primer seti URG-4 promotor parçasının amplifikasyonu



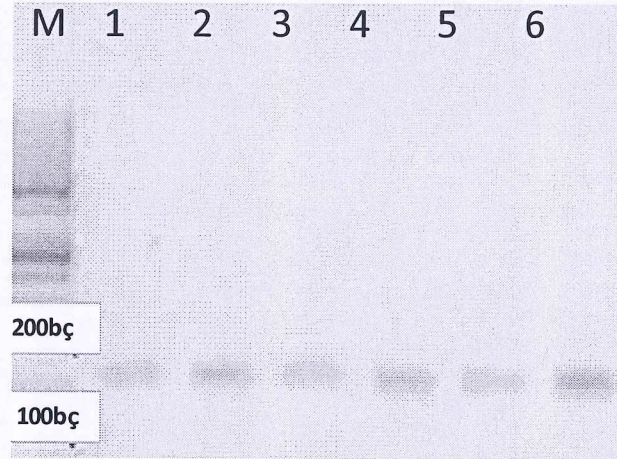
Şekil 3.15: -344/+63 primer seti, 7-deaza GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C)

M: SM0311, 1-2: URG-4 promotor parçasının amplifikasyonu



Şekil 3.16: -261/+63 primer seti, 7-deaza GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C)

M 1kb marker (SM0311), 1: -261/+63 URG-4 promotor parçasının amplifikasyonu

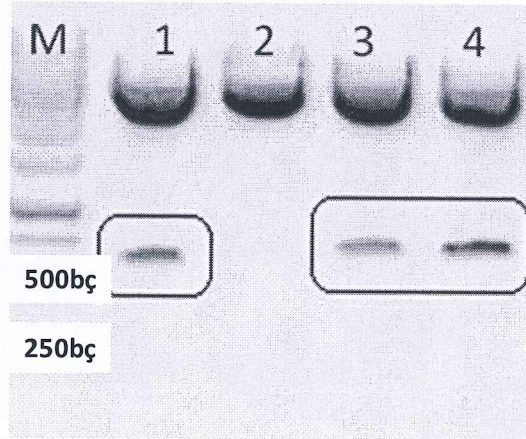


Şekil 3.17: -109/+63 primer seti, 7-deaza-GTP, DMSO, Betain (Tm: 60°C)

M: 100bp marker(SM0243), 1-2-3-4-5-6: -109/+63 URG-4 promotor parçasının amplifikasyonu

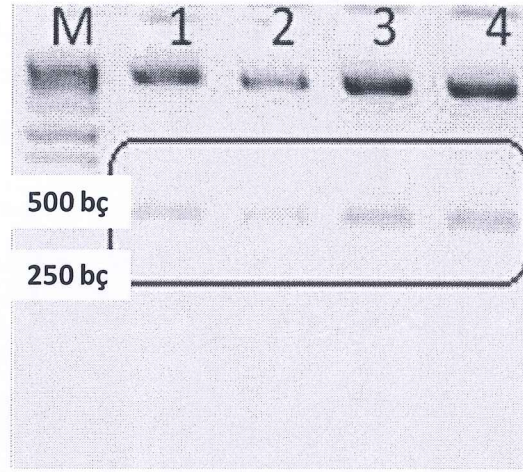
3.1.4 PCR Ürünlerinin pGEM-T Easy Vektör Sistemi'ne Klonlanması

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle ve özel kuvvetlendiriciler kullanılarak çoğaltılmış olan URG-4 5'deasyonlu doğrusal DNA dizilerinin kolay bir şekilde ligasyonuna imkan sağlayan pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu Bölüm 2.3.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.9'da belirtildiği üzere DH5 α kompetant hücrelerine transforme edilerek ertesi gün seçilen koloniler sıvı kültüre ekildi ve plazmid mini prep Bölüm 2.3.12 de belirtildiği üzere yapıldı. Rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla elde edilen plazmitler *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesildi (Bkz: Bölüm 2.3.11). Buna göre, Şekil 3.20, -261/+63 ve -109/+63 promotor parçalarının pGEM-T Easy vektör sistemine klonlandığını göstermektedir. Aynı şekilde Şekil 3.19 ve 3.18'de sırasıyla -344/+63 ve -482/+63 insan URG-4 promotor parçalarını rekombinant olduğunu göstermektedir.



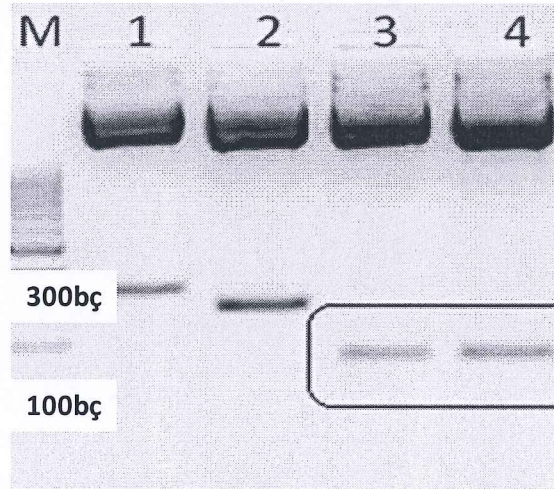
Şekil 3.18: -482/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pGEMTeasy vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3-4: -482/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörünün *XhoI* ve *HindIII* RE enzimleri kullanılarak kesilmesi



Şekil 3.19: -344/+63 URG-4 promotor parçasını içeren pGEMTeasy vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

M: 1kb marker (SM0311), 1-2-3-4: -344/+63 URG-4 promotor parçasını içeren pGEMTeasy vektörünün *XhoI* ve *HindIII* RE enzimleri kullanılarak kesilmesi



Şekil 3.20: -261/+63 ve -109/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörü Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

M: SM0243, 1-2: 261/+63 ve 3-4: -109/+63 promotor parçasını içeren pGEM-T Easy vektörünün *XhoI* ve *HindIII* RE enzimleri kullanılarak

3.1.5 Dizi Analizi ile klonlanan 5' delesyonlu promotor parçalarının doğruluğunun tespiti

İnsan URG-4 promotor bölgesine ait 5'delesyonlu parçaların her biri PCR metoduyla çoğaltıldığı için, bu sırada oluşabilecek mutasyonların var olup olmadığını kontrol etmek ve dizinin URG-4 muhtemel promotor bölgesine ait olup olmadığını tespiti amacıyla REFGEN Biyoteknoloji, Ankara birimine rekombinant olduğu düşünülen plazmitler gönderildi. Dizilemenin sağlanabilmesi amacıyla hem pMetLuc dizileme primeri hem de genin spesifik primerleri gönderilerek okuma gerçekleştirilmiştir. En büyük insan URG-4 promotor parçası ve NCBI data bankasında bulunan genomik dizi NCBI-blast programı kullanılarak karşılaştırıldı. Karşılaştırılması sonucunda herhangi bir mutasyon olmadığı tespit edildi. En büyük promotor parçasına ait karşılaştırma sonucu Şekil 3.21'de verildiği gibidir. Dizi analizi sonucu elde edilen veriler NCBI blast data bankasında bulunan dizi kullanılarak analiz edildiğinde özgün olarak hem URG-4 geninin ATG kodonuna kadar olan (+1....+65bç) 5'UTR bölgesine hem de kromozom 7'de +1'den -482 bç'ye kadar olan bölgeye bağlandığını tespit ettik.

PCR ile çoğaltılan diğer kısaltılarak yapılan promotor parçalarının hepsi ayrı ayrı dizi analizi ile doğrulanmıştır. Şekil 3.22, 3.23, 3.24 sırasıyla -344/+63, -261/+63, -109/+63 promotor parçalarına ait dizi analizi sonuçlarını göstermektedir. En büyük URG-4 promotor parçasının gen bankasına submit edilerek, KJ46614 nolu kayıt numarası (Accession number) alındı.

URG-4		GTGCTTCGCATTGCCTAGAGCTTCACAAGGCCACTTTATACACATTTTACAATGGGTACC	60
NCBI	43950621	GTGCTTCGCATTGCCTAGAGCTTCACAAGGCCACTTTATACACATTTTACAATGGGTACC	43950562
URG-4	61	GTCTCAGAGAGGCCAGCAACTCGTCCAACACAGCACTGCAAGTAAGAAGTAGGAAAGTTA	120
NCBI	43950561	GTCTCAGAGAGGCCAGCAACTCGTCCAACACAGCACTGCAAGTAAGAAGTAGGAAAGTTA	43950502
URG-4	121	TCGTTTGGCTTAATAATAAGGCCTTACGCTTCAGGGCTAAAGAAAAGCCTTTTCTTACAG	180
NCBI	43950501	TCGTTTGGCTTAATAATAAGGCCTTACGCTTCAGGGCTAAAGAAAAGCCTTTTCTTACAG	43950442
URG-4	181	AAATTAAACTCCAATTACAGAAAGGTGTGAAGTTCAGTAAGGCCCTGGGGCAGGTTATCC	240
NCBI	43950441	AAATTAAACTCCAATTACAGAAAGGTGTGAAGTTCAGTAAGGCCCTGGGGCAGGTTATCC	43950382
URG-4	241	T-GAGCTTTTGGCACCCGAGGCACCGCCCGGCGAGTTCGGCCTCCAGGCACCTGGGCAG	299
NCBI	43950381	TACAGCTTTTGGCACCCGAGGCACCGCCCGGCGAGTTCGGCCTCCAGGCACCTGGGCAG	43950322
URG-4	300	GTGGGCGTTGGGCGGGCTGCGGGTGACCTGGGCCGccccccccccccccccAGCT	359
NCBI	43950321	GTGGGCGTTGGGCGGGCTGCGGGTGACCTGGGCCGCCCCGCCCCACCCCGCCAGCT	43950262
URG-4	360	GTCCCCGGGCTGCTCCGAGAGGACCCCGGGCCACCTTACCCACCTCACCCACCTCCA	419
NCBI	43950261	GTCCCCGGGCTGCTCCGAGAGGACCCCGGGCCACCTTACCCACCTCACCCACCTCCA	43950202
URG-4	420	CCCCTGGAggcggtcccgaggg	479
NCBI	43950201	CCCCTGGAGCGCGTCCCGGAGCGGGCGGGCGGGCGGGCCAGGCCCTCCCCGGCGCC	43950142
URG-4	480	gagccggggggggggggAGGAAGCGAAGGAGCGGGAGCGGAGACCTCGCTGCGCTCATG	539
NCBI	43950141	GAGCCGCGGCCGCGCGGAGGAAGCGAAGGAGCGGGAGCGGAGACCTCGCTGCGCTCATG	43950082
URG-4	540	GCGTC 544	
NCBI	43950081	GCGTC 43950077	

Şekil 3.21: -482/+63 URG-4 promotör parçasının dizi analiz sonucu doğrulaması


```

URG-4 1 ACCTTACCCACCTCACCCACCTCCATCCCTGGAgcgcggtccccggagcgggcgggcggc 60
|||||
NCBI 43950228 ACCTTACCCACCTCACCCACCTCCACCCCTGGAGCGCGTCCCGGAGCGGGCGGGCGGC 43950169

URG-4 61 cggcgggcccaggccctccccggcgcgagcccgccggcggcggAGGAAGCGAAGGAGGC 120
|||||
NCBI 43950168 CGGCGGGCCAGGCCCTCCCCGGCGCCGAGCCGCGCGCGGAGGAAGCGAAGGAGGC 43950109

URG-4 121 GGGAGCGGAGACCTCGCTGCGCTCATGGCGTCG 153
|||||
NCBI 43950108 GGGAGCGGAGACCTCGCTGCGCTCATGGCGTCG 43950076

```

Şekil 3.24: -109/+63 URG-4 promotor parçasının dizi analiz sonucu doğrulaması

3.1.6 İnsan URG-4 Promotorunun *In Siliko* Analizi

Yaklaşık 544 bç uzunluğunda URG-4 promotor dizisi PCR'a dayalı bir teknikle çoğaltılarak, ilk olarak TA klonlama stratejisi ile pGEM-T Easy'e klonlandı. Klonladığımız insan URG-4 promotor parçaları dizi analizi için REFGEN birimine gönderilerek parçaların doğruluğu teyit edildi (Şekil 3.21).

544 bç bölgenin 63 bç 5'UTR'yi, 482 bç ise URG-4 promotorunu temsil etmektedir. Biyoinformatik analizi ile cDNA ve genomik DNA'nın karşılaştırılması ile muhtemel transkripsiyon başlangıç bölgesi (+1) tespit edilmiştir. Şekil 3.25'de gösterildiği gibidir.

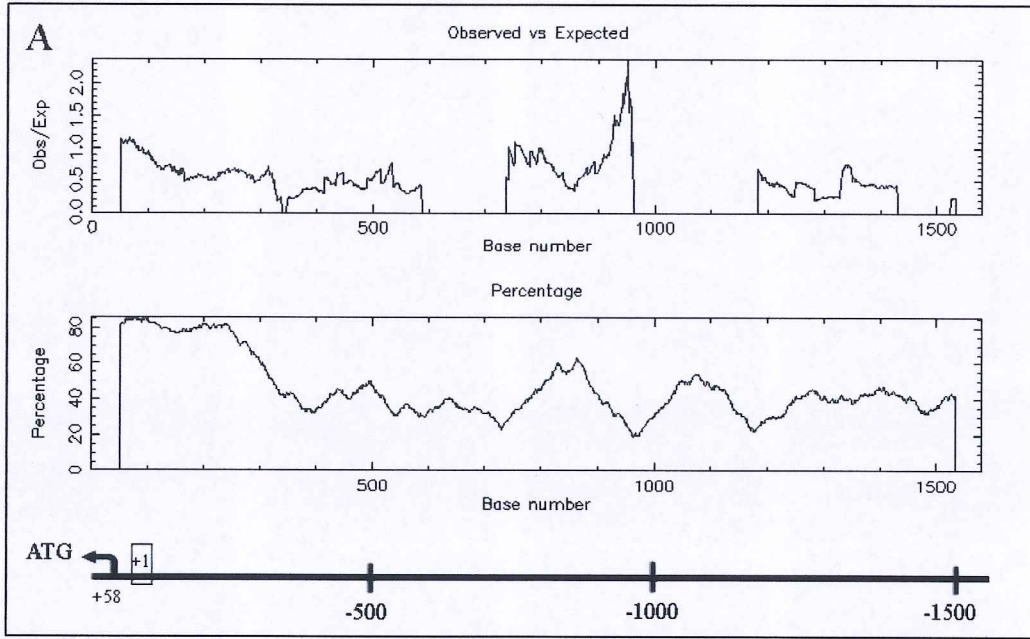
URG-4 promotoru guanin sitozince (GC) oldukça zengin ve TATA kutusu olmayan bir promotor bölgesidir. Transkripsiyonun başlangıcı için TATA kutusu yerine RNA polimeraz II'nin tanıyacağı INR diziler gibi farklı düzenleyici diziler içermektedir. Bu diziler arasında SP1/GC kutusu motifleri de önemli rol oynarlar. URG-4 promotoruna bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörleri Mathinspector programı kullanılarak analiz edilmiştir ve çok sayıda transkripsiyon faktörlerinin buraya bağlandığı bulunmuştur (Şekil 3.25 ve Bkz: Tablo 3.5). SP1/GC kutusu, Kruppel like faktör ve E2F myc aktivatör faktörlerinin bağlandığı tanıma dizileri URG-4 promotor dizisinde yoğun bir şekilde tespit edildi (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: URG-4 promotor bölgesine muhtemel olarak bağlanan transkripsiyon faktörleri

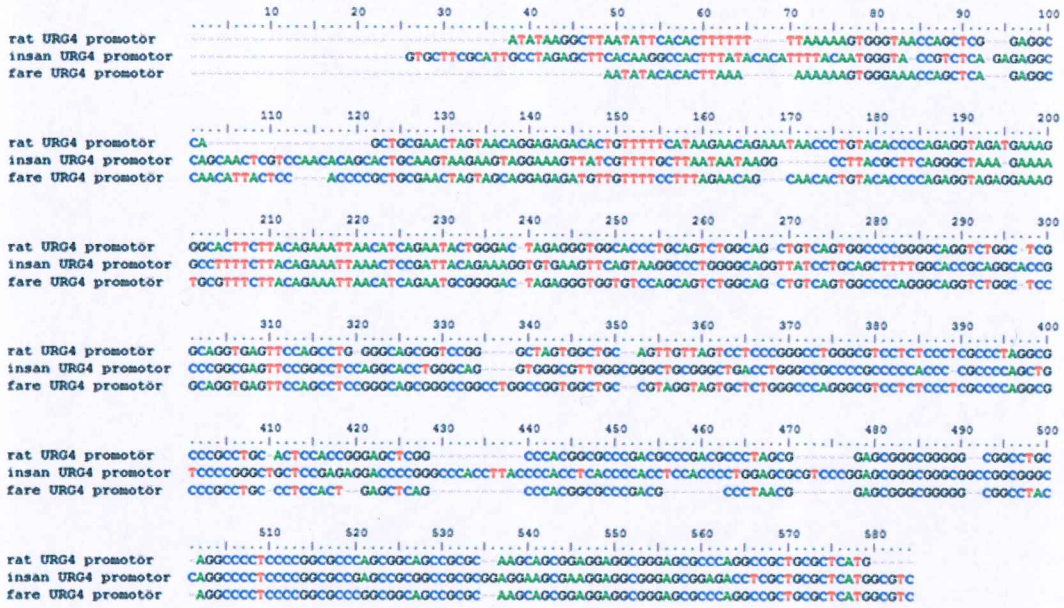
Transkripsiyon Faktörleri	Bağlanma Zincir	Tanıdığı dizi
RNA polimerase II transcription TATA-less promoters	47 -	agGCGGgagcg
E2F	47 -	aggagGCGGgagcggag
GC/SP1	49 -	gaaggaGGCGggagcgg
EGR	55 -	ggaaGCGAaggaggcgg
E2F	83 -	ccccgGCGCcgagccgc
GC/SP1	92 +	cgccggGGAGgggcctg
GC/SP1	116 -	ggagcGGGCgggcggcc
EGR	119 -	cccggagCGGgcgggcg
GC/SP1	142 +	tccaggGGTGgaggtgg
Ras	145 -	cCCCAcctcacccc
Kruempel like Faktör	152 +	gaggtGGGGtgaggtgg
Ras	155 -	cCCCAcctcacccc
MYOD	203 +	cgggGACAgctggggcg
AP4	204 +	ggggacAGCTggggcgg
Kruempel like Faktör	209 +	cagctggGGCGgggtgg
GC/SP1	210 +	agctgGGGCgggtggg
E2F	212 +	ctgggGCGGggtggggg
Ras	212 -	cCCCAccccgccca
Kruempel like Faktörleri	214 +	ggggcgGGGTgggggcg
GC/SP1	215 +	gggcggGGTGggggcgg
Kruempel like Faktörler	220 +	gggtggGGCGggggcgg
GC/SP1	221 +	ggtggGGCGggggcgg
E2F	223 +	tggggGCGGggcgccc
EGR	223 +	tggggcgGGCGggccc
Kruempel like Faktörler	225 +	ggggcGGGgcgcccag
GC/SP1	226 +	ggcgGGCGggcccag
Östrajen RE	238 +	ggcccAGGTcagcccgcagccc
GC/SP1	249 -	gcgtGGCGgggtgcg
GC/SP1	256 -	caggtGGCGttgggcg
Kruempel like Faktörler	257 -	gcaggtGGCGttgggc
AP2	276 +	ggtGCCTggaggcgg
GC/SP1	296 +	tcgccGGCGggtcctg
E2F	310 +	ctcggtgcCAAagct
AP2	335 +	cctGCCcagggcct

URG-4 promotorunun çoğaltılmasında karşılaşılan problemlerden de anlaşıldığı üzere bu bölgenin genomda yüksek sekonder yapı gösteren guanin sitozin bazlarınınca zengin olduğu tespit edilmiştir. GC bölgelerin muhtemel GC adaları içerebilecekleri durumu ve DNA metilasyonu ile promotorun transkripsiyonel regülasyonuna katkıda bulunacağı düşünüldüğünde, GC adalarının tespiti oldukça büyük önem arz etmektedir. Bu yüzden URG-4 promotorunun web tabanlı analizle (Bkz: Bölüm 2.9) olası GC adaları belirlenmiştir. Buna göre 1500 bazlık URG-4 promotor bölgesi incelendiğinde ilk 500 bazlık bölgede ve 700-900 bç'lik bölgede 2 adet potansiyel GC adası tespit edilmiştir. Bu tespit için kullanılan kriter obs/exp oranıdır. Bu oran 0,6'nın üzerinde olduğu bölgeler GC adası olarak bilinmektedir. URG-4 promotorunda tespit edilen olası GC adaları bize bu promotorunun transkripsiyonel regülasyonunda DNA metilasyonunun da önemli olabileceğini göstermektedir (Şekil 3.26).

Ayrıca insan URG-4 promotoru diğer memeli URG-4 promotor bölgeleri ile karşılaştırılarak herhangi bir korunmuş bölge içerip içermediği belirlenmiştir. Bu amaçla insan URG-4 promotor bölgesi rat ve fare promotor bölgeleriyle Bioedit programı kullanılarak Clustalw analizi çoklu karşılaştırmaları (Multiple alignment) yapılmıştır. Buna göre 5'UTR bölgeleri açısından oldukça benzer olmasına rağmen promotor bölgelerinde farklılıklar gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 3.27). Bu durum aslında promotor regülasyonları için önemlidir. Bilinmektedir ki promotor farklılıkları tür düzeyinde de farklı transkripsiyonel regülasyonu işaret etmektedir.



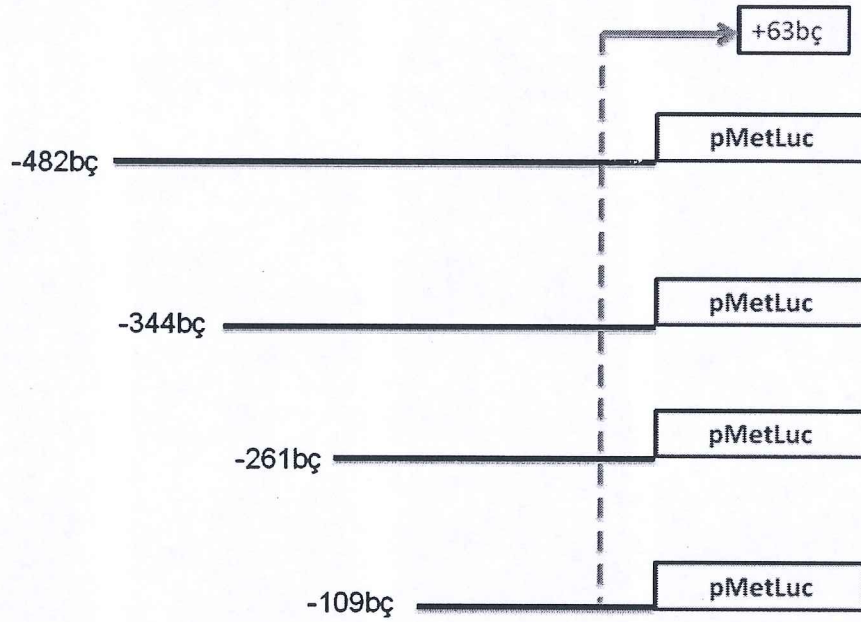
Şekil 3.26: İnsan URG-4 promotor bölgesinin %guanin sitozin içeriğinin gösterilmesi



Şekil 3.27: İnsan, fare ve rat URG-4 promotor dizilerinin bioedit analiz programında karşılaştırılması

3.1.7 İnsan URG-4 Promotor Parçalarının pMetLuc Haberci Vektörüne Alt Klonlama çalışmaları

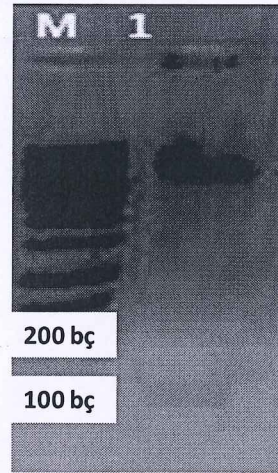
İnsan URG-4 promotorunun transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi için PCR ile klonlanan promotor parçalarının haberci vektör sistemine klonlanması aşamasına geçildi. Haberci vektör sistemi olarak Clontech pMetLuc vektör sistemi seçildi. (Bkz: Şekil 2.3). Bu sistemin özelliği salınabilir lusiferaz enzimi sentezleyebilmesidir. Ayrıca sistem optimizasyonu yani normalizasyon amaçlı yine salınabilir SEAP vektöründe aynı sistemle kotransfekte edildi. Maksimum aktif promotor bölgesinin tespiti için kısaltılarak hazırlanan promotor parçaları ayrı ayrı pMetLuc vektör sistemine klonlanma işlemi gerçekleştirildi. Bazal promotor aktivitesinin belirlenmesi amacıyla insan URG-4 promotor bölgesine ait Lusiferaz haberci vektörüne klonladığımız promotor parçaları Şekil 3.28'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.28: pMetLuc Haberci Vektörü İçerisine Klonlanarak Oluşturulan 5'delesyonlu İnsan URG-4 Promotor Parçalarının Şematik Gösterimi

İlk oluşturulan haberci vektör sistemi -109/+63 URG-4 promotor parçası olmuştur. PCR'a dayalı teknikle pGEM-T Easy içine klonlanan promotor XhoI/HindIII enzim çifti ile kesildi ve Bölüm 2.3.5'de anlatıldığı şekilde jelden geri kazanıldı. Geri kazanılmış olan insan URG promotor DNA parçasından daha fazla

kullanmak için ligasyon şartları modifiye edilerek 2 kat hacimde gerçekleştirilmiştir. Buna göre 28 μL *XhoI*/*HindIII* enzimleri ile kesilmiş promotor parçası, 3 μL (150 ng) *XhoI*/*HindIII* kullanılarak doğrusal hale getirilmiş pMetLuc haberci vektörü, 10X ligasyon tamponundan 4 μL (1X) ve 3 $\text{Ü}/\mu\text{L}$ 'lik T4 DNA ligaz enziminden 2 μL olacak şekilde son hacim 40 μL de ligasyon gerçekleştirildi. Bölüm 2.3.9'da belirtildiği üzere DH5 α kompeten hücrelerine transforme edilerek ertesi gün seçilen koloniler sıvı kültüre ekildi. 16 saat sonrasında plazmit izolasyonu Bölüm 2.3.12' de belirtildiği üzere yapıldı. Rekombinant kolonilerin seçiminde 2.3.11'deki şartlar kullanılarak *XhoI*/*HindIII* kesimi uygulandı. Şekil 3.29'de agaroz jel elektroforezi görüntüsü verildiği gibidir.

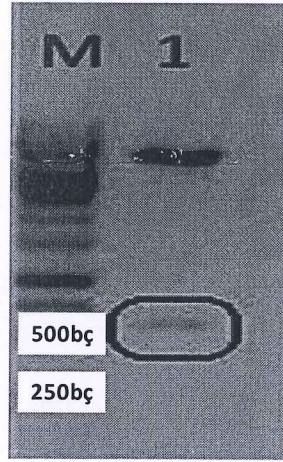


Şekil 3.29: -109/+63 URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

M: 100 bp marker (SM0243), 1: -109/+63 URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmesi.

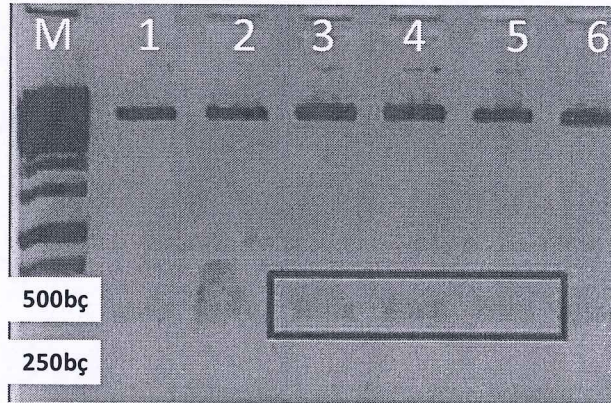
-482/+63, -344/+63 ve -261/+63 URG-4 Promotor Parçalarının ligasyonunda standart ligasyon şartları kullanıldı. Buna göre ligasyon reaksiyonları son hacim 20 μL olacak şekilde Bölüm 2.3.6'da belirtildiği üzere yapılmıştır. Ligasyon ürünleri, Bölüm 2.3.9'da belirtildiği üzere DH5 α kompetant hücrelerine transforme edildi. Ertesi gün seçilen koloniler sıvı kültüre ekildi ve plazmid mini prep Bölüm 2.3.12 de belirtildiği üzere yapıldı. Rekombinant kolonilerin tespiti amacıyla elde edilen plazmitler *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesildi. Sonuçlar % 0,8'lik agaroz jel sisteminde Bölüm 2.3.3'de ifade edildiği şekilde

görüntülendi. Şekil 3.30, 3.31 ve 3.32’de verildiği üzere farklı promotor parçaları pMetLuc haberci vektör sistemine başarılı bir şekilde klonlanmıştır.



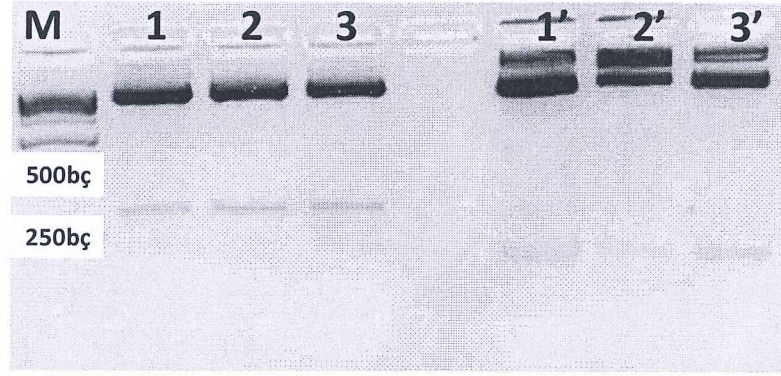
Şekil 3.30: -482/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

M: 1kb marker (SM0311), 1: -482/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün *XhoI* ve *HindIII* RE enzimleri kullanılarak kesilmesi



Şekil 3.31: -344/+63 promotor parçasını içeren pMet-Luc vektörünün Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu

M: SM0311, 1-2-3-4-5-6: -344/+63 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün *XhoI* ve *HindIII* RE enzimleri kullanılarak kesilmesi

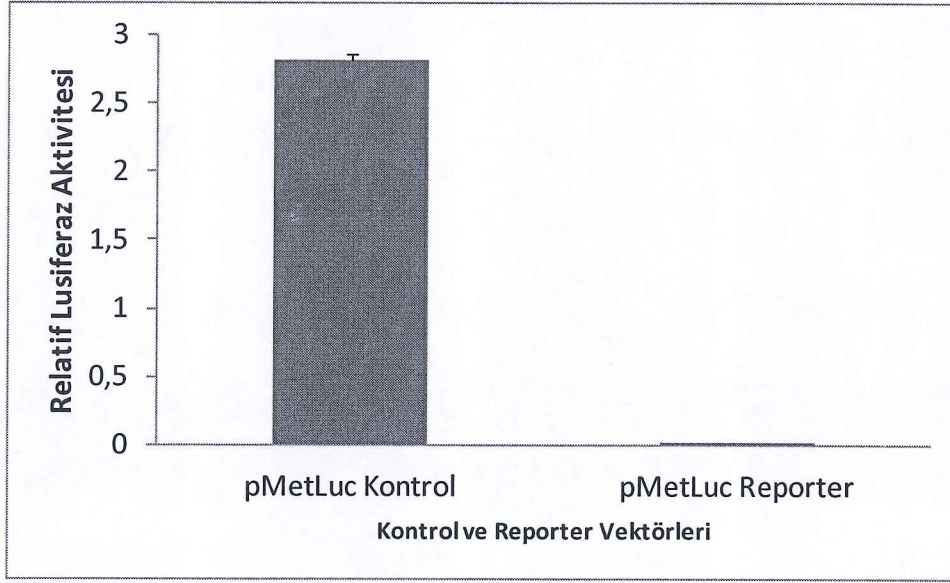


Şekil 3.32: -261/+63 İnsan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim sonucu
M: SM0311, 1-2-3: -261/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün XhoI ve HindIII enzimleri kullanılarak kesilmesi, 1'-2'-3': -261/+63 insan URG-4 promotor parçasını içeren pMetLuc vektörünün *SacI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kontrol kesimi

İnsan URG-4 genine ait promotor parçalarının bazal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kalsiyum fosfat geçişi transfeksiyonu salınan sistem lusiferaz metodu kullanılarak Bölüm 2.4.7.1.'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Transfeksiyonda kullanılan plazmitler endotoksin içermeyen yüksek kalitede plazmit DNA veren kit kullanılarak büyük ölçekle Bölüm 2.3.13'de anlatıldığı şekilde saflaştırıldı. Transfeksiyonda model hücre olarak Hep3B hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin seçilmesinin nedeni URG-4'ü ifade eden ve kalsiyum fosfat metodunun bu hücrelerde laboratuvarımızda başarıyla uygulanabiliyor olmasıdır [62, 72].

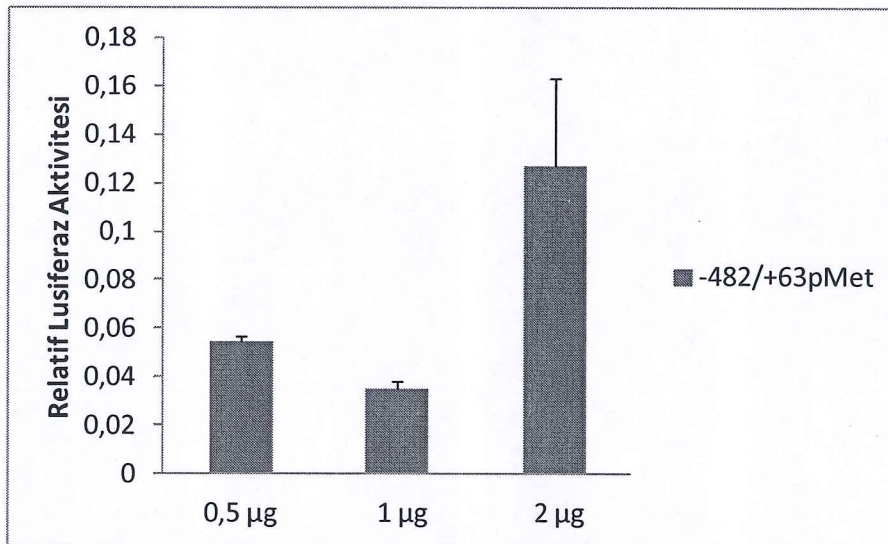
Tranfeksiyon deneyi 12 kuyulu plakalarda gerçekleştirildi. Transfeksiyon analizinde pMetLuc vektörüne klonlanmış promotor parçalarının yanı sıra, transfeksiyon etkinliğinin her kuyuda tespiti için fikir veren normalizatör olarak kullandığımız (0,5 µg) SEAP ekspresyon vektörü de hücrelere verildi. Ayrıca hücrelerde genel transfeksiyon durumunun tespiti için çok güçlü viral promotor ile ifade olan pMetLuc kontrol plasmiti de transfekte edildi. Aynı zamanda hiç bir promotor içermeyen pMetLuc reporter vektörü de arka plan olarak negatif kontrol olması açısından kullanıldı. (Şekil 3.33). Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak kuruldu. 48 saat diliminde 50 µL medyum alınarak -20°C'de muhafaza edildi. Bölüm 2.4.7.2'de belirtildiği üzere lusiferaz ve seap aktiviteleri belirlendi. Sonuçlar luminometrede

okutuldu. Lusiferaz aktivitesinin seap aktivitesine bölünmesiyle relatif lusiferaz aktivitesi belirlendi.



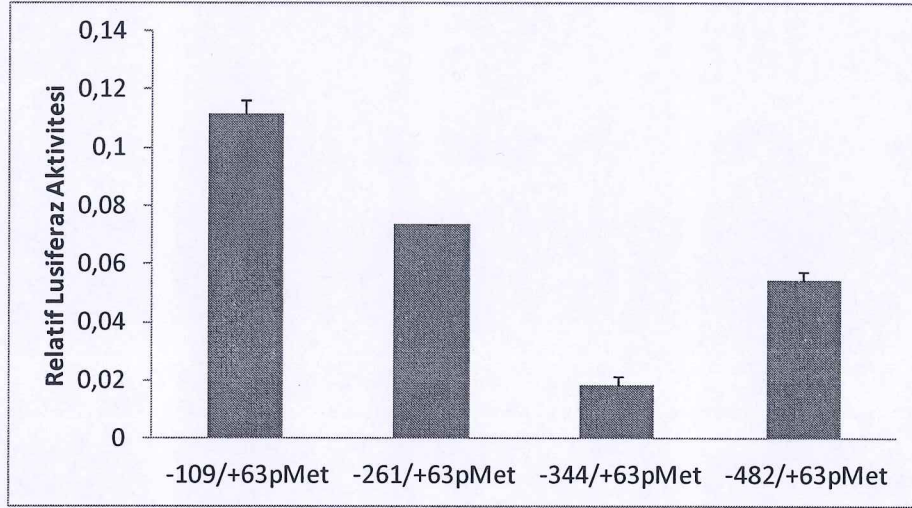
Şekil 3.33: Transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla pMetLuc Kontrol ve Reporter vektörlerinin Lusiferaz aktivitesini gösteren grafik

İlk olarak bazal aktivitenin belirlenmesi için -482/+63 pmet vektörü farklı konsantrasyonlarda (0,5 µg, 1 µg ve 2 µg) transfekte edilerek optimum DNA konsantrasyonu belirlendi (Şekil 3.34). Bu analize göre 0,5 µg promotor konsantrasyonu tüm transfeksiyon deneylerinde kullanıldı.



Şekil 3.34: -482/+63 promotor parçasının farklı konsantrasyonda transfekte edildikten sonra elde edilen lusiferaz aktivitesi

Bazal transkripsiyon aktivitenin belirlenmesinde farklı kısaltılarak oluşturulan promotor parçaları ayrı ayrı transfekte edildiğinde, -109/+63 pmet promotor parçasının en aktif promotor olduğu belirlendi (Şekil 3.35).



Şekil 3.35: URG-4 geni promotor parçalarının bazal aktivitelerinin gösterilmesi

3.1.7.1 Kotransfeksiyon Analizleri

URG-4 geni promotor bölgesinde olası bağlanma bölgesi olan bazı transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivitede oluşturdukları etki kotransfeksiyon deneyleri ile belirlendi. xC/EBP α ekspresyon vektörü Prof. Dr. Feray KÖÇKAR tarafından oluşturulmuştur. Diğer ekspresyon vektörleri Cardiff Üniversitesi Dr. Dipak Ramji tarafından temin edilmiştir. Transfeksiyonda kullanılan tüm plazmitler Bölüm 2.3.13 de belirtildiği üzere yüksek saflıkta büyük ölçekli plazmit DNA izolasyon kitiyle saflaştırıldı. Farklı ökaryot ekspresyon vektöründe klonlanmış bulunan hUSF, hSP1 ve xC/EBP transkripsiyon faktörleri ve farklı promotor parçaları birlikte 12'li plakalara paylaştırılmış olan hücrelere transfekte edildi. 1 μ g promotor parçaları, 0,5 μ g normalizatör SEAP kontrol plazmiti ve 2 μ g her ekspresyon plazmiti beraber kotransfekte edildi. Transfeksiyon etkinliği pMetLuc kontrol plazmiti ile gözlemlendi. Lusiferaz ve seap aktiviteleri Bölüm 2.4.7.2'de anlatıldığı şekilde luminometrede okutularak değerlendirildi. 48 saat sonunda transfeksiyon aktiviteleri okundu. Kotransfekte olan hücreler promotor bazal

aktiviteleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, hSP1 transkripsiyon faktörünün -109/+63 URG-4 promotor parçası haricinde diğer üç konstrakt üzerinde arttırıcı etkisinin olduğu tespit edildi (Şekil 3.36).

hUSF transkripsiyon faktörünün -344/+63 ve -482/+63 promotor parçalarının aktivitesini arttırdığı Şekil 3.37’de gösterilmektedir. xC/EBP α transkripsiyon faktörünün ise -344/+63 ve -109/+63 promotor parçalarının üzerinde istatistiki olarak önemli bir etki oluşturmadığı tespit edildi (Şekil 3.38).

3.1.7.1 Geçici aşırı ifade edilen (over ekspre) hUSF, hSP1 ve xC/EBP transkripsiyon faktörlerinin URG-4 mRNA düzeyine etkilerinin sqRT-PCR stratejisi ile belirlenmesi

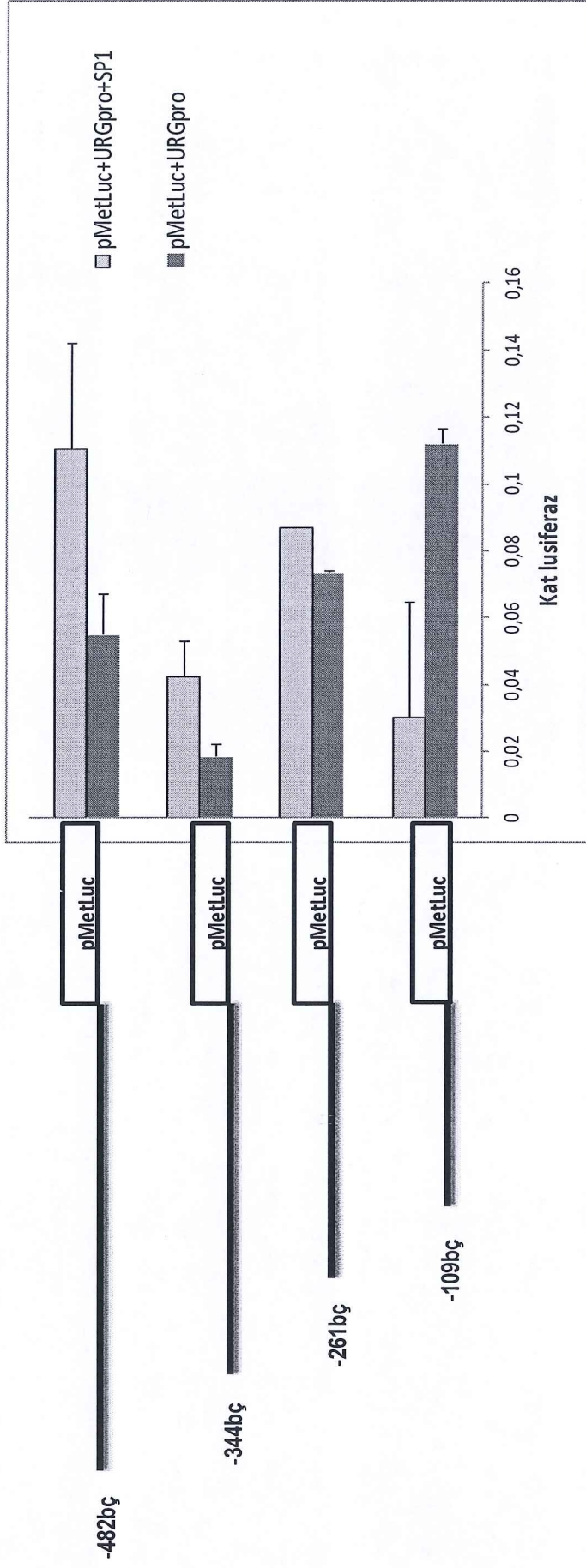
hSP1, hUSF ve xC/EBP α transkripsiyon faktörü transfekte edilmiş hücrelerden Bölüm 2.5.1, 2.5.2 ve 2.5.3 anlatıldığı şekilde izole edilen total RNA’dan cDNA sentezi yapıldı cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak özgün URG-4 ekspresyon primerleri ve normalizasyon amaçlı β -aktin primerleri ile (Tablo 2.20) yarı kantitatif sqRT-PCR çalışması Bölüm 2.5.5’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. PCR sonuçları % 2’lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 3.39 A)

Agaroz jel elektroforezi bantları IMAGE J programı kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler Microsoft Office Excel programında değerlendirildi.

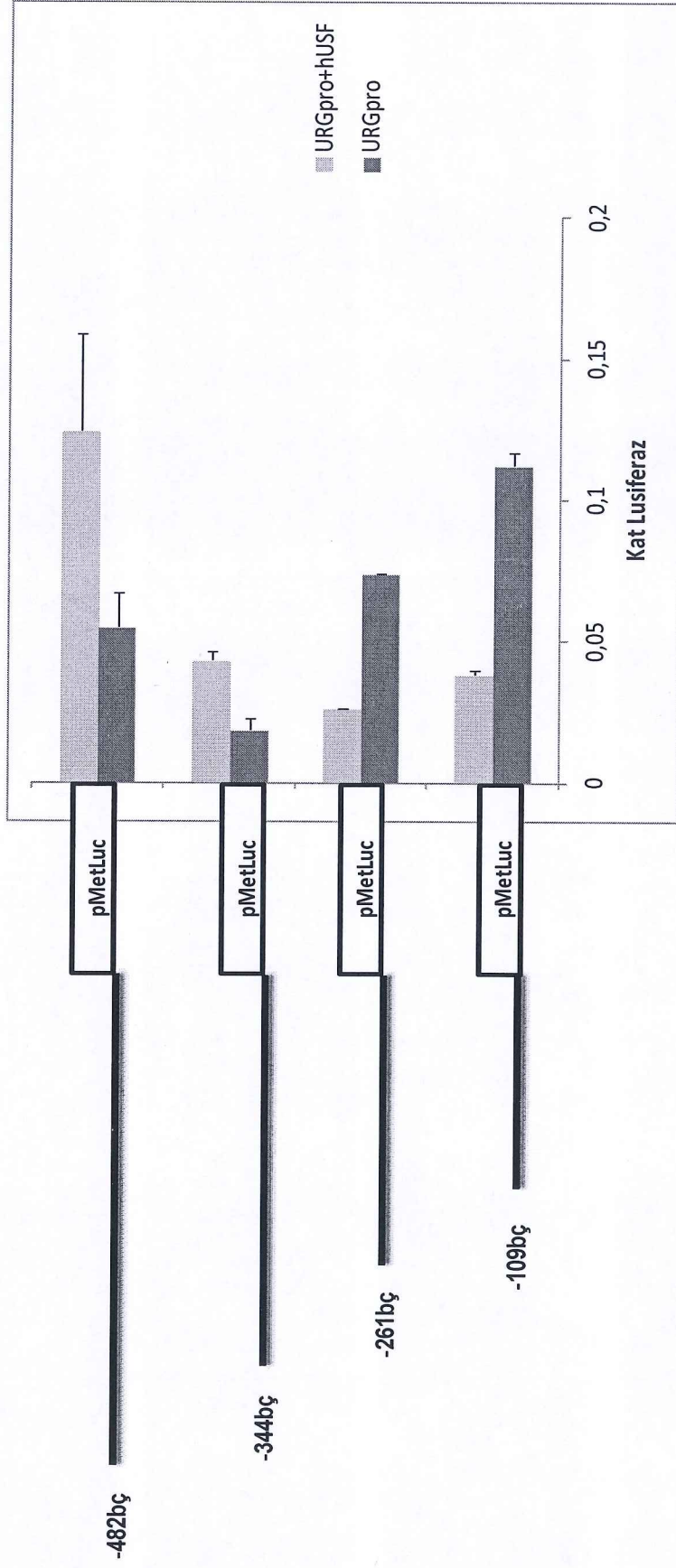
Yaptığımız analiz sonucunda hSp1 transkripsiyon faktörünün bütün saatlerde URG-4 genini mRNA seviyesinde arttırdığı tespit edildi. (Şekil 3.39 B)

hUSF transkripsiyon faktörü 24 saat sonunda URG-4 geninin ifadesini mRNA seviyesinde arttırırken 72 saat sonunda azaltıcı etki gösterdiği tespit edildi. (Şekil 3.39 C)

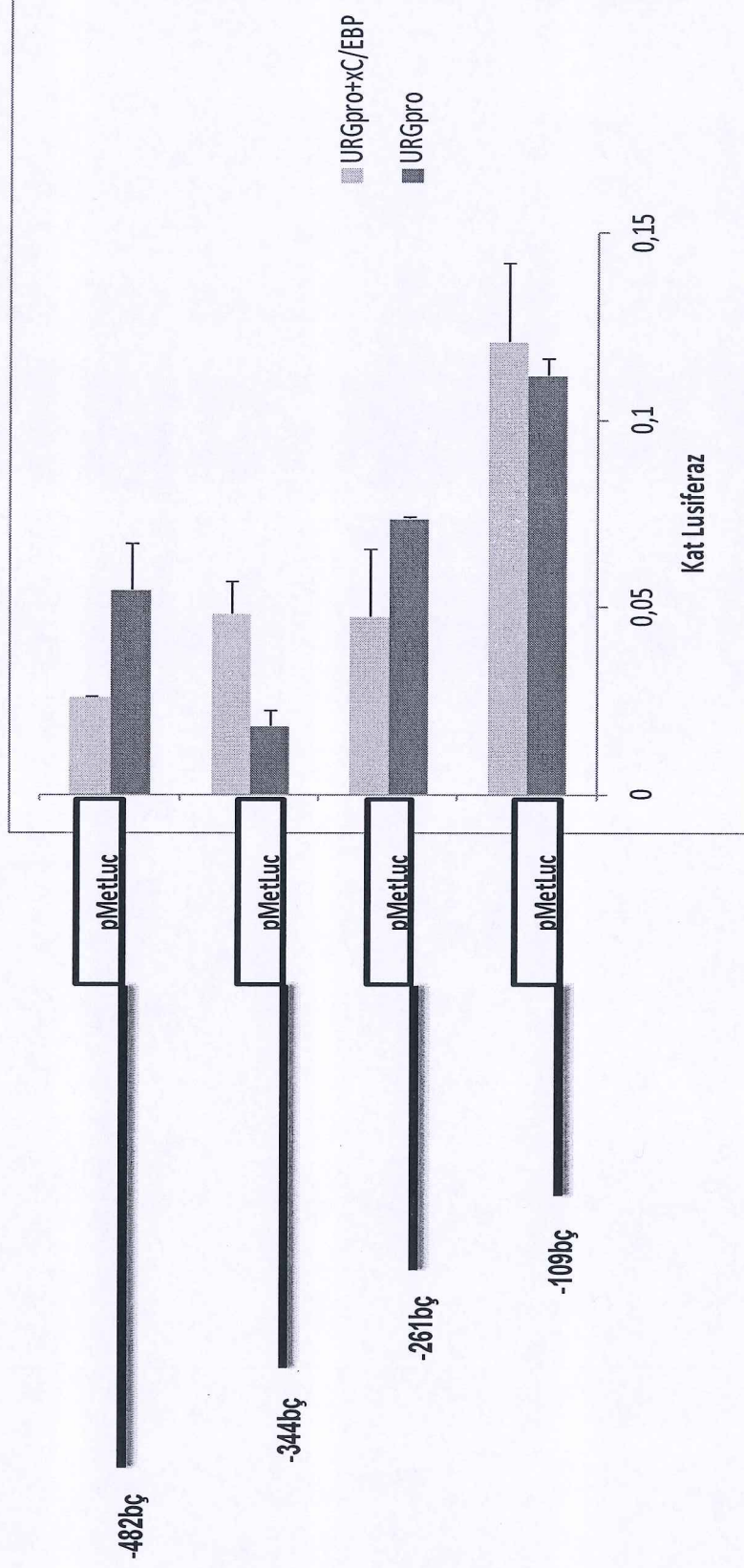
xC/EBP α transkripsiyon faktörü transfekte edilen cDNA’larda 72. saat sonunda azalan URG-4 ekspresyon seviyesi Şekil 3.39 D’de verildiği gibidir.



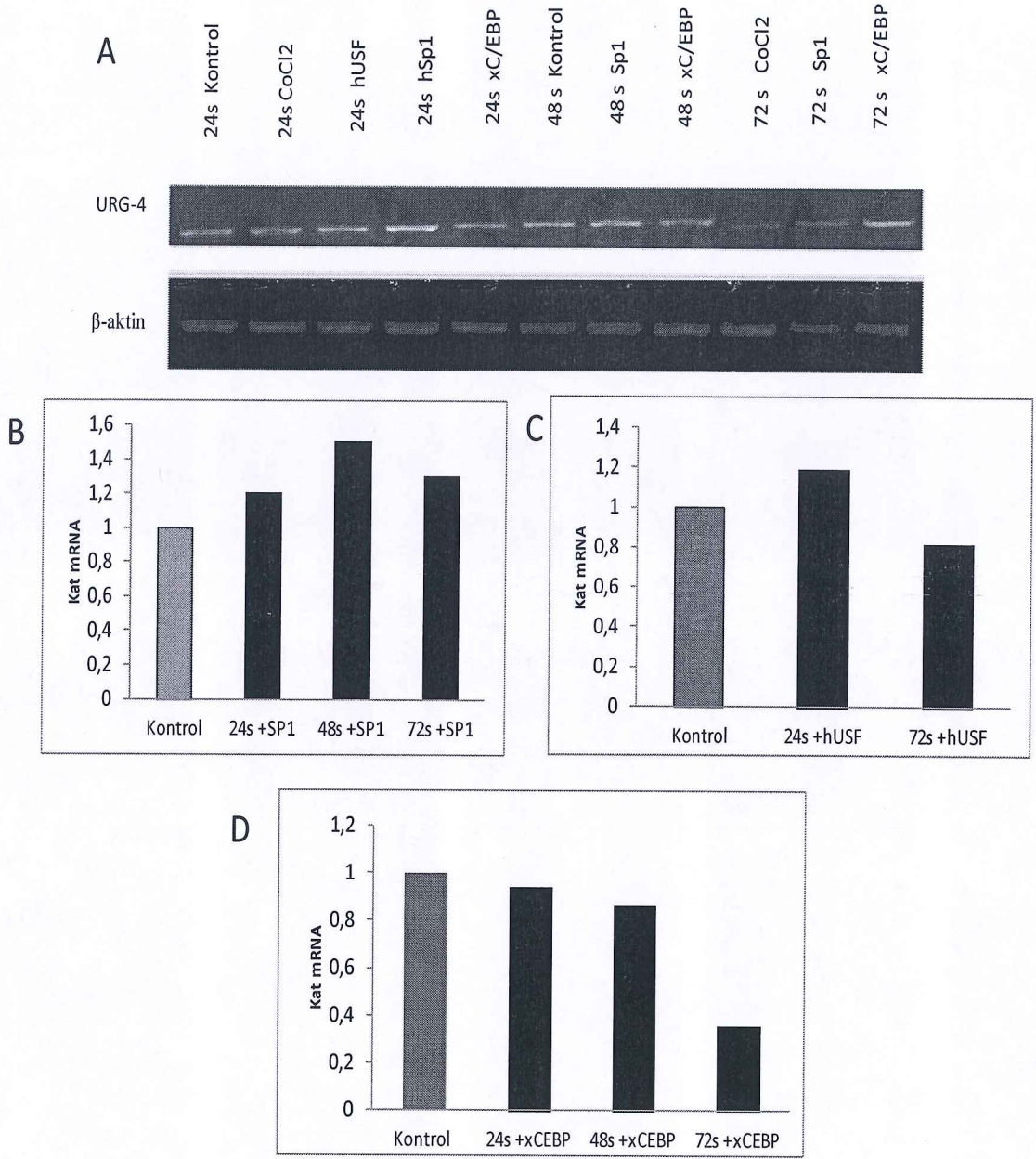
Şekil 3.36: hSp1 transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor parçalarıyla birlikte transfekte edilmesi ve promotor parçalarının aktivitesinin belirlenmesi



Şekil 3.37: hUSF transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor parçalarıyla birlikte transfekte edilmesi ve promotor parçalarının aktivitelerinin belirlenmesi



Şekil 3.38: xC/EBPα transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor parçalarıyla birlikte transkifte edilmesi ve promotor parçalarının aktivitetlerinin belirlenmesi



Şekil 3.39: A: hSp1, hUSF ve xC/EBP α uygulanmış Hep3B cDNA'ları kullanılarak URG-4 ve β -aktin primerleri ile yapılan RT-PCR analiz sonucu

A: % 2'lik agaroz jel elektroforez sisteminde görüntülenmesi, B: 24, 48 ve 72. saatlerde hSp1 tranfekte edilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak özgün URG-4 primerleri ile yapılan RT-PCR verilerinin İMAGE J programında değerlendirilmesi ve kat mRNA değerlerinin Microsoft Excel programında agrafiklendirilmesi, C: 24 ve 72. saatlerde hUSF tranfekte edilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak özgün URG-4 primerleri ile yapılan RT-PCR verilerinin İMAGE J programında

değerlendirilmesi ve kat mRNA değerlerinin Microsoft Excel programında grafiklendirilmesi, D: 24, 48 ve 72. saatlerde xC/EBP tranfekte edilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak özgün URG-4 ve β -aktin primerleri ile yapılan RT-PCR verilerinin İMAGE J programında değerlendirilmesi ve kat mRNA değerlerinin Microsoft Excel programında grafiklendirilmesi

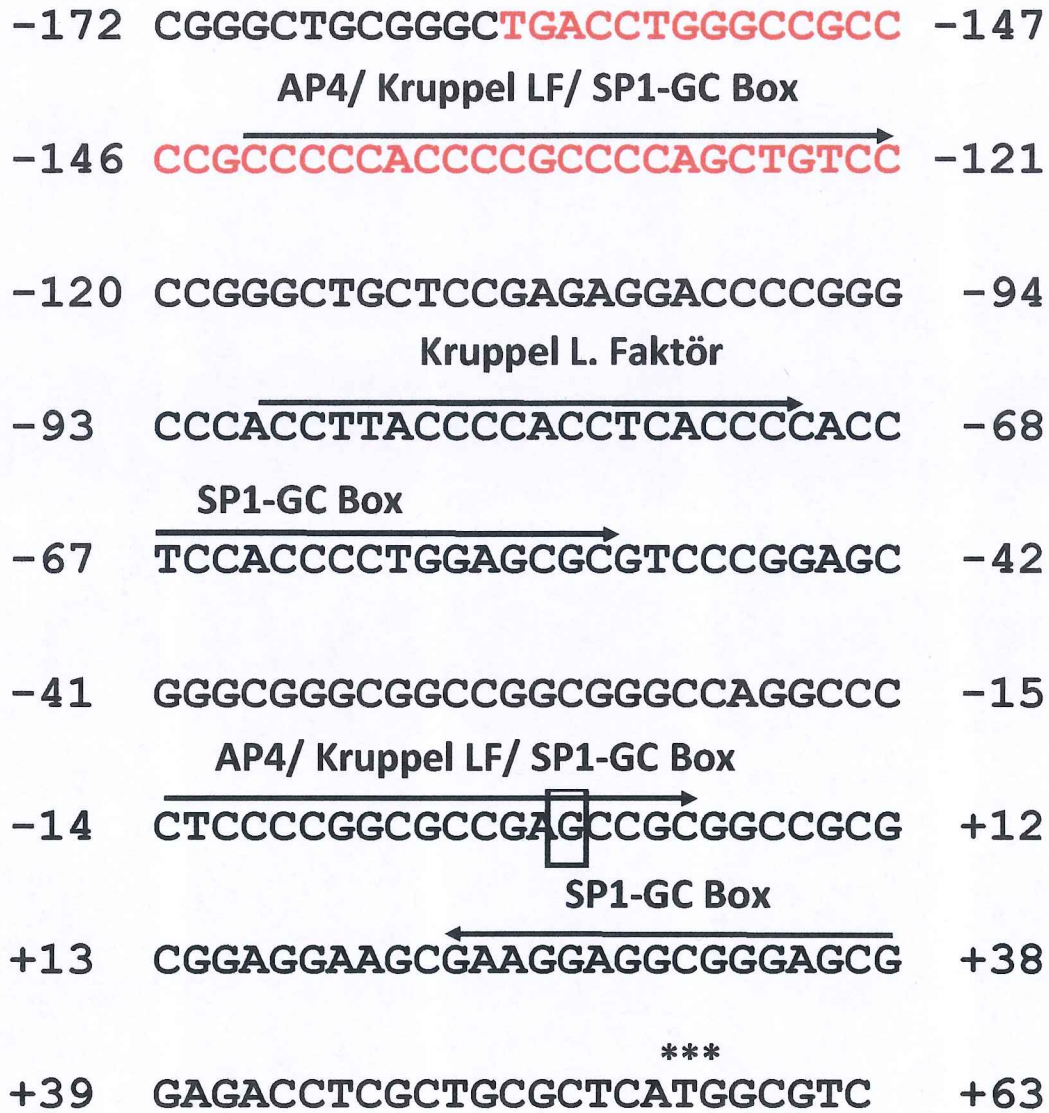
3.1.8 DNA-protein Etkileşim Çalışmaları (EMSA)

3.1.8.1 EMSA Primerlerinin Tasarlanması

URG-4 promotor bölgesine bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörleri Mathinspector programı kullanılarak tespit edildi (Bölüm 2.9). Bu teknik, Biotin etiketli proplar kullanılarak, Pierce LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit™ kullanılarak gerçekleştirildi. Primerler, yoğunlukla transkripsiyon faktörlerinin bağlanma gerçekleştirdiği bölgelere özgün olarak tasarlandı ve makrogen firmasından temin edildi. Primerler tasarlanırken 30 bç lik bir bölge alındı. Bu bölgenin ileri ve geri primerleri dizayn edildi. Tek zincirli olarak sentez ettirilen primerler bağlanma reaksiyonu ile çift zincirli hale getirildi (Bkz: Bölüm 2.7.2.2). EMSA çalışmalarında incelenen bölge Şekil 3.40'da gösterildiği gibidir. Ayrıca EMSA çalışmalarında bazı konsensus transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini içeren primerlerde özellikle yarışma deneylerinde dahil edilmiştir. Bu primer bilgileri Tablo 3.6'da belirtilmiştir.

Tablo 3.6: EMSA deneylerinde kullanılan primerler ve dizileri

Kullanılan primerler	5'-3' Dizileri
USFF	TCGACGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT
USFR	TCGACGGTGTAGGCCACGTGACCGGGTGT
C_EBP/F	TGCAGATTGCGCAAT
C_EBP/R	TGCATTGCGCAATCT
AP1F	GATCCTTCGTGACTCAGCGGGATCCTTCGTGAC
AP1R	CCGCTGAGTCACGAAGGATCCCGCTGAGTCACG
SP1F	TAGATTCGATCGGGGCGGGGCGAG
SP1R	GCCCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT



Şekil 3.40: EMSA'da İncelenen Bölge ve Buraya Bağlanan Transkripsiyon Faktörlerinin URG-4 Promotoru Üzerinde Gösterilmesi

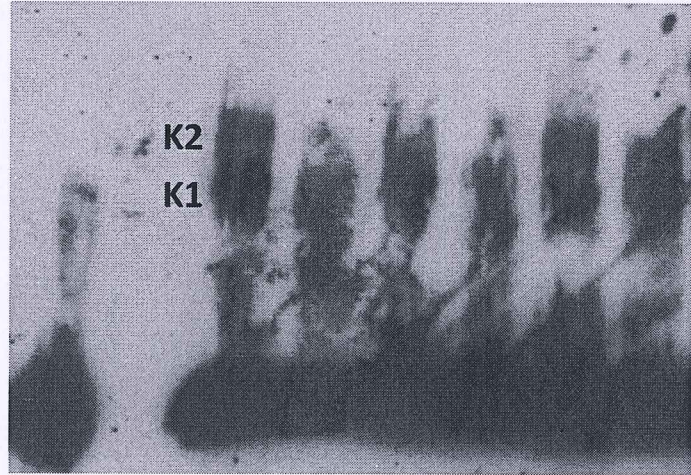
3.1.8.2 İnsan URG-4 Promotor Bölgesine Bağlanan Transkripsiyon Faktörlerinin EMSA Tekniği ile Belirlenmesi

Bölüm 2.7.1'de anlatıldığı şekilde Hep3B ve Saos-2 hücrelerinden nükleer ekstrakt hazırlandı. Öncelikli olarak Hep3B nükleer ekstraktlarında EMSA çalışmaları gerçekleştirildi. Bağlanmaların dokuya spesifik olup olmadığını

gösterebilmek amacıyla farklı hücre hattı olan Saos-2 hücrelerinde de EMSA deneyleri tekrarlandı. Nükleer ekstraktların konsantrasyonları Bölüm 2.6.1.3'de anlatıldığı şekilde belirlendi. Bütün EMSA deneylerinde 5 µg nükleer ekstrakt kullanıldı. Ticari olarak satın aldığımız Pierce Biotin 3' End DNA Labeling™ Kitinin önerdiği şekilde primerlerin biotinlenme işlemi gerçekleştirildi. Bağlanma reaksiyonları Bölüm 2.7.2.4'de anlatıldığı şekilde kuruldu ve reaksiyon 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bölüm 2.7.2.3'de anlatıldığı şekilde jelde yürütüldü. Membrana transfer ve develop aşamasından sonra elde edilen film fotoğraflanarak saklandı. Fotoğraf üzerinde oluşan süpershift bağlanmalar oklarla gösterildi ve "K" olarak isimlendirildi.

Saos-2 nükleer ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilen EMSA çalışması sonucunda K1 ve K2 DNA-protein kompleksleri oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.41). Kendisini ve SP1 dizisini 500 kat biyotinlenmemiş olarak reaksiyona eklediğimiz 3 ve 5. kuyularda oluşan kompleksin azaldığını gözlemledik. Fakat diğer transkripsiyon faktörlerinin URG-4 promotorunun bu bölgesini etkilemedikleri gözlemlendi.

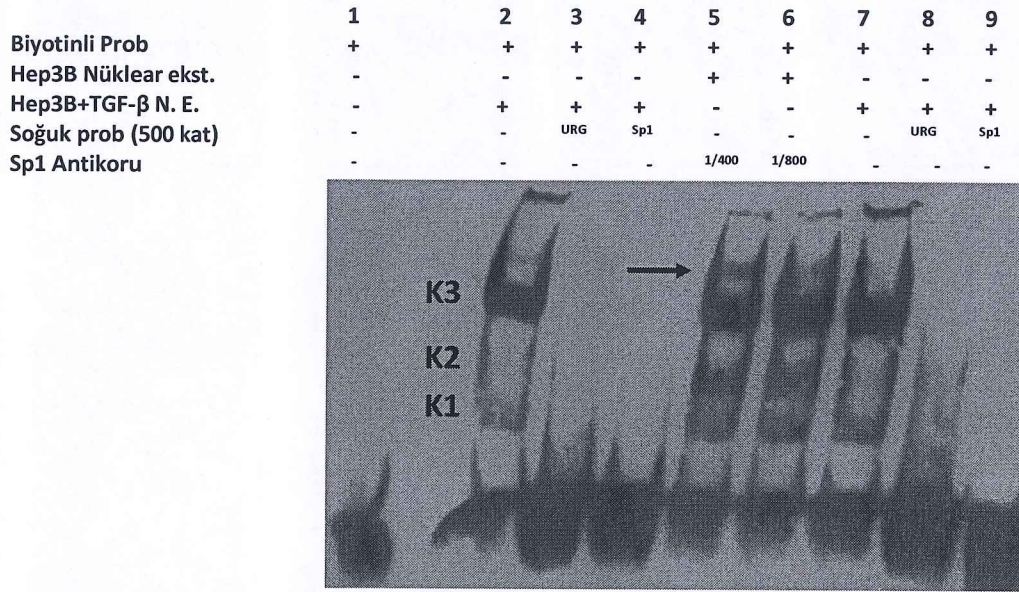
	1	2	3	4	5	6	7
Biyotinli Prob	+	+	+	+	+	+	+
Saos-2 Nüklear ekst.	-	+	+	+	+	+	+
Soğuk prob (500 kat)	-	-	URG	USF	Sp1	CEBP	AP



Şekil 3.41: Saos-2 Nükleer ekstraktı kullanılarak yapılan EMSA sonucu

EMSA çalışmaları sonucunda, SP1 transkripsiyon faktörünün Saos-2 kanser hücrelerinde URG-4 promotorunun incelenen bölgesine bağlanmakta olduğu gösterildi. Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörünün bağlandığını

göstermek amacıyla antikor süpershift uygulamaları yapıldı. Şekil 3.42’de gösterildiği üzere SP1 konsensus soğuk probunun bu bölgede kullanılan URG-4 dizisi soğuk probu kadar kompleks oluşumunu yok ettiği gözlemlendi. Ayrıca bağlanmanın spesifitesini doğrulamak amacıyla Hep3B bağlanma reaksiyonlarına 1/400 ve 1/800 dilüsyon oranlarında hSP1 antikor eklenildi. Antikor süpershift deneyleri için farklı bağlanma prosedürü uygulandı. Buna göre antikor eklenmesinden sonra bağlanma reaksiyonu 1 saat buzda ve takiben yarım saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Jel yürütülmesi ve transfer işlemlerine standart EMSA reaksiyonu şeklinde devam edildi. Bu işlemler Bölüm 2.7.2.5 ve 2.7.2.6’da detaylıca anlatıldı. Süper shift deneyleri sonucunda yukarıda daha büyük moleküler ağırlıkta süpershifted kompleks belirgin hale gelmiştir. Bu da DNA-protein etkileşiminin kesin olarak SP1 bağlanmasıyla oluştuğunu göstermiştir.

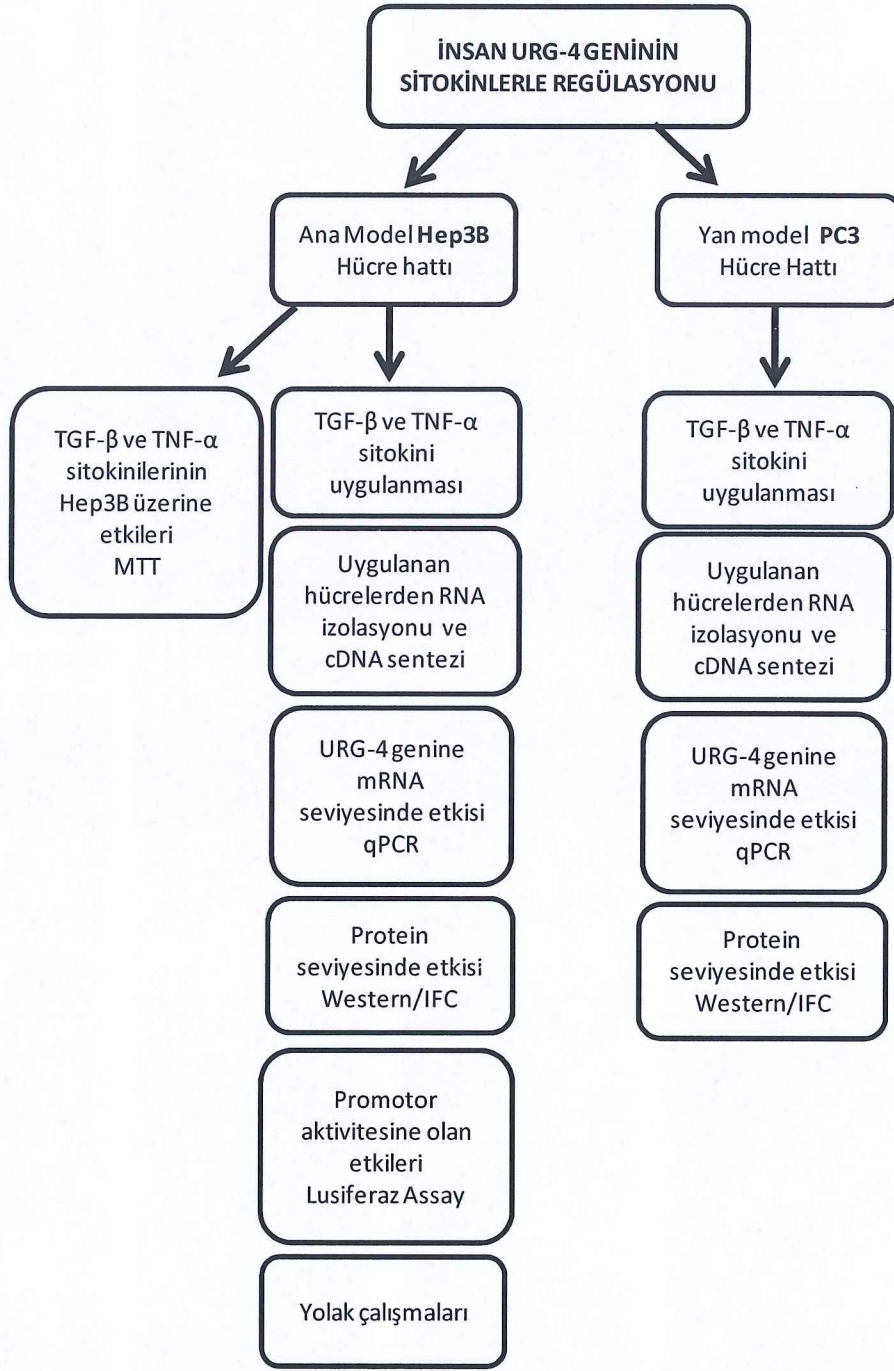


Şekil 3.42: Hep3B nüklear ekstrakt kullanılarak yapılan süper shift assay ve Sp1 antikor ile promotor bölgesi arasında oluşan bağlanmaların gösterilmesi

3.2 İnsan URG-4 Geninin Sitokinlerle Regülasyonu

URG-4 geninin TGF- β ve TNF- α sitokinlerince regülasyonunun belirlenmesi amacıyla Şekil 3.43’de ifade edildiği üzere çalışma basamakları uygulandı. Ana model hücre hattımız Hep3B hücreleridir çünkü URG-4 geninin ifadesi ilk olarak

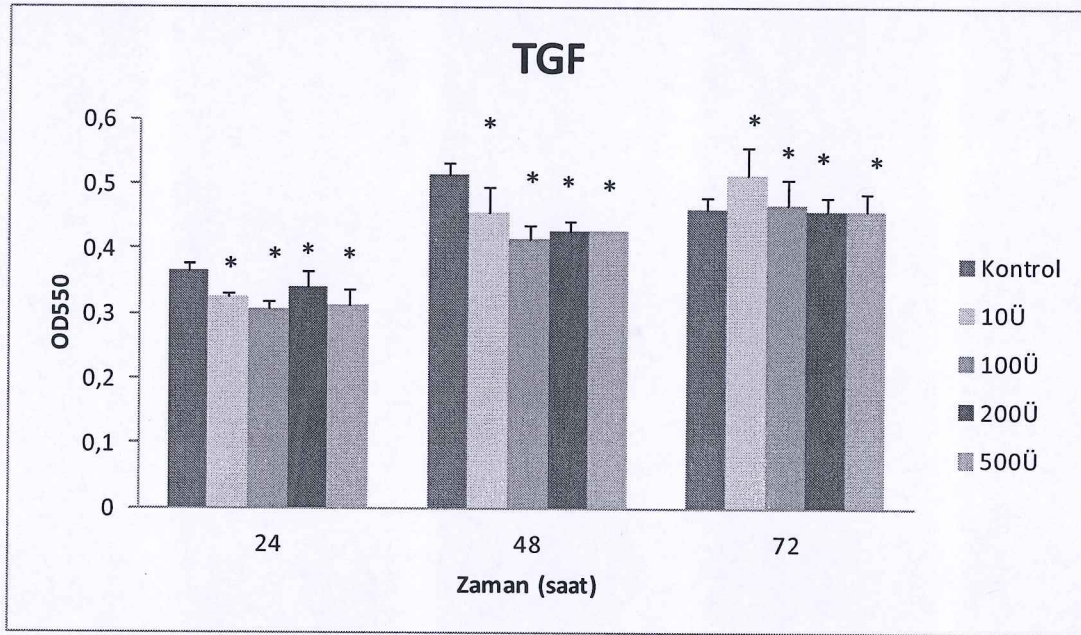
karaciğer hücrelerinde rapor edilmiştir. İlk olarak her bir sitokin dozunun ana model Hep3B hücre hattı üzerine proliferatif etkisi MTT ile belirlendi. Daha sonra uygulanan sitokin URG-4 geni mRNA üzerine etkisi real time PCR analizi ile bulundu. Protein düzeyindeki etki western blot analizi ve IFC analizi ile belirlendi. Ayrıca uygulanan sitokinlerin URG-4 promotor aktivitesindeki oluşturdukları etki transfekte edilmiş URG-4 promotor parçalarını taşıyan hücelere uygulanarak belirlendi. Sitokinler tarafından oluşturulan etkinin hangi hücre içi yol ile yapıldığının gösterilmesi amaçlı farklı hücre içi yolak inhibitörleri kullanılarak hem mRNA hemde protein düzeyindeki sitokin cevabının etkisi araştırıldı. Sitokin URG-4 mRNA ve protein üzerindeki etkilerinin sadece karaciğer hücrelerinde mi özgün olup olmadığının analizi için farklı bir doku modeli PC3 (Prostat Kanseri Hattı) hücre hattı üzerine de aynı çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 3.43: İnsan URG-4 geninin sitokinlerle regülasyonunu incelemek amacıyla izlenen basamakları gösteren akış diyagramı

3.2.1 TGF- β Sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

24 kuyucuklu plakalara paylaştırılmış olan hücreler bir gece inkübatörde % 0,1 BSA içeren medyunda bekletildikten sonra hücrelerin üzerine TGF- β sitokini 10 Ü/mL, 100 Ü/mL, 200 Ü/mL ve 500 Ü/mL dozlarda uygulandı. 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde sitokinin etkisi Hep3B hücreleri üzerinde MTT metodu uygulanarak çalışıldı. 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde sonuçlar 550 nm dalga boyunda ölçülerek Microsoft Excel programında grafiklendirildi. Bölüm 2.4.8’de anlatıldığı şekilde yapılan MTT analizi sonucunda bu sitokinin Hep3B hücrelerinin üzerinde özellikle 24 ve 48 saatlerde sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Sonuçlar Şekil 3.44’de verildiği gibidir. Deneyler 3 tekrarlı olup Minitab anova programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve $p < 0,05$ olan aralık anlamlı kabul edildi.



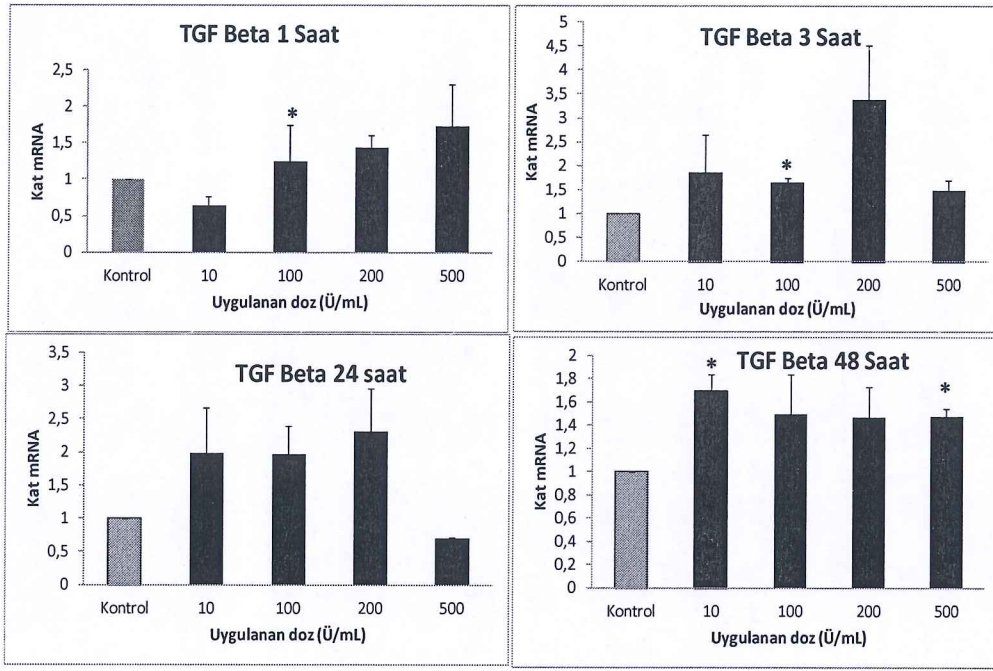
Şekil 3.44: Çeşitli dozlarda TGF- β sitokininin Hep3B hücreleri üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi

3.2.2 Hep3B ve PC3 Hücre Modelinde TGF- β Sitokininin Etkilerinin mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

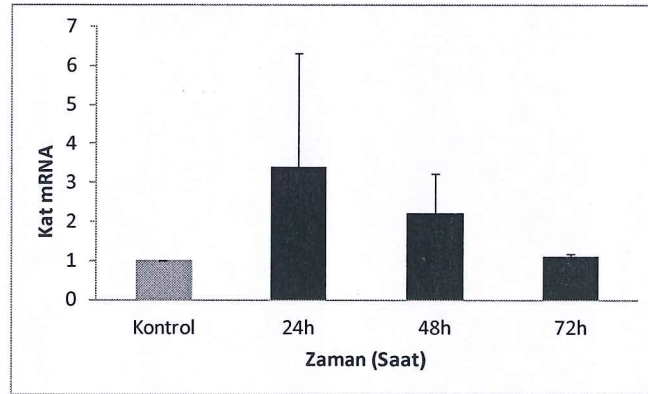
TGF- β sitokininin URG-4 geni ekspresyonuna etkisinin araştırılması amacıyla, ilk olarak hücreler 75 cm² flask yüzeyini % 90 kaplayıncaya kadar Bölüm 2.4'te anlatıldığı şekilde yetiştirildi. Kontaminasyon ve morfolojilerinde herhangi bir sıkıntı olmadığı gözlemlendikten sonra 25 cm² flasklar içerisine 2.000.000 hücre olacak şekilde % 0,1 BSA, % 1 glutamin içeren DMEM kullanarak paylaştırıldı. TGF- β sitokini 10, 100, 200 ve 500 Ü/mL olacak şekilde uygulandı. Sitokin uygulamadığımız hücre grubu kontrol olarak adlandırıldı. Sitokin uygulanmış olan hücreler 1, 3, 6, 24 ve 72. zaman dilimleri sonucunda Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. 1000 rpm'de 5 dk süresince santrifüjlenerek çöktürüldü. Elde edilen pelletlerden Fermentas RNA izolasyonu kitinin TM önerdiği şekilde RNA izolasyonu yapıldı. 1µg total RNA'dan Fermentas cDNA sentez kitinin TM önerdiği ve Bölüm 2.5.6'da anlatıldığı şekilde cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA kalıp olarak kullanılarak URG-4 geni spesifik primerleri ile Real time PCR yapıldı (Tablo 2.20). Aynı zamanda normalizasyon amaçlı insan β -2 mikroglobulin primerleri kullanıldı (Tablo 2.20). Elde edilen Ct değerleri Δ ct metodu ile analiz edildi ve istatistiksel olarak minitab anova (one way) programı kullanılarak değerlendirildi. Minitab anova istatistik programı ile yapılan istatistiksel analizler sonucu p<0,05 olan değerler anlamlı kabul edildi. Deneyler 3 tekrarlı yapıldı.

Sonuç olarak TGF- β sitokininin URG-4 genini pozitif yönde etki ederek gen ekspresyonunu erken ve geç saatlerde attırdığı tespit edildi. 100 Ü/mL TGF- β sitokini URG-4 geni ekspresyonunu anlamlı olarak 1 ve 3. saatlerde arttırırken, 10Ü/mL ve 500Ü/mL sitokin dozu 48. saatlerde genin ekspresyonunu arttırdığı tespit edildi (Şekil 3.46).

100 Ü/mL dozunda etkili olan TGF- β sitokininin aynı şekilde hepatoma olmayan PC3 hücreleri üzerine etkisinin arttırıcı yönde olduğu qRT-PCR analizi sonucunda tespit edildi. (Şekil 3.47)



Şekil 3.45: Hep3B hücre modelinde TGF- β sitokininin URG-4 geni üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi

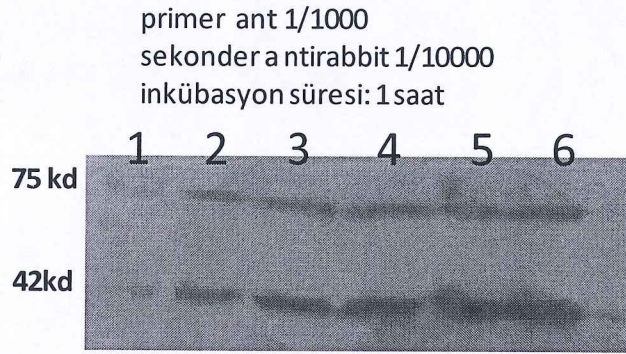


Şekil 3.46: PC3 hücre modelinde 100Ü/ml TGF- β sitokininin 24, 48 ve 72 saat zaman dilimlerinde URG-4 geni üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi.

3.2.3 Western blotting Tekniği Optimizasyon alışmaları

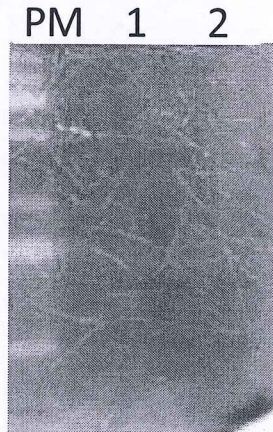
i. Kullanılan Primer ve Sekonder Antikorların Optimizasyon alışmaları

Dr. Mark Feitelson, Department of Pathology, Anatomy, and Cell Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA niversitesinden temin edilen URG-4 antikoru 1/1000 dilüsyon oranında hazırlanarak çalışıldı. URG-4 proteininin yaklaşık 103 kD büyüklüğünde olması gerekiyordu ancak doğru büyüklükte bantlar elde edilemedi (şekil 3.47, şekil 3.48 ve şekil 3.49).



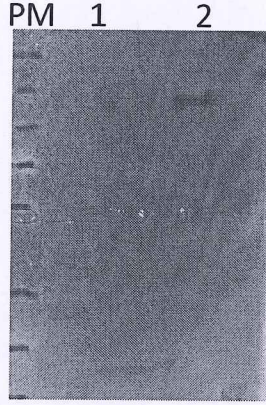
şekil 3.47: PM: prestained marker 26619, 1: 1000 hücre, 2: 2000 hücre, 3: 3000 hücre, 4: 4000 hücre, 5: 5000 hücre, 6:5000 hücre

primer ant 1/500
sekonder antirabbit 1/10000
inkübasyon süresi: 1 saat



şekil 3.48: PM: Fermentas 26619, 1: 10µg Hep3B hücre lizatu, 2: 20µg Hep3B hücre lizatu

primer ant 1/100
sekonder antirabbit 1/10000
inkübasyon süresi: 1 saat



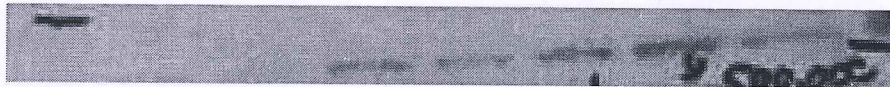
Şekil 3.49: PM: Fermentas 26619, 1: 20µg Saos-2 hücre lizati, 2: 30µg HT29 hücre lizati.

ii. Laemli Tamponu ve Hücre Sayısı Miktar Optimizasyonları

Protein lizati hazırlarken iki önemli parametre üzerinde değişiklik yapıp çalışmalara başlanmıştır. Bu parametreler hücre miktarı ve kullanılan Laemli tamponu miktarıdır (Bölüm 2.6.1.1). Protokolde Laemli lizis tamponu normalde 70 µl olarak önerilmesine rağmen, bu miktar örneklerin tam lizis olmasını sağlayamamakta ve jelle yüklenmesi aşamasında sıkıntı çıkarmaktaydı. Bu konu üzerine 250.000 ve 500.000 hücre olacak şekilde bir deney düzeneği kuruldu ve Laemli tampon miktarını 35 ve 210 µL arasında değiştirdik. Tablo 3.7’de kullanılan hücre ve laemli miktarları ve aynı zaman elde edilen protein konsantrasyonları özetlenmiştir. Deneye ait membran görüntüsü Şekil 3.50’de gösterildiği gibidir. Çalışma sonucunda laemli miktarının artması proteinin kalitesini arttırmıştır.

Beta aktin primer ant 1/1000
sekonder antirabbit 1/10000
inkübasyon süresi: 1 saat

PM 1 2 3 4 5 6



Şekil 3.50: Laemli tamponu gradient uygulamaları

PM: 26619, 1: 250.000 hücre+35µL Laemli Tamponu, 2: 250.000 hücre+ 70 µL Laemli Tamponu, 3: 500.000 hücre+ 70 µL Laemli Tamponu, 4: 500.000 hücre+ 100 µL Laemli Tamponu, 5: 500.000 hücre+140 µL Laemli Tamponu, 6: 500.000 hücre+210 µL Laemli Tamponu

Tablo 3.7: Kullanılan Hücre, Laemli Miktarları ve Proteinlerin Konsantrasyonları

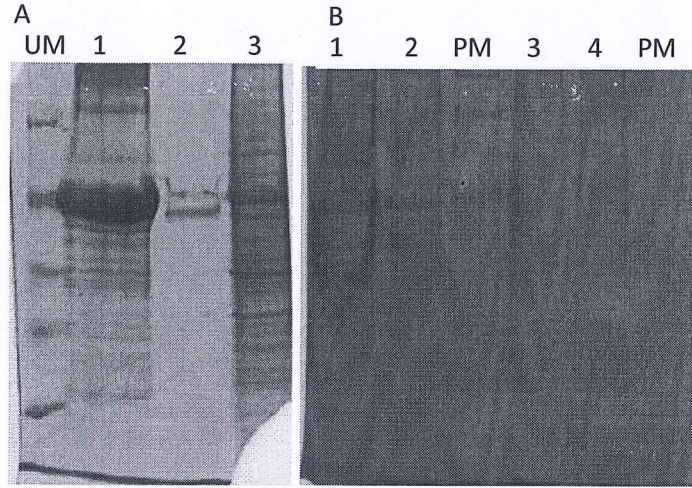
	Hücre Sayısı	Kullanılan Laemli Tamponu miktarı (µL)	Protein Miktarı (ng/µL)
1	250.000	35	1492
2	250.000	70	1424
3	250.000	140	1470
4	500.000	70	1682
5	500.000	100	1752
6	500.000	140	1728
7	500.000	210	1730

iii. Transfer Etkinliğinin ve Yüklenen Proteinlerinin Kalitesinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Transfer etkinliğinin ve proteinlerinin durumunun incelenmesine olanak sağlayan kontrol panel sistemi uygulandı. % 10 SDS jelinin ilk 4 kuyusu bu işlem için ayrılarak sırasıyla unstained marker (Fermentas), albumin proteini, β -galaktozidaz enzimi ve son kuyucuk ise diğer kuyucuklarda da yüklediğimiz hücre lizatını içerecek şekilde yükleme yapıldı. Bu bölüm transfer işlemine tabi tutulmadan direk olarak jeli boyama çözeltisi içerisinde alındı ve yarım saat boyandıktan sonra renk açma çözeltisi içerisinde bir gece boyunca çalkalanmak suretiyle bekletildi. Bu aşamadan sonra beyaz tabla üzerinde fotoğraflandı (Şekil 3.51A). Aynı zamanda transfer etkinliğinin anlaşılabilmesi açısından jeller transfer olduktan sonra da boyanıp görüntülendi (Şekil 3.51B).

Sigma Firmasından Temin edilen SAB2104235 kod numaralı URG-4 antikoru kullanılarak primer antikoru dilüsyon oranları, lizat miktarları ve

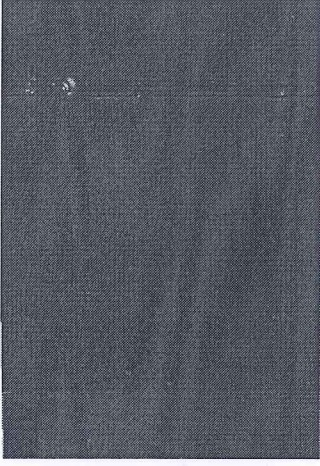
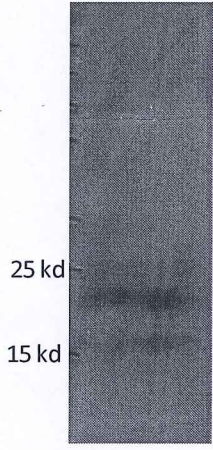
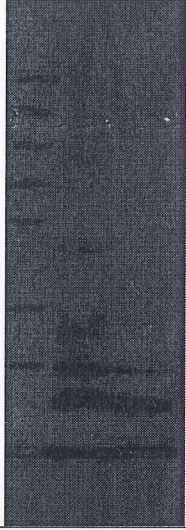
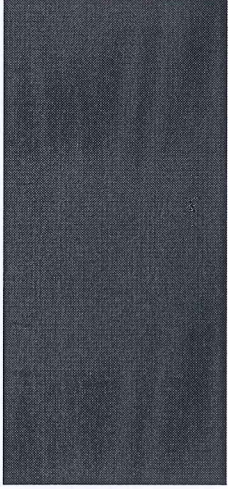
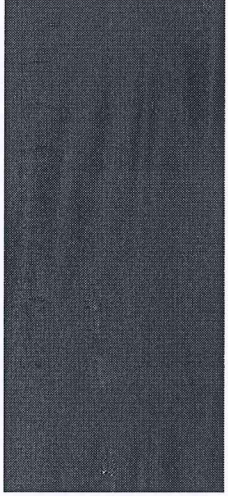
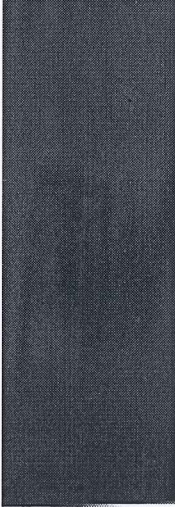
inkübasyon süreleri gibi optimizasyon çalışmaları yapılmış ancak başarı elde edilememiştir. (Tablo 3.8)



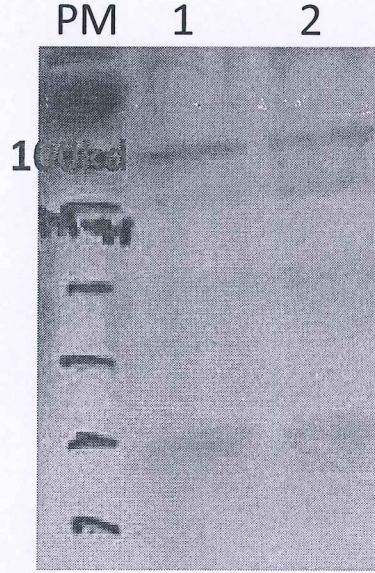
Şekil 3.51: Transfer olan ve olmayan jellerin görüntülenmesi

A: Kontrol panel, UM; unstained marker fermentas, 1: Albumin, 2: βgalaktozidaz, 3; 20 µg Hep3B lizati, B: Transfer etkinliğinin gözlenebilmesi amacıyla Jeli transfer ettikten sonra boyanarak fotoğraflanması 1; 20 µg Hep3B hücre lizati, 2;10 µg Hep3B hücre lizati PM; prestained page ruler 26619, 3;20 µg Hep3B hücre lizati, 4; 10 µg hücre lizati

Tablo 3.8: Temin edilen Sigma Antikoru ile Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

<p>Sigma URG-4 primer ant 1/1000 sekonder antirabbit 1/2000 inkübasyon süresi: 1 saat</p> <p>PM 1 2 3</p> 	<p>Sigma URG-4 primer ant 1/500 sekonder antirabbit 1/2000 inkübasyon süresi: 1 saat</p> <p>PM 1 2</p>  <p>25 kd 15 kd</p>	<p>Sigma URG-4 primer ant 1/500 sekonder antirabbit 1/2000 inkübasyon süresi: 16 saat</p> <p>PM 1 2</p> 
<p>PM; prestined page ruler 26619, 1; MG63 hücre lizati 40 µg, 2; Saos-2 hücre lizati 40 µg, 3: Hep3B hücre lizati 40 µg</p>	<p>PM: 26619, 1: 20 µg Hep3B hücre lizati, 2: 10 µg Hep3B hücre lizati</p>	<p>PM: 26619 marker ,1: 20 µg Hep3B hücre lizati, 2: 10 µg Hep3B hücre lizati</p>
<p>Sigma URG-4 primer ant 1/800 sekonder antirabbit 1/2000 inkübasyon süresi: 16 saat</p> <p>PM 1 2</p> 	<p>Sigma URG-4 primer ant 1/800 sekonder antirabbit 1/2000 inkübasyon süresi: 1 saat</p> <p>PM 1 2</p> 	<p>Sigma URG-4 primer ant 1/800 sekonder antirabbit 1/2000 inkübasyon süresi: 3 saat</p> <p>PM 1 2</p> 
<p>PM: 16619 marker 1; 20 µg Hep3B hücre lizati 2; 10 µg Hep3B hücre lizati</p>	<p>PM; prestained marker 26619, 1; 20 µg Hep3B hücre lizati, 2; 30 µg hücre lizati</p>	<p>PM; prestained page ruler 26619, 1; 50 µg Huvec hücre lizati, 2; 20 µg Huvec hücre lizati</p>

Abcam firmasından temin edilen ab103323 kod numaralı alınan URG-4 antikor önerdiği en yüksek konsantrasyonda (1/100 dilüsyon oranında) uygulandı ve bantlar ~100kD civarında gözlemlendi (Şekil 3.52).

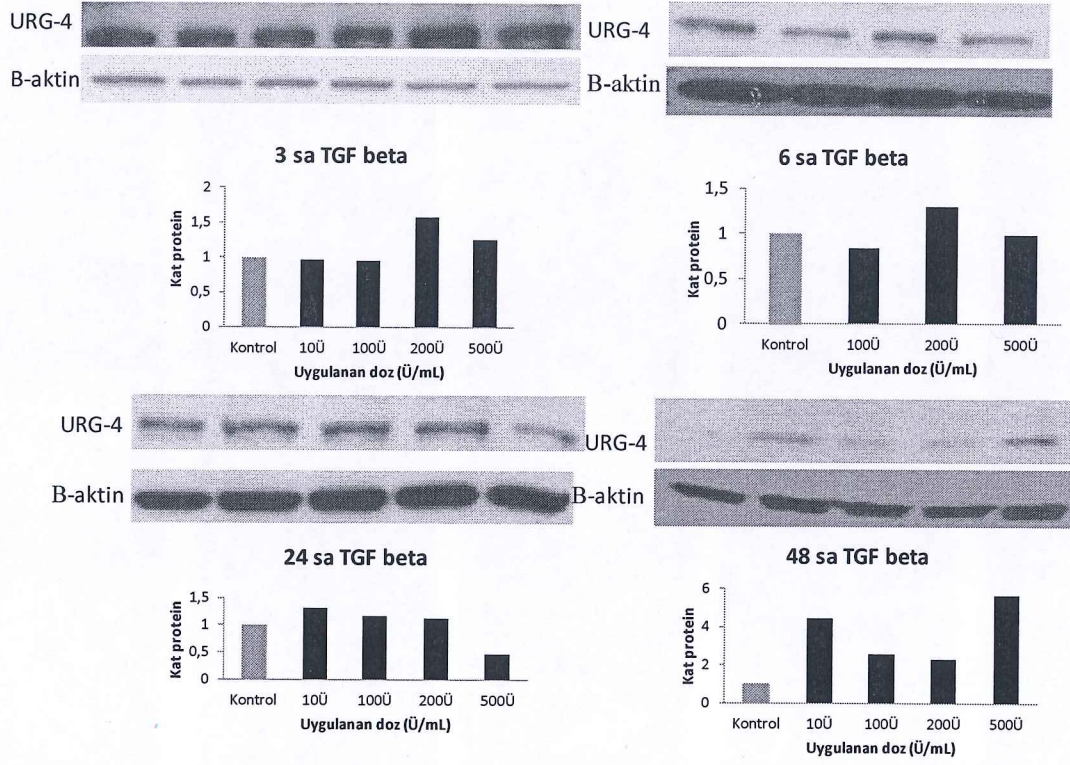


Şekil 3.52: PM Prestained Marker 26619, 1; 50 µg Hep3B hücre lizatı, 2; 50 µg Hep3B hücre lizatı

3.2.4 TGF-β Sitokininin, Hep3B ve PC3 Hücre Modellerinde URG-4 Protein Seviyesine etkisinin Western Blot Metodu Kullanılarak Gösterilmesi

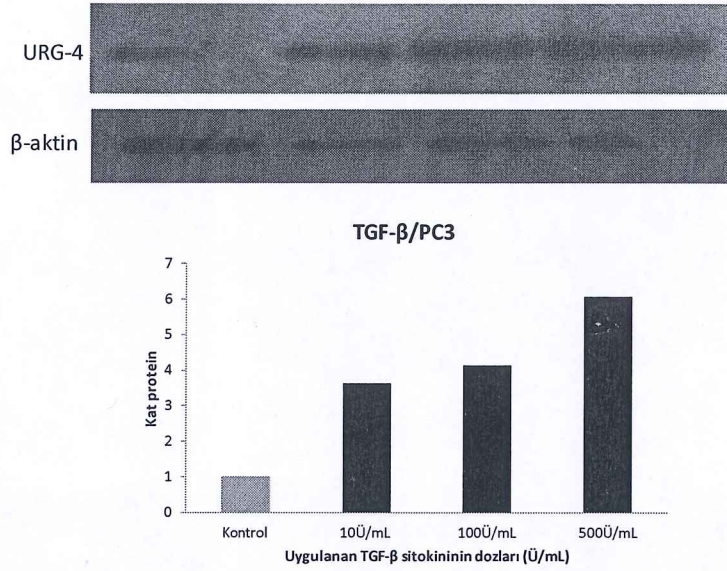
Bu amaçla Hep3B hücre soyu 6 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı (500.000 Hücre/kuyu). Kuyucuklara TGF-β sitokini son konsantrasyonu 10, 100, 200 ve 500 Ü/mL olacak şekilde uygulandı. Kontrol grubuna ise TGF-β sitokini uygulanmadı. Bu hücreler belirlenen saat dilimleri sonunda, Laemli tamponu içerisinde kazınarak lizat haline getirildi. Lizatlar poliakrilamid jel üzerine Bölüm 2.6.1.4.'de anlatıldığı şekilde yüklendi. 120V akımda yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü. Fragment olmuş proteinlerin PVDF membrana geçişinin sağlanması için transfer işlemi gerçekleştirildi. Transferden sonra membran ticari olarak satın aldığımız Anti-URG-4 (Abcam) antikorunu 1/100 dilüsyon oranında 1g süt tozu çözölmüş 20 mL 1 X TBST solüsyonunda ve normalizasyon için β-aktin (Sigma) antikorunu (1/5.000) ile muamele edildi. Her iki antikor içinde ikincil antikor 1/5.000 dilüsyon oranında antirabbit

antikoru kullanılarak işaretlendi. Otoradyografi ile filme aktarılması sonucu oluşan bantların analizi IMAGE J programı kullanılarak yapıldı ve Microsoft Office Excel programı ile grafiklendirildi.



Şekil 3.53: TGF- β sitokininin 3, 6, 24 ve 48 saat sonunda URG-4 geni üzerine etkisinin Hep3B hücre modelinde western metodu kullanılarak gösterilmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda 3. ve 6. saat dilimleri sonucunda 200 Ü/mL dozunda TGF- β sitokininin URG-4 genini protein seviyesinde arttırdığı bulunmuştur. Daha düşük dozlarda ise arttırıcı etkisinin geç saatlerde ortaya çıktığı gözlemlendi. (Şekil 3.53)



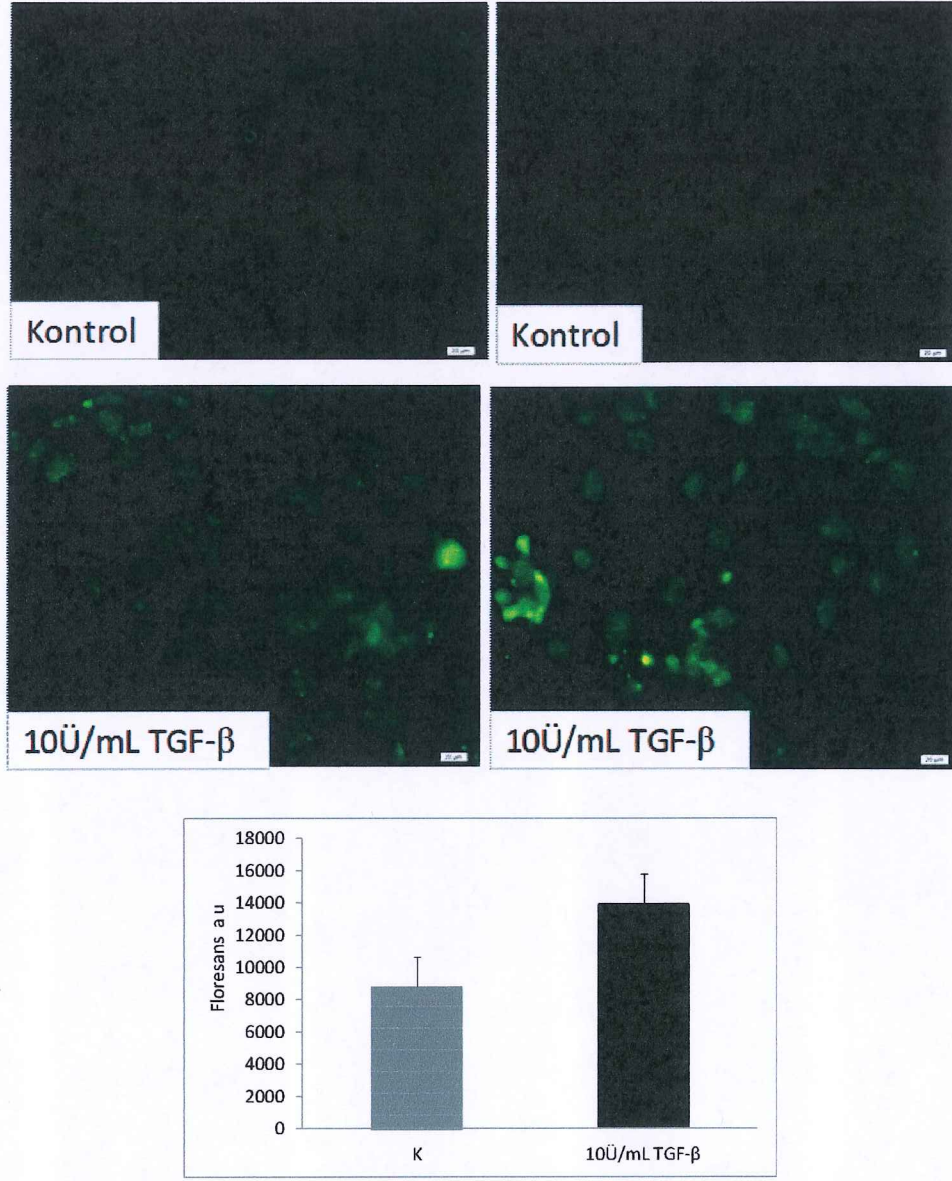
Şekil 3.54: TGF-β sitokininin URG-4 geni üzerine etkisinin PC3 hücre modelinde western metodu kullanılarak gösterilmesi

Hepatoma olmayan hücre hattı olarak seçilen prostat kanseri hücre hattında da aynı artırıcı etkiyi gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.54).

3.2.5 TGF-β sitokininin URG-4 Geni Üzerine etkisinin İmmun florasan Tekniği Uygulanarak Gösterilmesi

Kuyu başına 125.000 hücre olarak paylaştırılmış olan 24'lük plakalar bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra TGF-β sitokini 10 Ü/mL olacak şekilde kuyucuklara verilmiştir. 2 tekrarlı çalışılmıştır. Sitokin uygulamasından 24 saat sonrasında Bölüm 2.6.2'de belirtildiği şekilde İmmun Florasan analiz yapılmıştır. İmmun florasan yönteminde primer antikor 5 µg/ml uygulanarak, +4 °Cde 1 gece inkübasyona tabi tutulmuştur. Hücreler sekonder antikor Alexa Flour 488 ile 1 saat inkübasyondan sonra, aynı zamanda son konsantrasyonu 0,1 µg/mL olacak şekilde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) ile boyanmışlardır. Preparatlar Antifading mounting media™ ile kapatılarak preparatlar florasan mikroskopuyla görüntülenmiştir. Densitometrik analiz için en az 50 hücre sayılarak kontrol grubu ve TGF-β uygulanan hücreler IMAGE J programı ile densitometrik analize tabi tutulmuştur. Ortalama değerler alınarak standart sapmaları belirlenmiş ve grafikler çizilmiştir.

Çalışma sonucunda TGF- β sitokininin URG-4 protein düzeyinde arttırıcı etkisi doğrulanmıştır (Şekil 3.55).

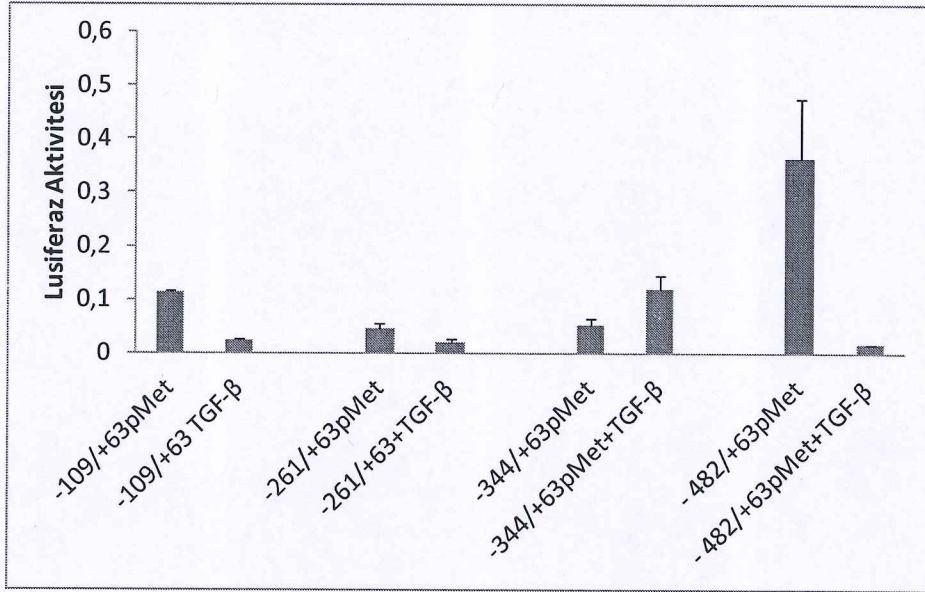


Şekil 3.55: TGF- β sitokininin URG-4 geni üzerine etkisi

10 Ü/mL TGF- β sitokini Hep3B hücre modeli üzerine etkisinin IFC metodu kullanılarak gösterilmesi ve verilerin IMAGE J programında değerlendirilmesi, Kontrol: TGF- β sitokini uygulanmamış hücre grubudur.

3.2.6 TGF- β sitokini ve İnsan URG-4 promotor parçalarına ait bazal aktiviteleri

URG-4 promotor parçaları Bölüm 2.4.7’de anlatıldığı şekilde Hep3B hücrelerine transfekte edildikten 6 saat sonra taze % 10 FCS’li medyum ile değiştirildi. Transfeksiyonun 24 saat sonrasında TGF- β sitokini 500 Ü/mL olacak şekilde uygulandı. Sitokin uygulandıktan 48 saat sonra luminometrede Lusiferaz ve Seap aktiviteleri ölçümleri Bölüm 2.4.7.2’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Çalışma sonucunda sitokinin -344/+63 URG-4 promotor parçasının bazal aktivitesini arttırdığı tespit edildi (Şekil 3.56). Diğer promotor parçalarında herhangi bir arttırıcı etki rastlanmadı. Bunun nedeni, özellikle -344 ile -482 arasında bu arttırıcı etkiyi bastırarak olan farklı transkripsiyon faktörü etkileşimlerinin bulunması olabilir. Bu bölgenin delesyonunun TGF- β cevabın transkripsiyonel düzeyde arttırdığını göstermektedir.

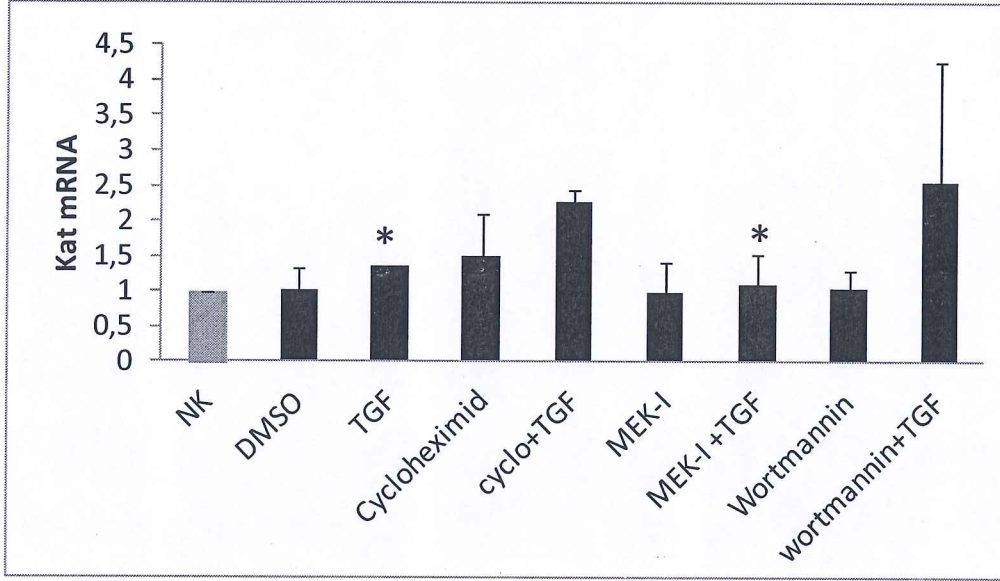


Şekil 3.56: URG-4 promotor parçaları transfekte edilen Hep3B hücreleri üzerine etkisi

3.2.7 TGF- β Sitokini ile Yolak Çalışmaları

Altılı plakalara 500.000 hücre olacak şekilde paylaştırılmış olan Hep3B hücreleri üzerine Bölüm 2.4.11'de anlatıldığı şekilde inhibitör uygulaması yapıldı. İnhibitör uygulandıktan 1 saat sonra TGF- β sitokini 500 Ü/mL dozda olacak şekilde gerekli kuyucuklara uygulandı. 6 saat sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak 1000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Elde edilen hücre peletlerinden RNA izolasyonu ve protein lizati yapıldı. Bu hücrelerden RNA izolasyonu RNA izolasyon kitinin önerildiği şekilde yapıldı ve total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak Real time PCR çalışması, URG-4 primerleri ve insan β -2 primerleri kullanılarak Bölüm 2.5.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve sonuçlar Minitab 14 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

Çalışma kapsamında kullanılan sikloheksimid; protein sentezi inhibitörü, Mek; MAPK inhibitörü, wortmanin ise PI3K inhibitörüdür. 500 Ü/mL TGF- β 6 saat uygulama sonucu URG-4 mRNA'sını arttırmıştır. Ayrıca aynı durum, sikloheksimid TGF- β uygulamasından elde edilmiştir. Özellikle sikloheksimid uygulaması protein sentezini inhibe ettiği için mRNA populasyonunun tam bir göstergesi olacağı unutulmamalıdır. MEK-1 uygulaması ise TGF- β artışını inhibe ederken Wortmanin uygulaması ise TGF- β cevabını inhibe edemediğini göstermektedir. TGF- β sitokini URG-4 mRNA'sını MEK-1 üzerinden etkilediği görülmektedir (Şekil 3.57).

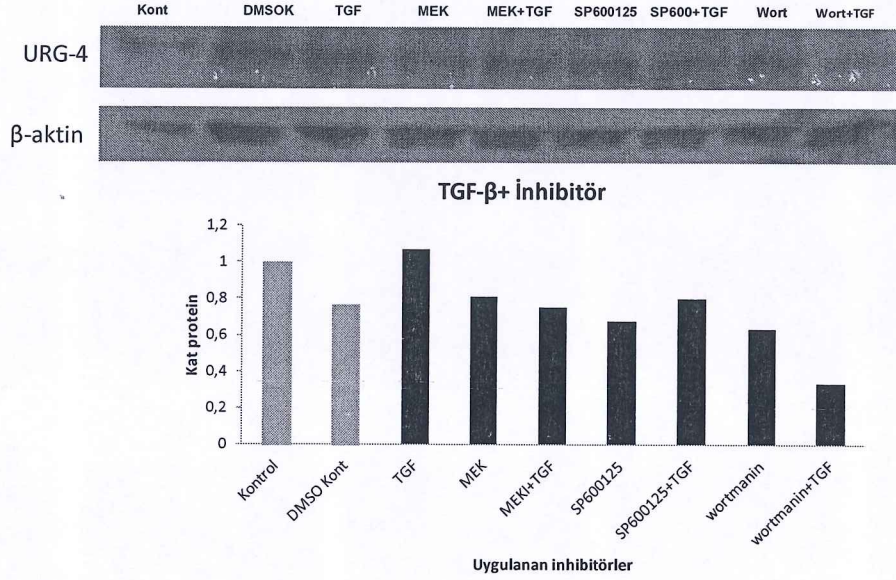


Şekil 3.57: Uygulanan inhibitörlerin URG-4 geni üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi

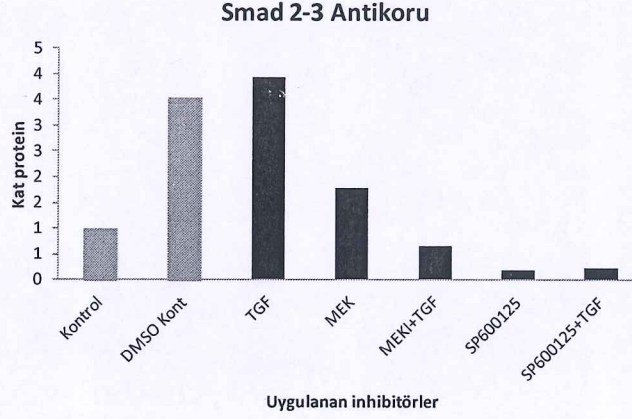
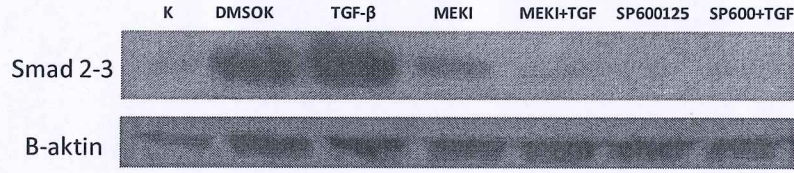
Protein seviyesinde etkiyi incelemek üzere elde edilmiş olan hücre pelletlerinden Laemli protokolü kullanılarak lizatlar hazırlandı. Son konsantrasyonu 50 µg olacak şekilde poliakrilamit jel üzerine yükleme yapıldı. Bölüm 2.6.1’de belirtildiği şekilde western metodu uygulandı ve spesifik URG-4 poliklonal antikor ile URG-4 proteini işaretlendi. Aynı membran β-aktin antikor kullanılarak normalize edildi. Sonuçlar IMAGE J programı kullanılarak analiz edildi. Yolak inhibitörlerine protein analizinde SP600125 inhibitörü de eklenerek çalışma planlanmıştır. SP600125 JNK inhibitörü olarak kullanılmıştır. Elde edilen densitometrik sonuçlar, TGF-β cevabının hem MEK1, hemde wortmanin yolunda azaldığını göstermektedir. JNK yolunda ise artmış TGF-β cevabın JNK inhibitörü ile inhibe olmadığını anlaşılmıştır (Şekil 3.58).

TGF-β cevabın Hep3B hücrelerinde gösterebilmek amacıyla inhibisyon çalışmalarında kullanılan membran 1/200 dilüsyon oranında Smad 2/3 antikor içeren 1XTBS+ Tween 20 ile muamele edildi ve TGF-β sitokini uygulanan Hep3B hücrelerinde bu proteinin ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Kullanılan inhibitörlerin DMSO’da çözülmesi nedeniyle aynı miktarda DMSO hücrelere uygulanmıştır (Şekil 3.59). Uygulanan DMSO’nun Smad2/3 proteinine TGF-β cevabı kadar indüklediği görülmektedir. DMSO’nun bazı hücre içi yolları aktive ettiği ve hücre

farklılaşmalarını indüklediği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin DMSO'nun eritpoetik farklılaşmayı p38 yolu üzerinden yaptığı Breig ve ark 2013 tarafından gösterilmiştir [73].



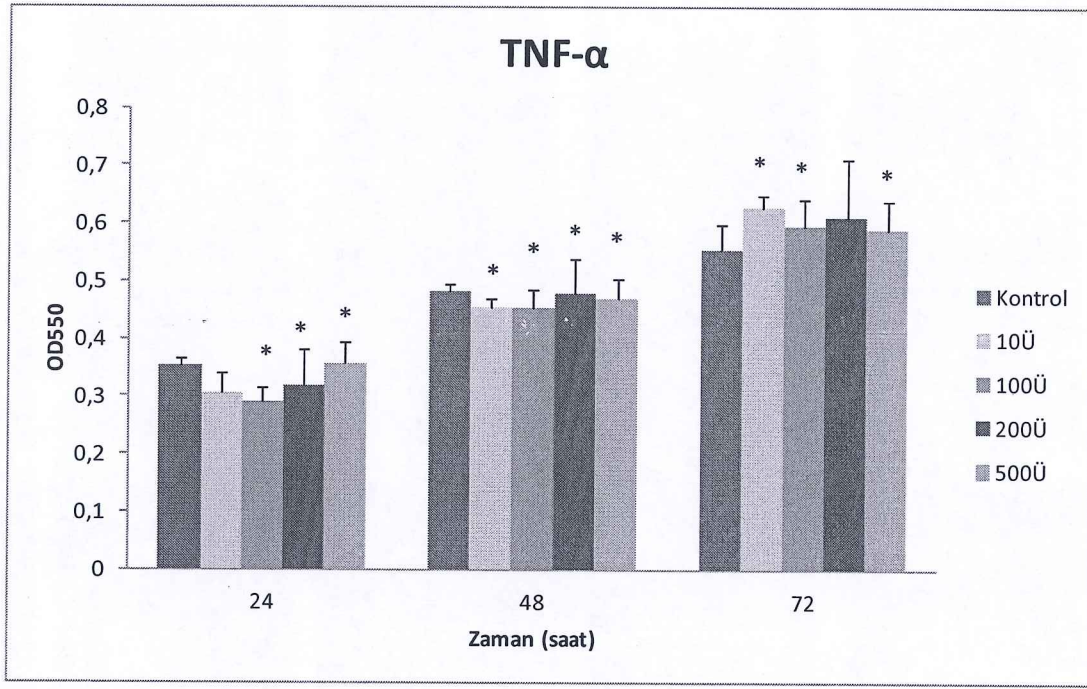
Şekil 3.58: TGF- β sitokini ve inhibitörlerin URG-4 geni üzerine etkisinin protein seviyesinde western metodu ile gösterilmesi.



Şekil 3.59: TGF- β sitokini ve çeşitli inhibitörlerin uygulanmış olduğu membranda Smad 2-3 transkripsiyon faktörünün protein seviyesinde ifadesinin gösterilmesi

3.2.8 TNF- α sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) Hücre Hattı Modelinin Üzerine Etkisinin İncelenmesi

% 0,1 BSA'lı medyum kullanılarak 24'lük plakalara paylaştırılmış olan Hep3B hücreleri bir gece inkübatörde yüzeye tutunmalarını için bekletildi. TNF- α sitokini son konsantrasyonu 10 Ü/mL, 100 Ü/mL, 200 Ü/mL ve 500 Ü/mL olacak şekilde uygulandı. MTT reaksiyonu Bölüm 2.4.8'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde sonuçlar 550 nm dalga boyunda ölçülerek Microsoft Excel programında grafiklendirildi. Deneyler 3 tekrarlı olup Minitab anova programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve $p < 0,05$ olan aralık anlamlı kabul edildi. Yapılan MTT analizi sonucunda sitokinin Hep3B hücreleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.60).



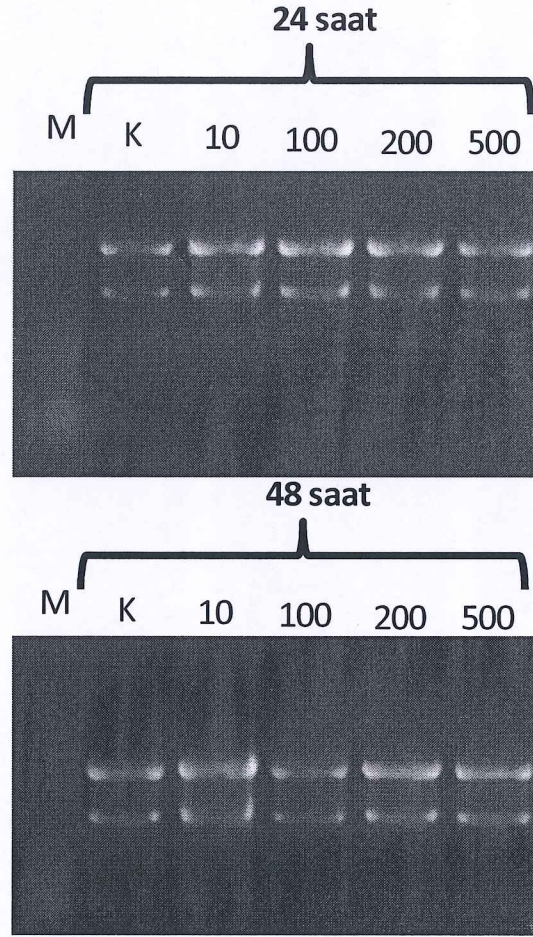
Şekil 3.60: Çeşitli dozlarda TNF- α sitokininin Hep3B hücreleri üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi

3.2.9 TNF- α sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) ve PC3 hücre hattı modelleri kullanarak URG-4 üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilmesi

TNF- α sitokini ve URG-4 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi mRNA seviyesinde incelemek üzere model olarak alınan Hep3B hücreleri 25 cm² flasklara 2.000.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. % 0,1 BSA'lı medyum kullanarak serum açlığına bırakılmış olan hücelere son konsantrasyonu 10, 100, 200 ve 500 Ü/mL olacak şekilde sitokin uygulandı ve bu hücelerden total RNA izolasyonu yapıldı (Bkz: Bölüm 2.5.1) (Şekil 3.61). 1 µg RNA kullanılarak elde edilen cDNA'lar spesifik URG-4 primerleri kullanılarak Real-Time PCR metodu uygulandı (Bölüm 2.5.6). Δ Ct değerleri livak metodu kullanılarak analiz edildi. Minitab ANAVO programı kullanılarak sonuçlar istatistiki açıdan değerlendirildi. p<0,05 olan değerler anlamlı olarak Kabul edildi. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

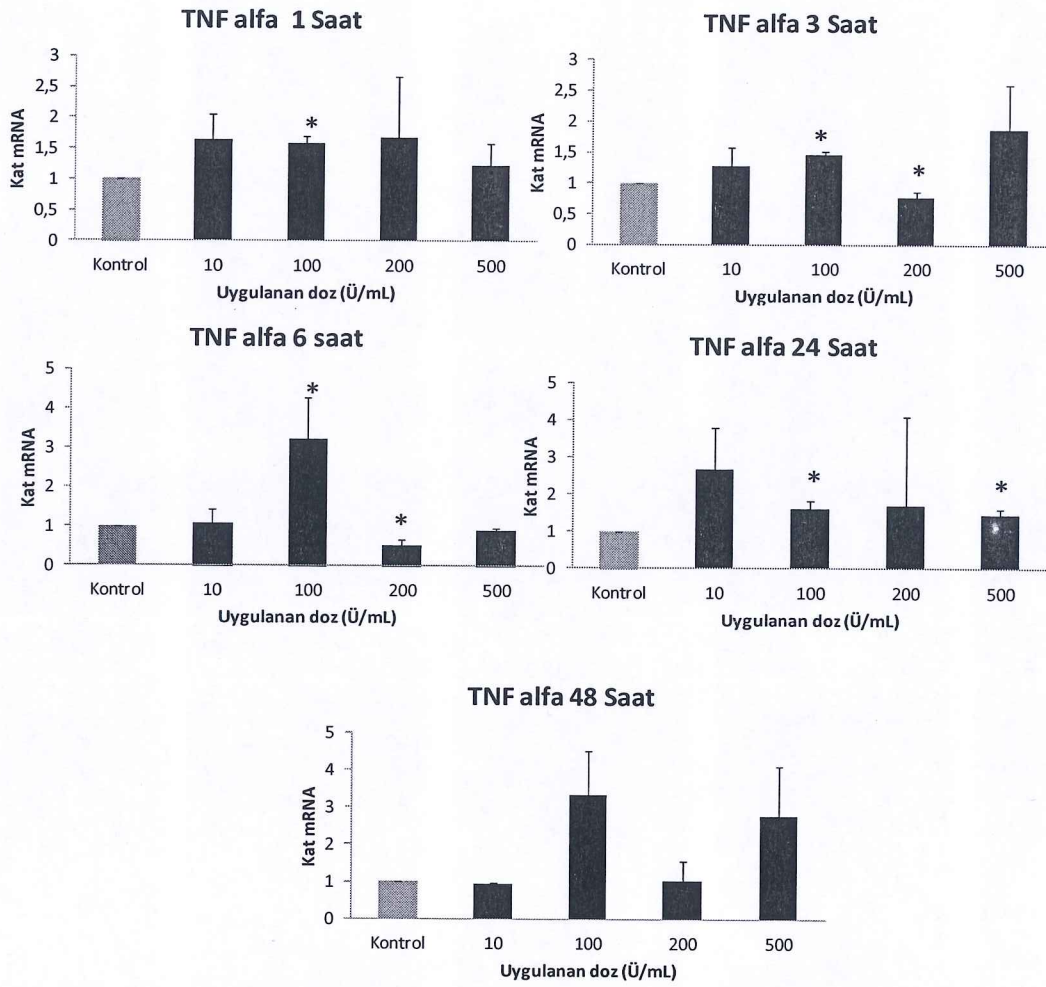
TNF- α sitokininin URG-4 genini bütün saatlerde özellikle 6, 24 ve 48. saatlerde belirgin olarak attırdığı gözlemlendi (Şekil 3.62).

Aynı arttırıcı etki hepatoma olmayan yan model olarak seçilen prostat kanseri hücreleri üzerinde de görüldü. Bu artış bize iki ayrı doku modelinde URG-4 geninin TNF- α sitokininin arttırıcı yönde ilişkisi olduğunu göstermektedir (Şekil 3.63).

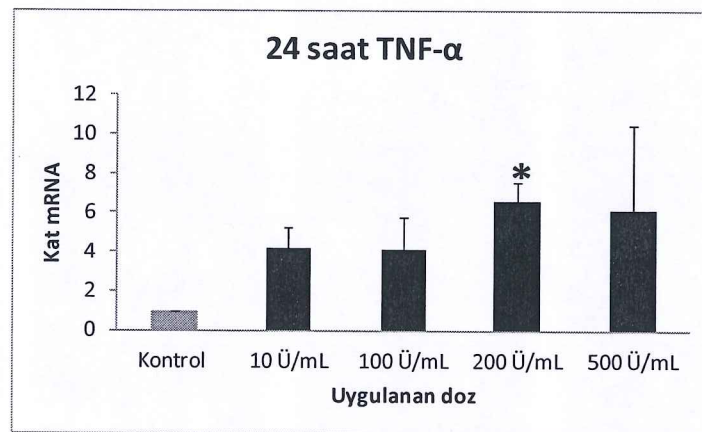


Şekil 3.61: RNA jel elektroforezi sonuçları

M: High Range Riboruler, 10 Ü/mL, 100 Ü/mL, 200 Ü/mL ve 500 Ü/mL dozlarda TNF- α uygulanmış hücrelerden izole edilen RNA'ya ait formaldehit jel elektroforez sonucu



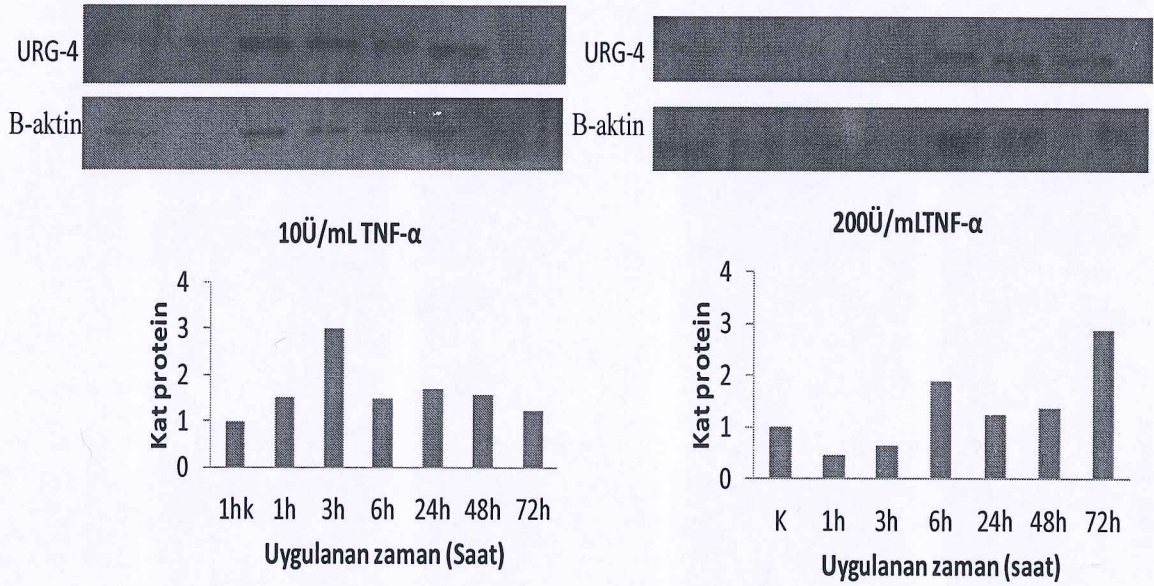
Şekil 3.62: TNF- α sitokininin URG-4 geni üzerine etkisinin Real-time metodu kullanılarak mRNA seviyesinde gösterilmesi



Şekil 3.63: TNF- α sitokininin 24 saatlik zaman diliminde PC3 hücre hattı üzerine etkisinin mRNA seviyesinde Real-Time metodu kullanılarak gösterilmesi

3.2.10 TNF- α Sitokininin Hep3B (Hepatoma Hücre Hattı) Hücrelerinde URG-4 Üzerine Etkisinin Protein Seviyesinde Gösterilmesi

Altılı plakalara paylaştırılmış olan Hep3B hücreleri üzerine 10 Ü/mL ve 200 Ü/mL dozlarda TNF- α sitokini uygulandı. Hücreler belirlenen saatler sonunda 500 μ L Laemli tamponu içinde hücre kazıyıcısı yardımıyla kazınarak ependorf içerisine alındı. 14.000 rpm'de soğutmalı santrüfuj kullanılarak +4°C'de 5 dk çöktürüldü. Protein miktarı qubit cihazı kullanılarak tespit edildi. 50 μ g protein lizatı % 10'luk SDS jele yüklenerek 120V akımda yürütüldü. Transfer işlemi ve antikorlarla muamele işlemleri Bölüm 2.6.1.5'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Otoradyografi ile görüntülenen filmler fotoğraflanarak saklandı. Oluşan özgün URG-4 ve β -aktin bantları IMAGE J analiz programı kullanılarak veriler sağlandı. β -aktin değerleri ile normalize edilen URG-4 değerleri Microsoft Excel proqramında grafiklendirildi.

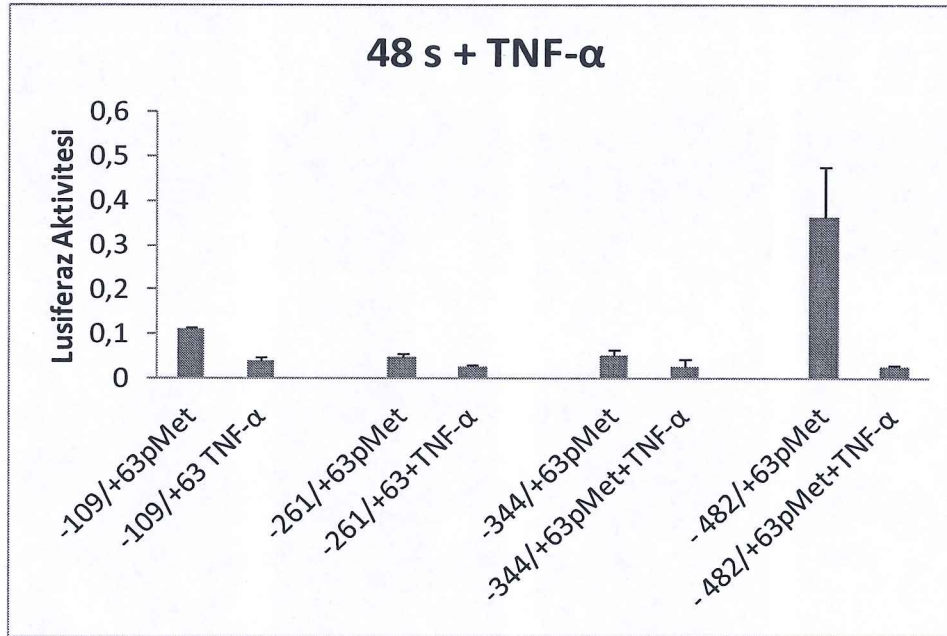


Şekil 3.64: 10 Ü/mL ve 200 Ü/mL TNF- α sitokini dozunun 1,3, 6, 24, 48 ve 72. zaman sonunda URG-4 geni üzerine etkisinin protein seviyesinde gösterilmesi.

Yapılan analizler sonucunda 10 Ü/mL dozda sitokinin erken ve geç saatlerde URG-4 genini arttırdığı, daha yüksek dozlarda ise 6, 24, 48 ve 72. saatlerde arttırıcı yönde etki ettiği tespit edildi (Şekil 3.64).

3.2.11 TNF- α sitokini ve İnsan URG-4 Promotor Parçalarına Ait Bazal Aktiviteleri

12 kuyucuklu plakalara paylaştırılmış olan hücrelere insan URG-4 promotor parçaları geçici olarak transfekte edildi. (Bkz: Bölüm 2.4.7.1). Transfekte ettikten bir gece sonra 200 Ü/mL dozda TNF- α sitokini uygulandı. Lusiferaz ve Seap aktiviteleri luminometrede ölçülerek veriler elde edildi. Edindiğimiz sonuçlara göre TNF- α sitokini insan URG-4 promotor dizilerinin bazal aktivitelerini azalttığı tespit edildi. TNF- α 'nın arttırıcı etkisini görememizin nedeni, bu promotor aralığında TNF α 'nın regüle ettiği bir transkripsiyon faktörünün URG-4 promotoru üzerine bağlanmamış olabileceği olarak yorumlanabilir (Şekil 3.65).



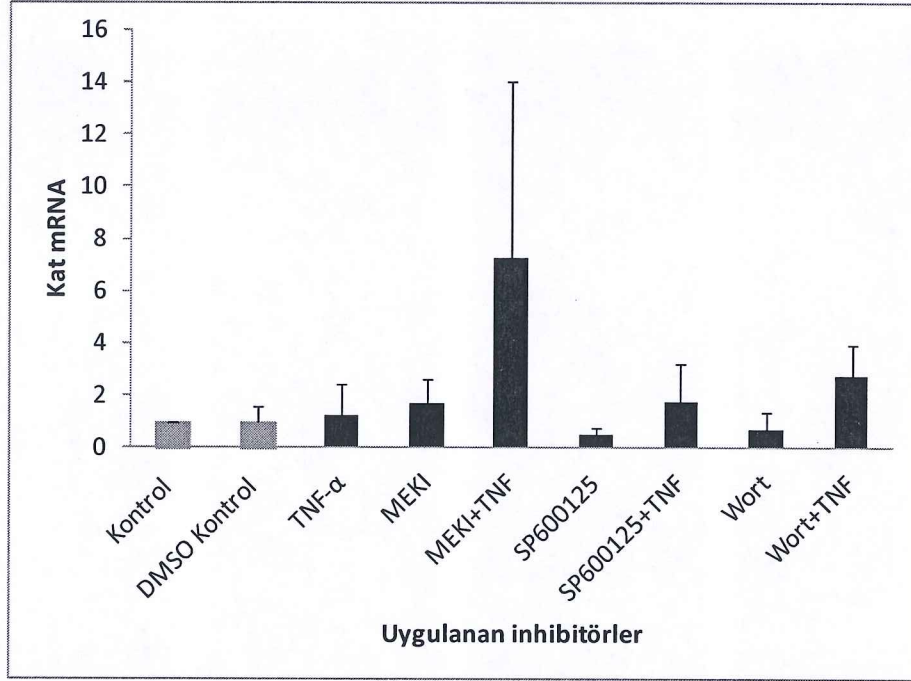
Şekil 3.65: İnsan URG-4 promotor parçaları transfekte edilen Hep3B hücreleri üzerine uygulanan 200 Ü/mL dozda TNF- α sitokininin etkisinin lusiferaz aktivitesi sonuçları

3.2.12 TNF- α sitokini ve İnhibisyon Deneyleri

Altılı plakalara 500.000 hücre olacak şekilde paylaştırılmış olan Hep3B hücreleri üzerine Bölüm 2.4.11'de anlatıldığı şekilde inhibitör uygulaması yapıldı. İnhibitör uygulandıktan 1 saat sonra TNF- α sitokini 200 Ü/mL dozda olacak şekilde

gerekli kuyucuklara uygulandı. 6 saat sonunda hücreler tripsinizasyonla kaldırılarak 1.000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Elde edilen hücre peletlerinden RNA izolasyonu ve protein lizatı yapıldı. Bu hücrelerden RNA izolasyonu RNA izolasyon kitinin önerdiği şekilde elde edilerek, total RNA'lerden cDNA sentezi gerçekleştirildi. (Bkz: Bölüm 2.5.4 ve 2.5.5).

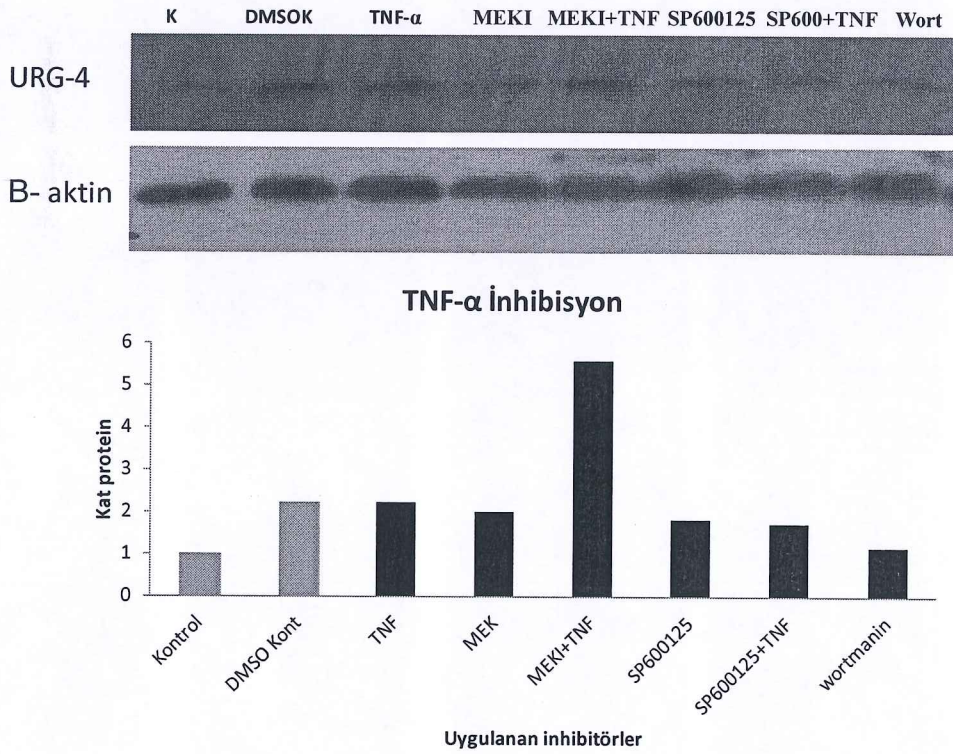
cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak Real time PCR çalışması, URG-4 primerleri ve insan β -2 primerleri kullanılarak Bölüm 2.5.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve sonuçlar Minitab 14 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Yapılan sqPCR sonucunda TNF- α sitokininin JNK yolak inhibitörünün uygulandığı cDNA'larda URG-4 ekspresyonunda azalış gösterildi (Şekil 3.66).



Şekil 3.66: TNF- α sitokini ve çeşitli inhibitörler uygulanmış cDNA'lar kullanılarak yapılan qRT-PCR verilerinin grafik üzerinde değerlendirilmesi

Protein seviyesinde etkiyi incelemek üzere elde edilmiş olan hücre peletlerinden Laemli protokolü kullanılarak lizatlar hazırlandı. Son konsantrasyonu 50 μ g olacak şekilde poliakrilamid jel üzerine yükleme yapıldı. Bölüm 2.6.1'de belirtildiği şekilde western metodu uygulandı ve spesifik URG-4 poliklonal antikorunu ile URG-4 proteini işaretlendi. Aynı membran β -aktin antikorunu kullanılarak

normalize edildi. Sonuçlar IMAGE J programı kullanılarak analiz edildi. Yapılan inhibitör deneylerinde Mek1 MAPK inhibitörü, wortmanin ise PI3K inhibitörüdür. Ayrıca SP600125 ise JNK yolu inhibitörü olarak bilinmektedir. 200 Ü/mL TNF- α 6 saat uygulama sonucu URG-4 mRNA'sı arttırdığı tespit edildi. MEK-1 inhibitörünün uygulaması TNF- α artışı inhibe etmezken, SP600125 uygulaması ise TNF- α cevabını inhibe etmektedir. Dolayısıyla çalışma sonucunda sitokinin JNK yolu üzerinden URG-4 geni ekspresyonunu etkilediği tespit edildi (Şekil 3.67).



Şekil 3.67: TNF- α sitokini ve çeşitli inhibitörlerin URG-4 ekspresyonu üzerine etkisinin western seviyesinde gösterilmesi

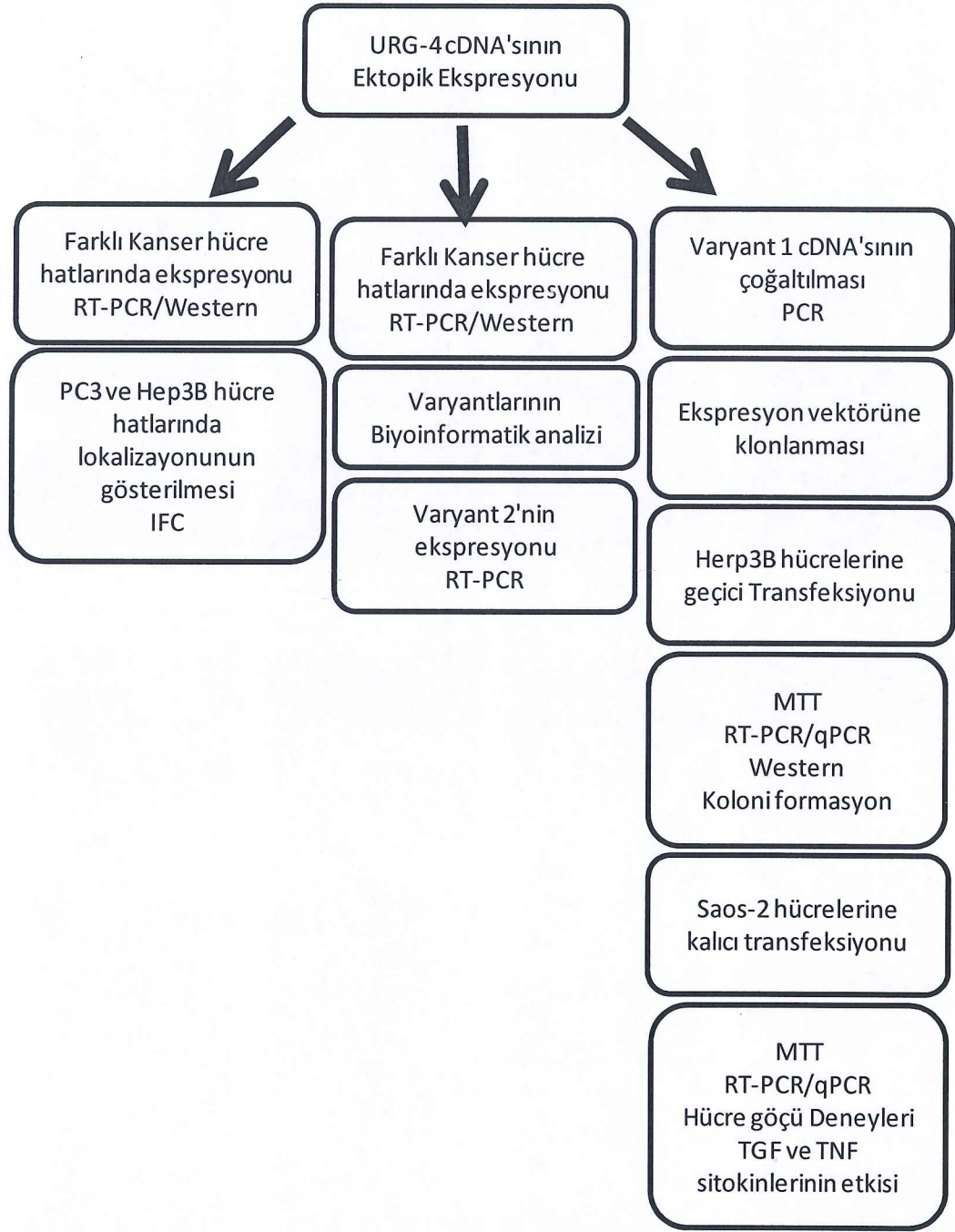
3.3 URG-4 cDNA'sının Ektopik ekspresyonu

İlk olarak 2002 yılında Karaciğer karsinomada HbxAg proteini ile indüklenen gen olarak klonlanan, URG-4 geninin özellikle kanserli hücrelerde Siklin D1 geninin ifadesini arttırdığı tespit edildi. URG-4 ile ilgili osteosarkom ve mide kanserlerinde ifadesine ait regülasyon çalışmaları yapıldığı ancak genin protein dizisi, var olan varyantlarının görevi ve hangi dokularda yer aldığı ile ilgili kısıtlı bilgiler bulunmaktadır. Ayrıca ifadesi gösterilen dokular da oldukça kısıtlıdır.

Bu nedenle tezin bu bölümünde, URG-4 cDNA çalışmalarına odaklanıldı. Şekil 3.69'da planlanan çalışmalar gösterilmektedir.

- (i) URG-4 geninin farklı kanserlerde ifadesine hem mRNA (RT-PCR) hemde protein düzeyinde (western blot) ekspresyon çalışmalarına yer verildi.
- (ii) URG-4 geninin hücresel yerleşiminin gösterilmesi için İmmun florasan analizi yapıldı. İmmun florasan analiz Hep3B ve PC3 hücrelerinde gerçekleştirildi.
- (iii) URG-4 cDNA varyantlarının biyoinformatik analizi yapıldığında farklılık gösteren *Varyant-2* ve *-4*' e ait spesifik primerler kullanılarak farklı kanserli hücrelerde RT-PCR ile ifadesi incelendi.
- (iv) Şu ana kadar proteinin fonksiyonu ile çok somut bir çalışma olmadığı için URG-4 proteini biyoinformatik olarak analiz edildi.
- (v) URG4 varyant1 cDNA'sı PCR'a dayalı teknikle klonlanarak, klonlanan cDNA dizi analizi doğrulandı.
- (vi) Ökaryotik ekspresyon vektöründe bulunan URG-4 cDNA kalsiyum fosfat tekniği ile Hep3B hücrelerine tranfekte edildi. URG-4 cDNA'sını aşırı ifade eden hücreler ve ifade etmeyen hücreler MTT analizi ile proliferasyonuna bakıldı. Ektopik ifade ettirilen URG-4 ekspresyonu RT-PCR, qRT-PCR ve western blot ile doğrulandı. Yine ektopik ifade edilen URG-4 geni koloni oluşturma potansiyelleri koloni formasyon deneyleri ile incelendi.

- (vii) Farklı bir doku modelindeki durumunu göstermek için URG-4'ün aşırı ifadesi kemik modeli olan Saos-2 hücrelerinde gerçekleştirildi. Ökaryot ekspresyon vektöründe bulunan URG-4 cDNA Fugene HD™ ile kalıcı transfekte edildi. Aşırı ifade edilen URG-4 ifadesi qRT-PCR ile doğrulandı. MTT analizi yapılarak hücre proliferasyonuna etkisi de belirlendi. Ayrıca aşırı ifade edilen URG-4'ün TNF- α ve TGF- β etkisine olan katkısı değerlendirildi. Ayrıca kalıcı transfekte edilen hücrelerde nüklear ve sitoplazmik protein ekstraksiyonu hazırlanarak western blot analizinde URG-4 proteinini hücresel lokalizasyonu tespit edildi.

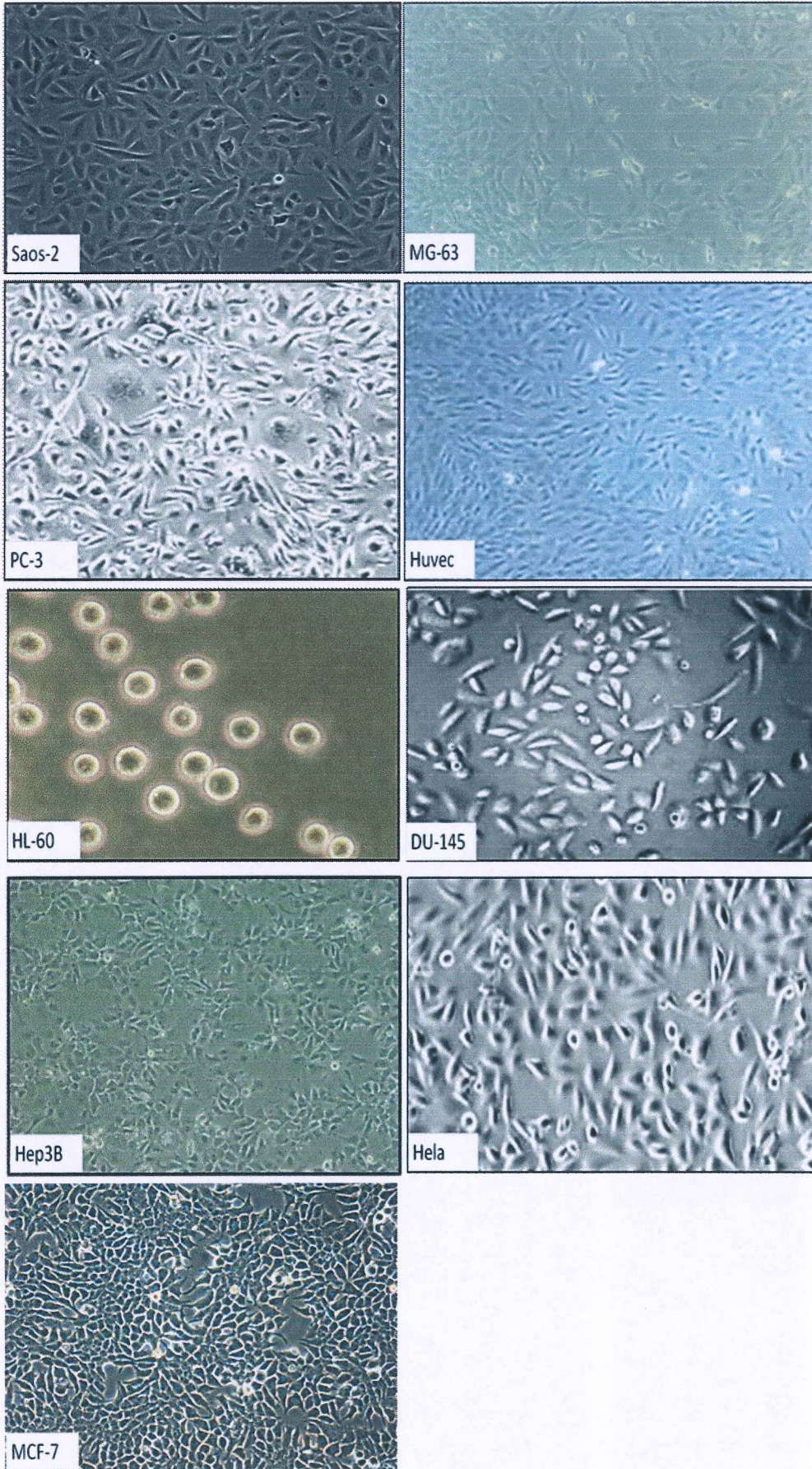


Şekil 3.68: URG-4 cDNA'sının ektopik ekspresyonu çalışma basamaklarını gösteren akış diyagramı

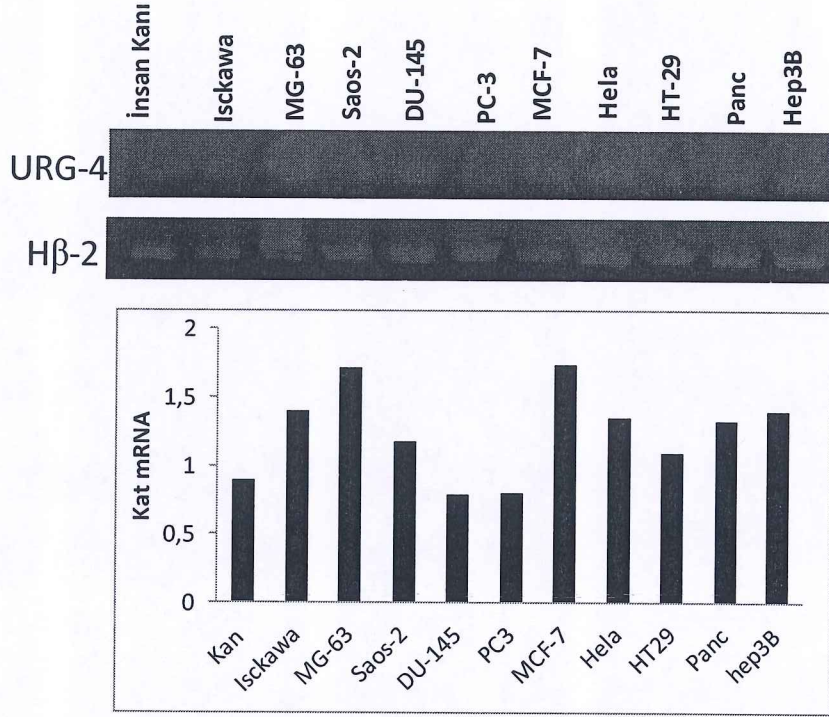
3.3.1 URG-4 Geninin Çeşitli Hücre Hatlarındaki Ekspresyonunun İncelenmesi

URG-4'ün farklı kanser hücrelerinde ifadesi hem mRNA hemde protein düzeyinde farklı kanserli hücrelerde gösterildi. Protein düzeyinde ifadesi için western blot tekniği ve mRNA düzeyinde ifadesi için sqRT-PCR kullanıldı.

İnsan kanı, MG-63 (İnsan Osteosarcoma), MCF-7 (Meme kanseri), DU145 (İnsan Prostat kanseri), Huvec (İnsan Kordon Endotel Hücreleri), Ishikawa (İnsan EndometrialAdenokarsinoma), Hela (İnsan serviks Kanseri), Hep3B (İnsan Karaciğer Kanseri), PC3 (İnsan Prostat Kanseri), HT29 (İnsan Kolon Kanseri), Saos-2 (İnsan Osteosarkoma) ve HL-60 (İnsan Miyeloid Lösemi) (Şekil 3.69) hücre hatlarından fermentas RNA izolasyon kitinin önerdiği şekilde RNA izole edildi (Bkz Bölüm 2.5.1)ve bunu takiben totalde 1 µg RNA kalıp olarak kullanarak cDNA elde edildi. 1 µL cDNA kalıp olarak kullanılarak Tablo 2.20'de verilen primerler kullanılarak RT-PCR metodu uygulandı. Sonuç olarak genin bütün kanser hücre hatlarında ekspre olduğu bulundu. Sq-PCR analizi sonucunda URG-4 geninin en az DU145 hücre hattında en fazla ise MCF-7 hücre hattında ekspre olduğu tespit edildi (Şekil 3.70).

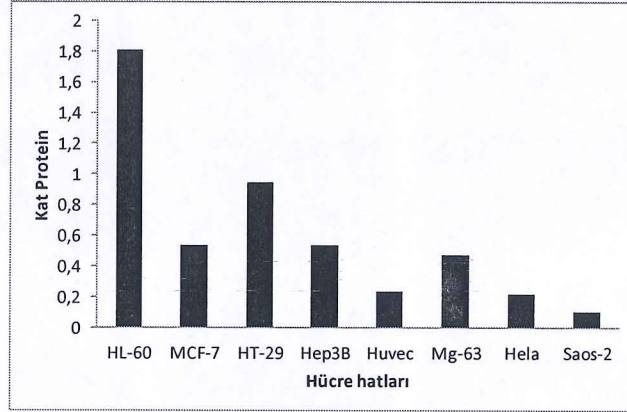
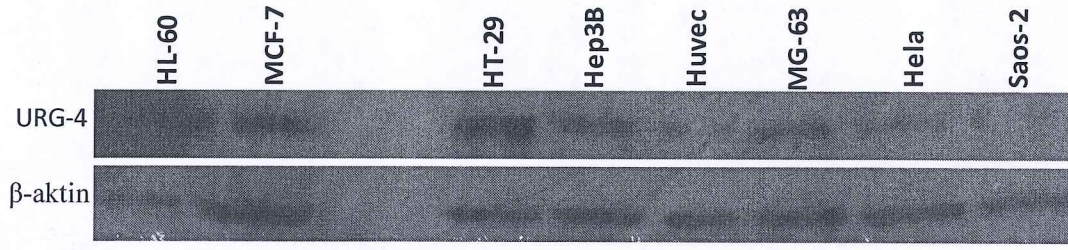


Şekil 3.69: Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının fotoğrafları



Şekil 3.70: URG-4 geninin bütün hücre hatlarında RT-PCR metodu ile ekspresyonunun incelenmesi

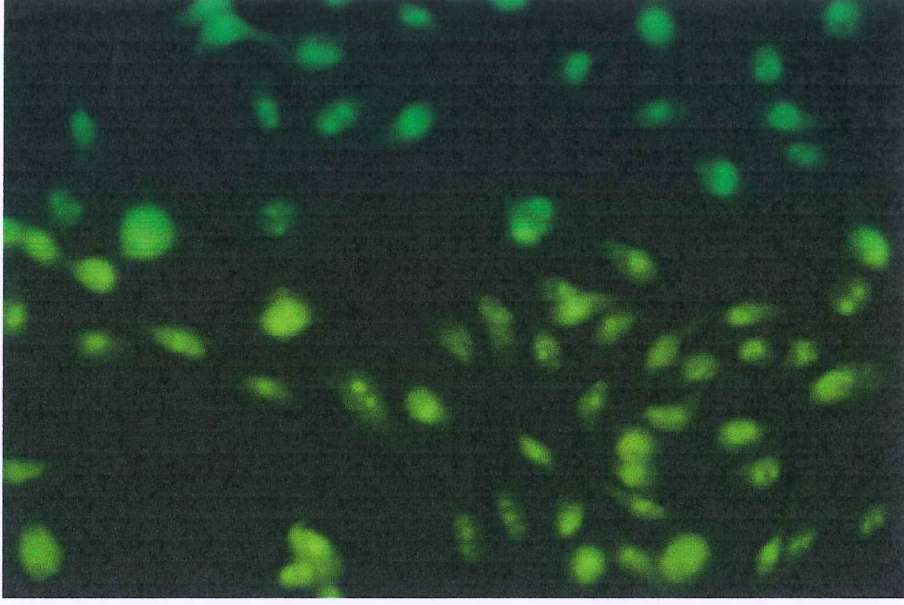
25 cm² flaklarda yetiştirilmiş olan hücrelerden Bölüm 2.6.1.1’de anlatıldığı şekilde lizat hazırlandı. Protein konsantrasyonu qubit ile belirlenerek 50 µg protein olacak şekilde kuyucuklara lizatlar yüklendi. Transfer işlemi 2.6.1.5’de anlatıldığı şekilde uygulandıktan sonra abcam firmasından temin edilen anti-URG-4 antikorunu 1/100 dilüsyon oranında kullanıldı. Spesifik URG-4 proteini 100kd civarında gözlemlendi. Kontrol amaçlı kullandığımız beta aktin antikorunu 1/1000 dilüsyon oranında uygulandı ve bantlar 42 kD civarında gözlemlendi. İMAGE J programı kullanılarak denstometrik analiz yapıldı ve URG-4 geninin protein seviyesinde en yüksek olarak HL-60 hücrelerinde bulunduğu tespit edildi (Şekil 3.71).



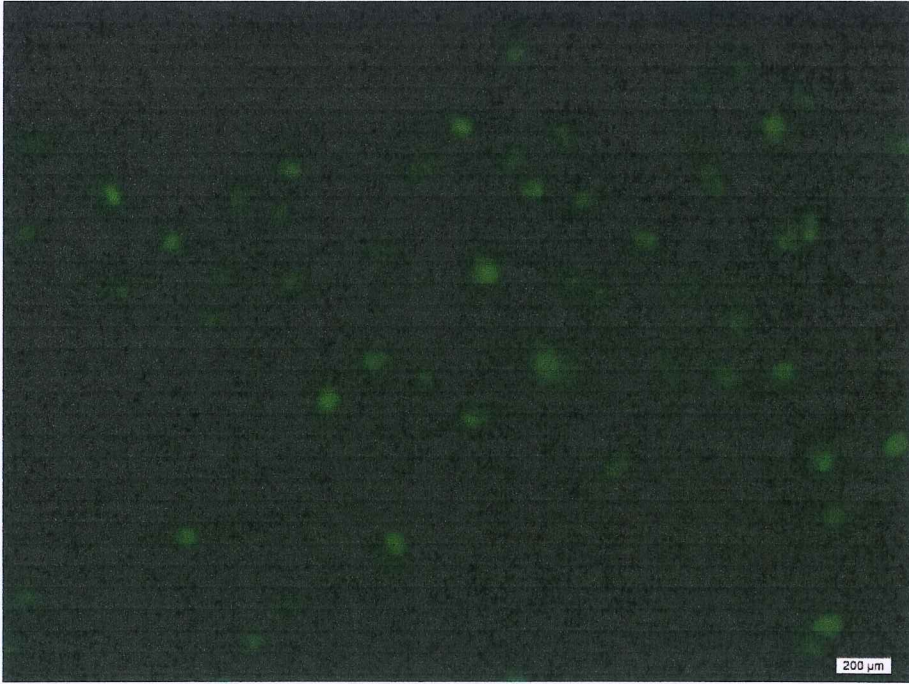
Şekil 3.71: Çeşitli hücre hatlarında URG-4 geninin ekspresyonunun protein seviyesinde gösterilmesi

3.3.2 URG-4 Proteininin Hücre Lokalizasyonunun ve Protein İfadesinin PC3 Hücrelerinde İmmun florasan Tekniği ile Gösterilmesi

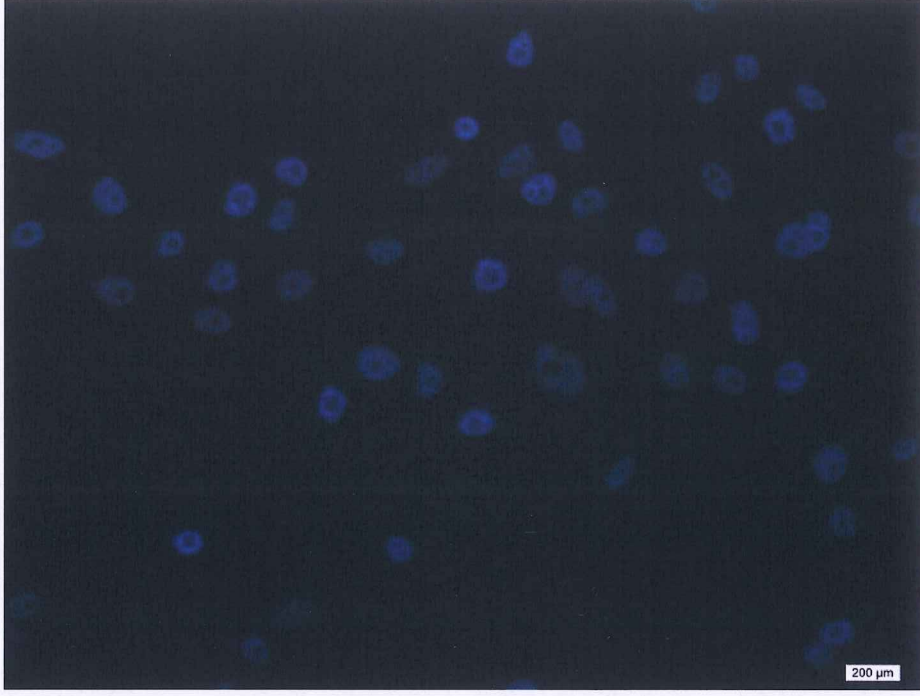
PC3 hücre modelinde URG-4 geninin lokalizasyonu IFC (İmmun Florasan) tekniği kullanılarak gösterildi. Bu amaçla 24 kuyucuklu plakalara 125.000 hücre eşit olarak paylaştırıldı ve 2.6.2’de anlatıldığı biçimde metod uygulandı. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar Tablo 2.9’da verildi. Sekonder antikor uygulamasını takiben PBS ile yıkanan hücreler üzerine aynı zamanda çekirdeklerin florasan görüntülenmesini sağlayan DAPI boyaması yapıldı. Olympus görüntüleme cihazı kullanılarak 20X büyütme oranında fotoğraflandırıldı. Çalışmalarımız sonucunda URG-4 geninin hem nükleusta hemde sitoplazmada ekspre olduğu gösterildi. (Şekil 3.72, Şekil 3.73). Aynı zamanda URG-4 antikorunun ilk olarak bu metotta uygulanabilirliği gösterildiği için Abcam firmasının web sitesinde fotoğrafımız bulunmaktadır [74].



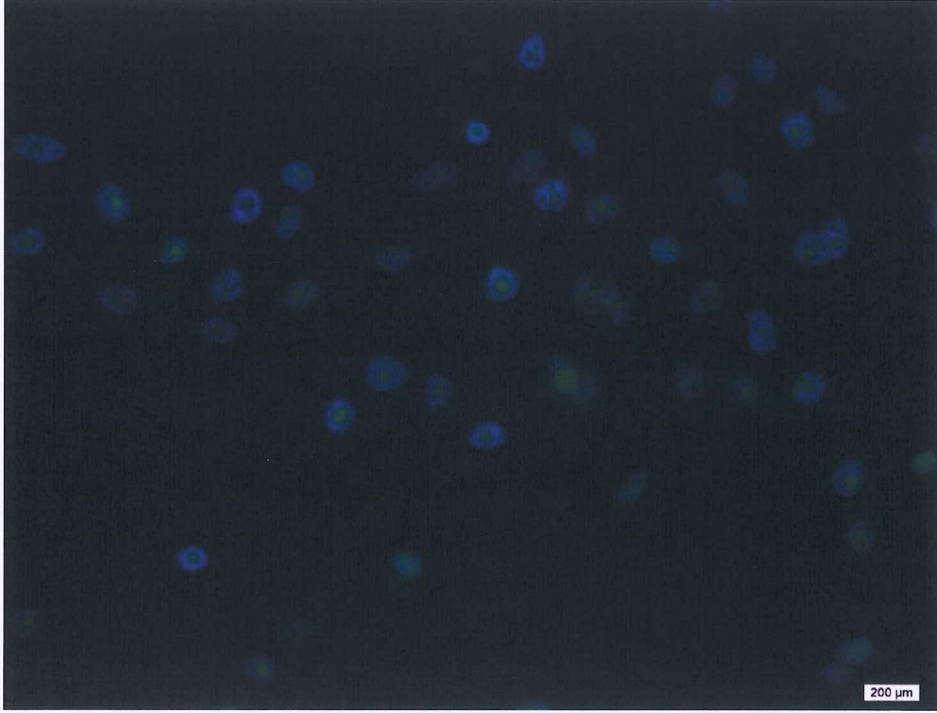
Şekil 3.72: URG-4 ekspresyonunun PC3 hücre hattında IFC metodu uygulanarak gösterilmesi (Alexafluor 488 Antirabbit boyama)



Şekil 3.73: URG-4 geni ifadesinin PC3 hücre hattında alexa flour 488 florasan sekonder antikorla işaretlenerek gösterilmesi



Şekil 3.74: PC3 hücrelerinde çekirdek boyaması (DAPI)



Şekil 3.75: PC3 hücrelerinde Çekirdek boyaması ve URG-4 boyaması olan fotoğrafların üst üste çakıştırılması

3.3.3 URG-4 geni mRNA özellikleri

URG-4 geni 7. Kromozomun kısa kolunda olup yaklaşık 50 bin bazlık diziyi içermektedir (43,915,501-43,967,000). İnsanda URG-4 genine ait 4 varyantı bulunmaktadır. *Varyant 1* NM_017920, *Varyant 2* NM_001077664, *Varyant 3* NM_001077663 ve *Varyant-4* NM_001290076 erişim numaralarıyla gen bankasında bulunmaktadır. *Varyant-1* mRNA'sı 3609 bç, *Varyant-2* 3831 bç, *Varyant-3* 3036 bç ve *Varyant-4* mRNA'sı 3957 bç uzunluğundadır. URG-4 genine ait varyantlar biyoinformatik analizlerle karşılaştırıldığında translasyonel başlangıç kodunu 1. ve 3. varyantlarda ilk ekzonda yer alırken *Varyant-2*'de 4. ekzonda bulunduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra *Varyant-3*'ün (931 aminoasit) diğer varyantlarla karşılaştırıldığında en büyük proteini kodladığı tespit edildi. (Şekil 3.77)

İkinci aşama olarak varyant mRNA'ları birbirleriyle blast yapıldığında *Varyant-2*' ve *Varyant-4*' ün ilk ekzonu olan 1-267 bç'lik bölgenin bu varyantlara spesifik olduğu teyit edildi (Şekil 3.76).

URG-4 var1	-----	1
URG-4 var3	-----	1
URG-4 var2	-----GTGCGCGCGTGCCGAGCGTCTGGCGCGCCGAGGGGAAGCAGCGGGGCTGCCCGGGTTACGCTGCCACCCGCGAC	76
URG-4 var4	ACTGTGGGGCGTCTGTCGCCGCGTGCCGAGCGTCTGGCGCGCCGAGGGGAAGCAGCGGGGCTGCCCGGGTTACGCTGCCACCCGCGAC	90
URG-4 var1	-----	1
URG-4 var3	-----	1
URG-4 var2	CTGGTCTGTGGCTTCGACCACTAGTCAGCAAGGCCCGGAGAGGCCAGCGAAGAGGAGGGGCTCGTTGGCTTTACGGAGACCGCGCGAG	166
URG-4 var4	CTGGTCTGTGGCTTCGACCACTAGTCAGCAAGGCCCGGAGAGGCCAGCGAAGAGGAGGGGCTCGTTGGCTTTACGGAGACCGCGCGAG	180
URG-4 var1	-----GAGCCGCGCCCGCGCGGAGGAAGCGAAGGAGGCGGGAG-CGGAGACCTCGCTGGCTCATGG-	61
URG-4 var3	-----GAGCCGCGCCCGCGCGGAGGAAGCGAAGGAGGCGGGAG-CGGAGACCTCGCTGGCTCATGG-	61
URG-4 var2	CACCCCTCAAGGTGCCACACGCTCGCCTGCCTGCTCCCTGTTCCACATCCTGGCGCTCTCCAGGCTGTCATATAACTCCTGAGAATAGTGGT	256
URG-4 var4	CACCCCTCAAGGTGCCACACGCTCGCCTGCCTGCTCCCTGTTCCACATCCTGGCGCTCTCCAGGCTGTCATATAACTCCTGAGAATAGTGGT	270
URG-4 var1	-CGTCGCCCCG-----	70
URG-4 var3	-CGTCGCCCCG-----	70
URG-4 var2	TCTTAACCTCT-----	266
URG-4 var4	TCTTAACCTCTAAAGAGTCTTGCTGTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGAATCTTGGCTCACTGTGGCTTCAGCCCTCCAGGCTCAA	360
URG-4 var1	-----GG-----CATTGAGATTTGGGAGAAGT	92
URG-4 var3	-----GGATAGAAGTGGAAATTACTGGGCAAAGGGCATTGAGATTTGGGAGAAGT	119
URG-4 var2	-----GATAGAAGTGGAAATTACTGGGCAAAGGGCATTGAGATTTGGGAGAAGT	314
URG-4 var4	GAGATCCTACCATCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGATAGAAGTGGAAATTACTGGGCAAAGGGCATTGAGATTTGGGAGAAGT	450

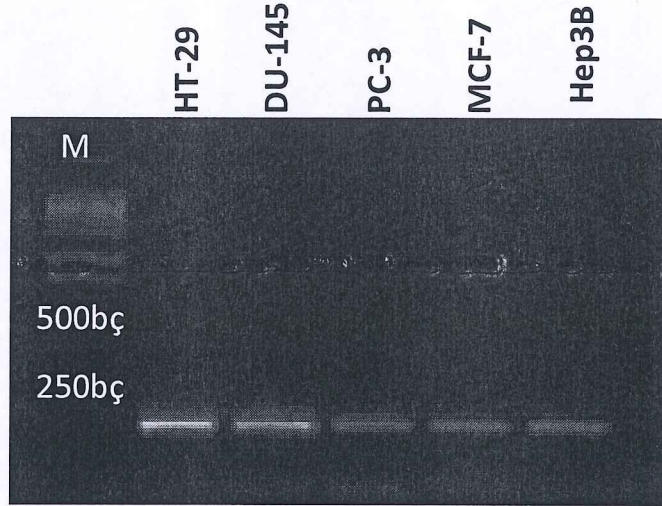
Şekil 3.76: URG-4 Varyantlarına ait cDNA dizilerinin karşılaştırılması ve primerlerin yerinin gösterilmesi

URG-4 genine ait *Varyant-2* ve *Varyant-4*'ün cDNA'sının 5'UTR bölgesinden tasarlanan primerler Tablo 2.20'de verildiği gibidir. Primerler kullanılarak URG-4 *Varyant -2*' ve *Varyant-4*'ün ekspresyonu çeşitli kanser hücre hatlarında mRNA seviyesinde PCR tekniği kullanılarak gösterildi. (Bkz: Bölüm 2.5.5). Çalışma sonucunda *Varyant-2* cDNA'sında *Varyant -1* ve *Varyant-3*

cDNA'sının ekspre olduğu kanser hücre hatlarında ekspre olduğu tespit edildi (Şekil 3.78).

URG-4 Var1	MASP-----GHSDLQEVVAPEIKASERRTAVAIADLEWREMEGDDCEFRYGDGTNEAQDNDPPTVERSRLQEMLSLLGLETYQVQKL	81
URG-4 Var3	MASPGIEVELLGRGHSDLQEVVAPEIKASERRTAVAIADLEWREMEGDDCEFRYGDGTNEAQDNDPPTVERSRLQEMLSLLGLETYQVQKL	90
URG-4 Var2	-----MEGDDCEFRYGDGTNEAQDNDPPTVERSRLQEMLSLLGLETYQVQKL	47
URG-4 Var4	-----MEGDDCEFRYGDGTNEAQDNDPPTVERSRLQEMLSLLGLETYQVQKL	47
URG-4 Var1	SLQDSLQISFDSMRGNWAPQVFKDLFWNPLRKLQALNADARNNTMVLVDLDPARFVEKESQMEEEIYYWDPADDLAADIYSFSELPTPTDP	171
URG-4 Var3	SLQDSLQISFDSMRGNWAPQVFKDLFWNPLRKLQALNADARNNTMVLVDLDPARFVEKESQMEEEIYYWDPADDLAADIYSFSELPTPTDP	180
URG-4 Var2	SLQDSLQISFDSMRGNWAPQVFKDLFWNPLRKLQALNADARNNTMVLVDLDPARFVEKESQMEEEIYYWDPADDLAADIYSFSELPTPTDP	137
URG-4 Var4	SLQDSLQISFDSMRGNWAPQVFKDLFWNPLRKLQALNADARNNTMVLVDLDPARFVEKESQMEEEIYYWDPADDLAADIYSFSELPTPTDP	137
URG-4 Var1	VNPLDLLCALLLSSDSFLQEQEIALKRMALCQFALPLVLPDSENHYHTFLWAMRGIVRTWWSQPPRGMGSFREDSSVLSRAPAFVFRMDV	261
URG-4 Var3	VNPLDLLCALLLSSDSFLQEQEIALKRMALCQFALPLVLPDSENHYHTFLWAMRGIVRTWWSQPPRGMGSFREDSSVLSRAPAFVFRMDV	270
URG-4 Var2	VNPLDLLCALLLSSDSFLQEQEIALKRMALCQFALPLVLPDSENHYHTFLWAMRGIVRTWWSQPPRGMGSFREDSSVLSRAPAFVFRMDV	227
URG-4 Var4	VNPLDLLCALLLSSDSFLQEQEIALKRMALCQFALPLVLPDSENHYHTFLWAMRGIVRTWWSQPPRGMGSFREDSSVLSRAPAFVFRMDV	227
URG-4 Var1	SSNSKSQLLNAVLSPGHRQWDCFWHRDLNLGTNAREISDGLVEISWFFPSGREDLDIFPEFVAFNLNRDYGSHWLQFKLLTEISSAVFI	351
URG-4 Var3	SSNSKSQLLNAVLSPGHRQWDCFWHRDLNLGTNAREISDGLVEISWFFPSGREDLDIFPEFVAFNLNRDYGSHWLQFKLLTEISSAVFI	360
URG-4 Var2	SSNSKSQLLNAVLSPGHRQWDCFWHRDLNLGTNAREISDGLVEISWFFPSGREDLDIFPEFVAFNLNRDYGSHWLQFKLLTEISSAVFI	317
URG-4 Var4	SSNSKSQLLNAVLSPGHRQWDCFWHRDLNLGTNAREISDGLVEISWFFPSGREDLDIFPEFVAFNLNRDYGSHWLQFKLLTEISSAVFI	317
URG-4 Var1	LTDNISKKEYKLLYSMEKSTTKYYFILLSPYRGRNTNLRFLNKLIPVLIKIDHSHVLRKVSSTDSFSVKRIRAIIVGNVLRAPCRVSVED	441
URG-4 Var3	LTDNISKKEYKLLYSMEKSTTKYYFILLSPYRGRNTNLRFLNKLIPVLIKIDHSHVLRKVSSTDSFSVKRIRAIIVGNVLRAPCRVSVED	450
URG-4 Var2	LTDNISKKEYKLLYSMEKSTTKYYFILLSPYRGRNTNLRFLNKLIPVLIKIDHSHVLRKVSSTDSFSVKRIRAIIVGNVLRAPCRVSVED	407
URG-4 Var4	LTDNISKKEYKLLYSMEKSTTKYYFILLSPYRGRNTNLRFLNKLIPVLIKIDHSHVLRKVSSTDSFSVKRIRAIIVGNVLRAPCRVSVED	407
URG-4 Var1	MAHAARKLGLKVDDECECQKAKDRMERITRRIKSDAYRREDELRLQGD PWRKAAQVEKEFCQLQWAVD PPEKHRAELRRRLLLELRMQQN	531
URG-4 Var3	MAHAARKLGLKVDDECECQKAKDRMERITRRIKSDAYRREDELRLQGD PWRKAAQVEKEFCQLQWAVD PPEKHRAELRRRLLLELRMQQN	540
URG-4 Var2	MAHAARKLGLKVDDECECQKAKDRMERITRRIKSDAYRREDELRLQGD PWRKAAQVEKEFCQLQWAVD PPEKHRAELRRRLLLELRMQQN	497
URG-4 Var4	MAHAARKLGLKVDDECECQKAKDRMERITRRIKSDAYRREDELRLQGD PWRKAAQVEKEFCQLQWAVD PPEKHRAELRRRLLLELRMQQN	497
URG-4 Var1	GHDPSGQVQEFISGISSPSLSEKQYFLRWMEWGLARVAQPRLRQPPETLLTLPKHHGGTTDVGEPLWPEPLGVEHFLREMGQFYEAESCL	621
URG-4 Var3	GHDPSGQVQEFISGISSPSLSEKQYFLRWMEWGLARVAQPRLRQPPETLLTLPKHHGGTTDVGEPLWPEPLGVEHFLREMGQFYEAESCL	630
URG-4 Var2	GHDPSGQVQEFISGISSPSLSEKQYFLRWMEWGLARVAQPRLRQPPETLLTLPKHHGGTTDVGEPLWPEPLGVEHFLREMGQFYEAESCL	587
URG-4 Var4	GHDPSGQVQEFISGISSPSLSEKQYFLRWMEWGLARVAQPRLRQPPETLLTLPKHHGGTTDVGEPLWPEPLGVEHFLREMGQFYEAESCL	587
URG-4 Var1	VEAGRLPAGQRRFAHFPGLAASELLLTGLPLELIDGSTLSMPVRWVTGLLKEHLVRLERRSRLVVLSTVGVPGTGKSTLLNTMFGLRFATG	711
URG-4 Var3	VEAGRLPAGQRRFAHFPGLAASELLLTGLPLELIDGSTLSMPVRWVTGLLKEHLVRLERRSRLVVLSTVGVPGTGKSTLLNTMFGLRFATG	720
URG-4 Var2	VEAGRLPAGQRRFAHFPGLAASELLLTGLPLELIDGSTLSMPVRWVTGLLKEHLVRLERRSRLVVLSTVGVPGTGKSTLLNTMFGLRFATG	677
URG-4 Var4	VEAGRLPAGQRRFAHFPGLAASELLLTGLPLELIDGSTLSMPVRWVTGLLKEHLVRLERRSRLVVLSTVGVPGTGKSTLLNTMFGLRFATG	677
URG-4 Var1	KSCOPRGAFMQLITVAEGFSQDLGCDHILVIDSGGLIGGALTSAGDRFELEASLATLLMGLSNVTVISLAETKIPAAIHLAFRLLEKTG	801
URG-4 Var3	KSCOPRGAFMQLITVAEGFSQDLGCDHILVIDSGGLIGGALTSAGDRFELEASLATLLMGLSNVTVISLAETKIPAAIHLAFRLLEKTG	810
URG-4 Var2	KSCOPRGAFMQLITVAEGFSQDLGCDHILVIDSGGLIGGALTSAGDRFELEASLATLLMGLSNVTVISLAETKIPAAIHLAFRLLEKTG	767
URG-4 Var4	KSCOPRGAFMQLITVAEGFSQDLGCDHILVIDSGGLIGGALTSAGDRFELEASLATLLMGLSNVTVISLAETKIPAAIHLAFRLLEKTG	767
URG-4 Var1	HMPNYQFVYQNLHDVSVPGPRPRDKRQLDPPGDLSRAAAQMEKQDGFALAGLAFCDPEKQHIWHIPGLWHGAPMAAVSLAYSEATF	891
URG-4 Var3	HMPNYQFVYQNLHDVSVPGPRPRDKRQLDPPGDLSRAAAQMEKQDGFALAGLAFCDPEKQHIWHIPGLWHGAPMAAVSLAYSEATF	900
URG-4 Var2	HMPNYQFVYQNLHDVSVPGPRPRDKRQLDPPGDLSRAAAQMEKQDGFALAGLAFCDPEKQHIWHIPGLWHGAPMAAVSLAYSEATF	857
URG-4 Var4	HMPNYQFVYQNLHDVSVPGPRPRDKRQLDPPGDLSRAAAQMEKQDGFALAGLAFCDPEKQHIWHIPGLWHGAPMAAVSLAYSEATF	857
URG-4 Var1	ELKRCLLENIRNGLSNQNKNIQQLIELVRRLL	922
URG-4 Var3	ELKRCLLENIRNGLSNQNKNIQQLIELVRRLL	931
URG-4 Var2	ELKRCLLENIRNGLSNQNKNIQQLIELVRRLL	888
URG-4 Var4	ELKRCLLENIRNGLSNQNKNIQQLIELVRRLL	888

Şekil 3.77: URG-4 Varyantlarına ait protein dizilerinin karşılaştırılması



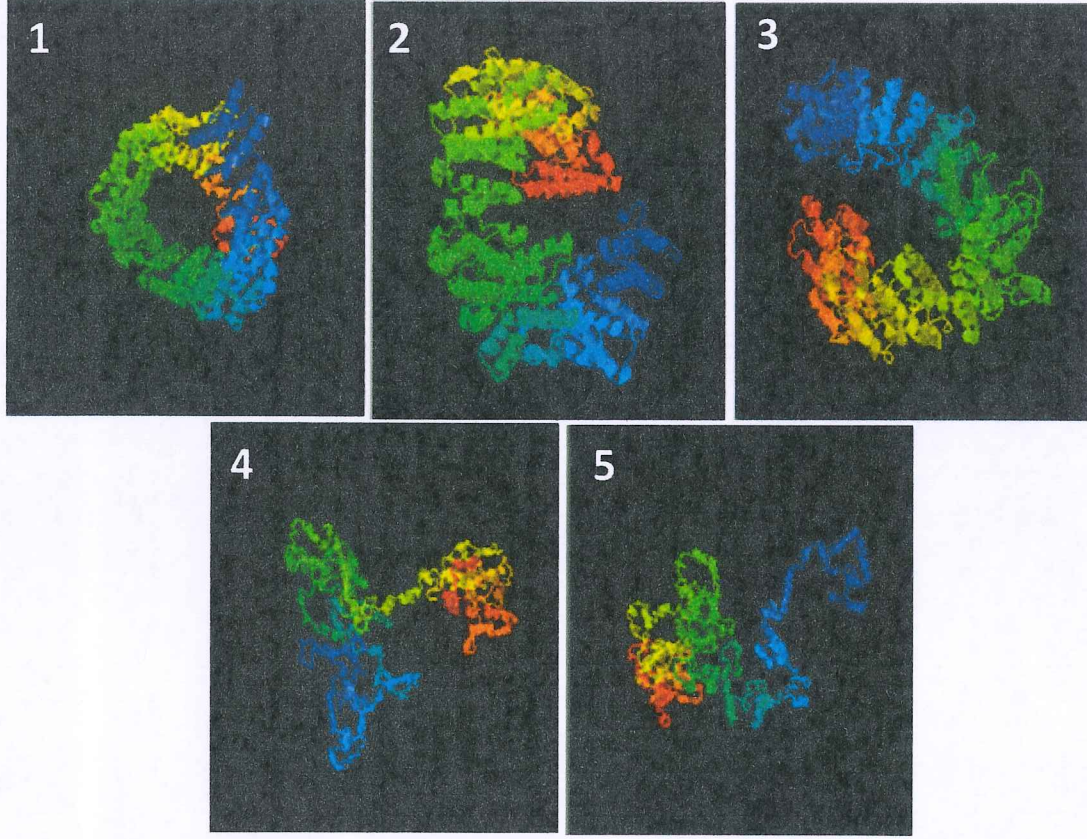
Şekil 3.78: URG-4 *Varyant-2* ve *Varyant-4*'ün çeşitli kanser hücre hatlarında ekspresyonun gösterilmesi

3.3.4 Proteine ait Biyoinformatik Özellikler

I-TASSER programı bir proteinin sekans dizisinden yapıya, yapısından fonksiyonu hakkında bir tahminde bulunmayı sağlayan otomatik protein yapı ve fonksiyon analizidir. Program çeşitli eşleştirmeler ve tekrarlayan simülasyonlarla 3 boyutlu protein yapılarını önerir [75].

URG-4 proteininin yapısı ve işleyişi hakkında literatürde yeterli bilgi bulunamamasından dolayı *Varyant-1* protein dizisini <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> web tabanı üzerinden yükleyerek protein analizi yaptırıldı. S991146 numaralı kayıtlı yaptırığımız analiz sonucunda URG-4 proteininin yapısı için 3 boyutlu yapısı hakkında 5 model önerilmiştir. 5 modelden C değeri en yüksek olan URG-4 proteinine en benzer model olarak düşünülmektedir. C skoru veri tabanında bulunan benzer örneklerle karşılaştırılarak hesaplanmaktadır. Şekil 3.79'de önerilen 5 modelin 3 boyutlu yapıları verilmiştir. Bunlardan beşinci model C skoru en yüksek olan dolayısıyla URG-4 proteinine en yakın olan modeldir. Evrimsel yakınlığı olan dizileri seçebilmek için, kayıt ettirilen dizi ilk olarak pozisyona “özgün tekrarlayan diziler” olarak bilinen PSI-BLAST yapılır. Homolog dizileri birebir karşılaştırma yapılarak PSI-PRED kullanılır, bu data bize proteinin ikincil yapısı hakkında bilgi verir. PDB yapı kütüphanesi olarak

bilinen LOMETlerle karşılaştırılarak dizinin ikincil yapısı kesinleştirilir. Daha sonrasında 7 program (FUGUE, HHSEARCH, MUSTER, PROSPECT, PPA, SP3 ve SPARKS) ile resimleştirilir.



Şekil 3.79: URG-4 proteini için önerilen proteinlerin 3 boyutlu yapıları

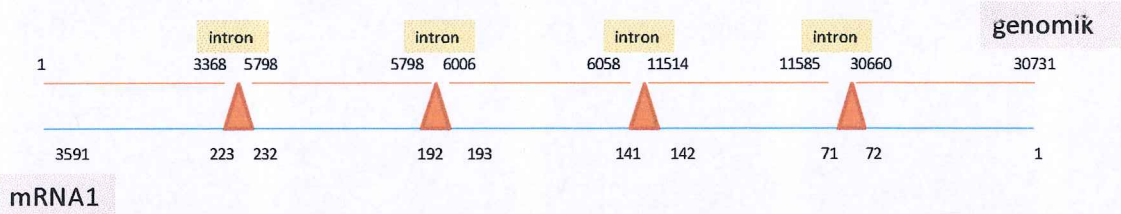
Veritabanında LOMET'lerle karşılaştırılarak verilen diziyeye yakın 10 kalıp önerilmektedir ve normalize edilmiş Z skoru baz alınarak hesaplanmaktadır. Z skoru 1'den büyük olduğunda anlamlı dizi belirlenir. Yaptığımız analiz sonucuna göre Z skoru en yüksek olan HUMAN GUANYLATE BINDING PROTEIN-1 IN COMPLEX WITH THE GTP ANALOGUE, GMPPNP.: İnsan Guanilat Bağlanma Proteini'dir.

Tm skoru hesaplanarak diziyeye yakın yapısal analog belirlenir. Yapısal analoglar I-TASSER modelleri ve eşleşen kalıplar arasında Tm skoru baz alınarak verilir. Tm skoru 0,5'den büyük olan değerler anlamlıdır. Analiz sonucunda 0,881 değeriyle "Crystal Structure of The Cand1-Cul1-Roc1 Complex" enzimi yapısal analogu olarak tespit edilmiştir.

I-TASSER fonksiyonel özellikler, EC (Yüzde Enzim) değerleri, GO (Gene Ontoloji) ve BS (Bağlanma Bölgeleri) değerleri hesaplanarak belirlenir. Program tarafından bu değerler analiz edildiğinde 5 enzim homoloğu önerilmektedir. Bu enzimler Geranylgeranyltransferaz from rat brain, Sellobiyoz fosforilaz, İnsülin degrid eden enzim, rat protein farnesiltransferaz ve glutamat sentaz olarak önerilmektedir.

3.3.5 URG-4 geni *Varyant-1* cDNA'sının PCR tekniği ile çoğaltılması

Erişim numarası NM_17090 URG-4 varyant 1 cDNA dizisi NCBI data bankasından alındı. Şekil 3.80'de varyant 1'e ait intron ve ekzon bölgeleri şematize edildi. Proteinin başlangıç (ATG) ve sonlanma kodonlarını (TGA) içerecek şekilde ileri ve geri primerler tasarlandı.



Şekil 3.80: URG-4 *Varyant-1*'in intron ve ekzon bölgelerinin şematik gösterimi

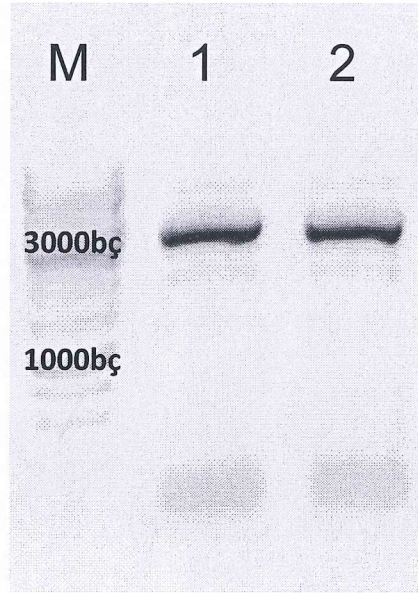
pCDNA-Topo-gateway Kitinin™ (Invitrogen) önerdiği şekilde ileri primerinin baş bölgesine CACC dizisi eklendi. Primerlerin Tm sıcaklığı ve özgünlüğü NCBI ve IDT adresleri kullanılarak tespit edildi. Makrogen firmasından temin edilen primerler kullanılarak PCR tekniği ile özellikle küt uç oluşturan enzim stratejileri seçilerek çoğaltıldı. PCR reaksiyonu son hacim 50 µL olacak şekilde, 1 µL URG-4 ileri primeri (50 pmol/ µL), 1 µL URG-4 geri primeri (Tablo 3.9), High Fidelity master mix 25 µL, % 3 DMSO (1,5 µL) kullanılarak gerçekleştirildi. (Şekil 3.81)

Topo-Gateway kitinin önerdiği şekilde ligasyon ve transformasyon basamakları yapıldıktan sonra oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu Bölüm

2.3.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Restriksiyon kesimi ile kolonilerin rekombinant olup olmadığı belirlendi. Rekombinant olarak elde ettiğimiz kolonilerden büyük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı (Bölüm 2.3.13).

Tablo 3.9: Varyant 1 cDNA’sının Klonlanması Aşamasında Kullanılan cDNA Primerleri

Gen	Primer dizisi (5’-3’)	Çoğaltılan bölge (bç)
URG-4 cDNA	Forw CACCGAGACCTCGCTGCGCTCATGGCGTC Rev CTCGAG AGACATTTATTAAGCGTCTA	2971

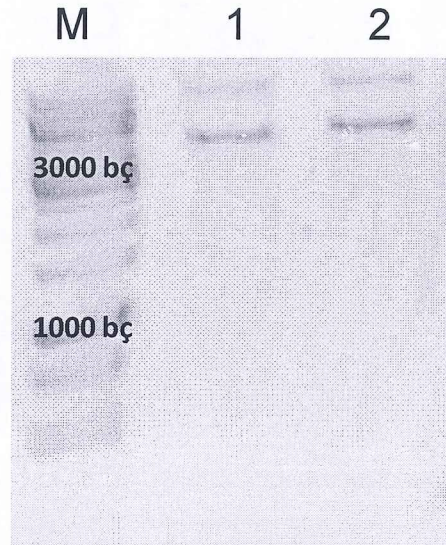


Şekil 3.81: URG-4 cDNA’sının agaroz jel fotoğrafı

M: 1kb marker (SM0311) 1-2: URG-4 cDNA’sının PCR tekniği ile çoğaltılması ve % 0,8 ’lik agaroz jelde görüntülenmesi

PCR ürünlerinin ligasyonu, pCDNA3.2 Topo Gateway klonlama kitinin önerdiği şekilde, 8 µL PCR ürünü, 2 µL tuz solüsyonu ve 1 µL pCDNA3.2 vektörü koyularak karışım hazırlandı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ligasyon ürünü kitin içeriğinde bulunan Top10 E.coli soyuna transforme edildi (Bölüm 2.3.9). Oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Restriksiyon kesim koşulları son

hacmi 50 µL olacak şekilde, NotI enzimi (Fermentas) ve XbaI enzimi (Fermentas) ile Bölüm 2.3.11’de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. (Şekil 3.82)

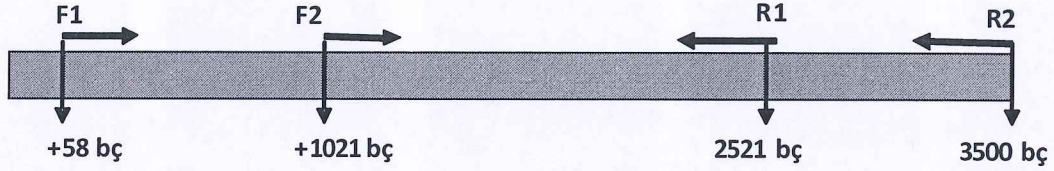


Şekil 3.82: URG-4 cDNA’sının içeren pCDNA3.2 ekspresyon vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu

M: 1kb marker (SM0311) 1-2: URG-4 cDNA’sının içeren pCDNA3.2 ekspresyon vektörünün NotI ve XbaI RE enzimleri kullanılarak kesilmesi ve sonuçların % 0,8’lik jelde görüntülenmesi

3.3.6 Dizi Analizi ile URG-4 cDNA’nın Doğrulanması

URG-4 *Varyant-1* cDNA’sının başlangıç kodonu 58. bazda ve sonlanma kodonu 2826. bazda bulunmaktadır. Çoğaltmak amaçlı kullandığımız ileri primerleri başlangıç kodonunu içerecek şekilde, geri primeri ise 3’UTR dizisi içerisinde tasarladık. Çoğalttığımız bölge yaklaşık 3500 bç olduğu için ileri ve geri primerler dizileme sırasında yeterli olmamıştır. Bu amaçla dizinin iç bölgesinden primerler tasarlandı. Tasarlanan primerler Tablo 3.10’da verildiği gibidir. Aynı zamanda Şekil 3.83’de konumları gösterildi. Primerler ve plazmit dizi analizi için ANKARA/REFGEN birimine gönderildi. Analiz sonucunda cDNA’da herhangi bir mutasyon olmadığı gözlemlendi (Şekil EK-H).



Şekil 3.83: Dizileme için hazırlanan primerlerin şema üzerinde gösterilmesi

Tablo 3.10: Dizileme için oluşturulan primerlerin listesi

Primerin Adı	Primer dizisi (5'-3')
F1	CACCGAGACCTCGCTGCGCTCATGGCGTC
F2	CCTGTGGCCTTTCTGAACCTGAGAG
R1	CAGGAGCTGTCTCTTGTCTCTGGGC
R2	CTCGAG AGACATTTATTAAGCGTCTA
pCDNA3.2 Rev	CTTCCGTGTTTCAGTTAGC

3.3.7 Geçici Transfeksiyon Metoduyla URG-4 cDNA'sının Hep3B Hücrelerine Verilmesi ve Karakterizasyon Çalışmaları

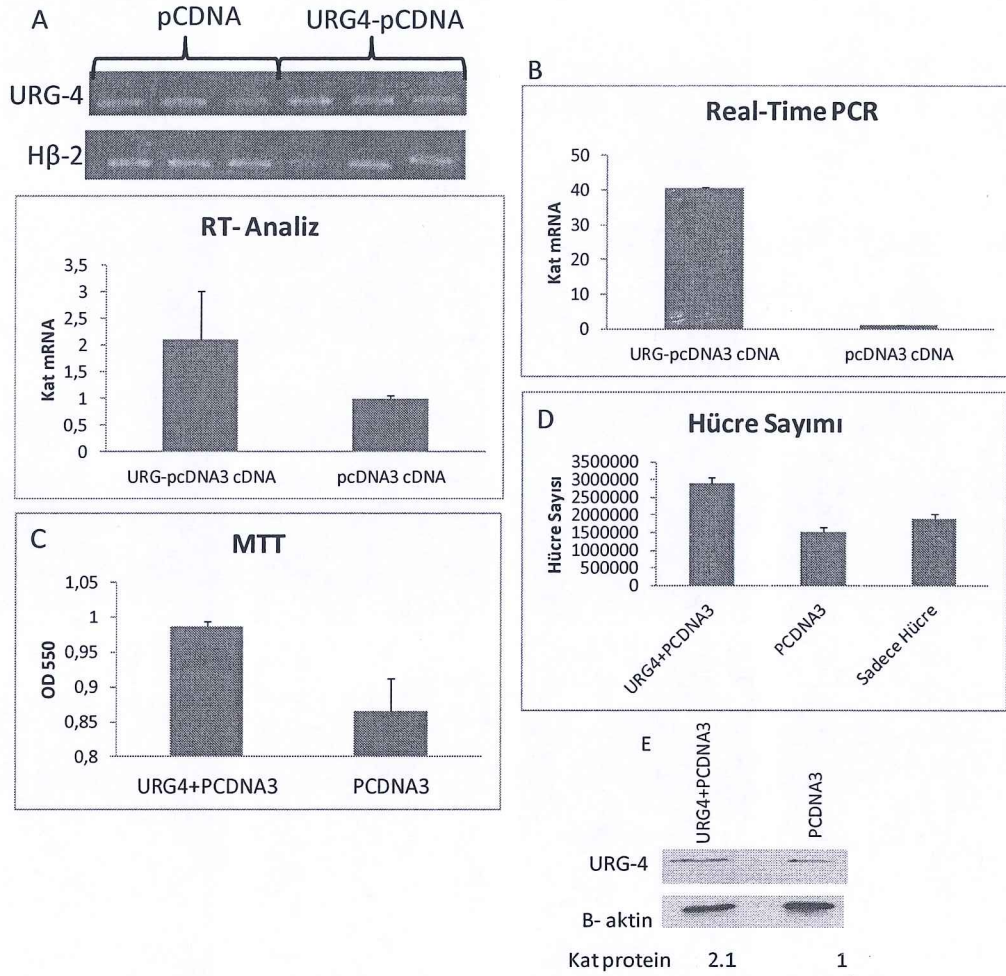
Kalsiyum fosfat transfeksiyon metodu kullanılarak URG-4 cDNA'sı 10 µg olacak şekilde küçük flasklara (25 cm²) transfekte edildi. Küçük flasklara transfeksiyon işlemi normal transfeksiyon protokolünde kullanılan malzemelerin 7 katı kullanılarak Bölüm 2.4.7.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra medyum taze % 10 FCS'li DMEM ile değiştirildi. Transfekte edilen hücreler 72 saat sonunda tripsinizasyonla kaldırılarak santrifüj ile çöktürüldü. Oluşan pelet daha sonra RNA izolasyonu ve protein çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

MTT çalışması için transfeksiyon çalışması 6'lı plakalarda gerçekleştirildi. 2 µg URG4-pCDNA ve gen içermeyen pCDNA kalsiyum-fosfat metodu ile Hep3B hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra pCDNA boş vektörü transfekte ettiğimiz ve URG4-pCDNA vektörünü içeren hücreler tripsinizasyonla kaldırıldı ve tripan mavisi yöntemiyle sayılarak sonuçlar Microsoft excel

programında değerlendirildi. (Şekil 3.84 A). Sayma işleminden sonra tekrar 96'lık plakaya böldüğümüz hücrelerin üzerine Bölüm 2.4.8'de anlattığımız şekilde MTT metodu uygulandı. 550 nm dalga boyunda spektrofotometre ölçüm olarak elde edilen veriler Microsoft excel programında grafiklendirildi (Şekil 3.84 B). Buna göre URG4-pCDNA transfekte edilen hücreler hem sayısal değer açısından hemde MTT deneyi verilerine göre daha fazla proliferasyon olduğu tespit edildi.

-80°C'de muhafaza ettiğimiz pelletlerden RNA izolasyon kitinin önerdiği şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi (Bkz Bölüm 2.5.1). Daha sonra 1 µg RNA kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi yapıldı (Bölüm 2.5.4). URG-4 primerler ve normalizatör primerler olan İnsan β -2-mikroglobulin primerleri kullanılarak sqPCR çalışması Bölüm 2.5.5'de belirtildiği şekilde uygulandı. Sonuçlar IMAGE J programı ile analiz edildi (Şekil 3.84 C). Real time PCR metodu uygulanarak RT-analizde gösterilen artış teyit edildi (Şekil 3.84 D). Buna göre qRT-PCR'da URG4-pCDNA transfekte edilen hücreler 40 kat daha fazla URG-4 mRNA'sını ifade etmektedir.

Protein seviyesinde URG-4 geninin fazla ekspresyon olduğunu göstermek üzere western metodu uygulandı. Sonuçlar IMAGE J programı kullanılarak analiz edildi. (Şekil 3.84 E)

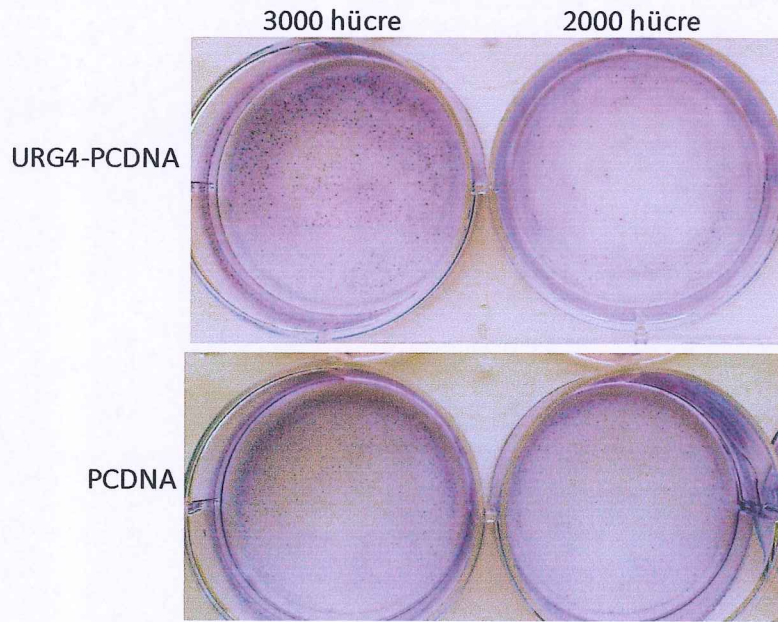


Şekil 3.84: Ektopik ekspres edilmiş URG-4 genine ait MTT, RT-PCR, Real-Time ve Western bulguları

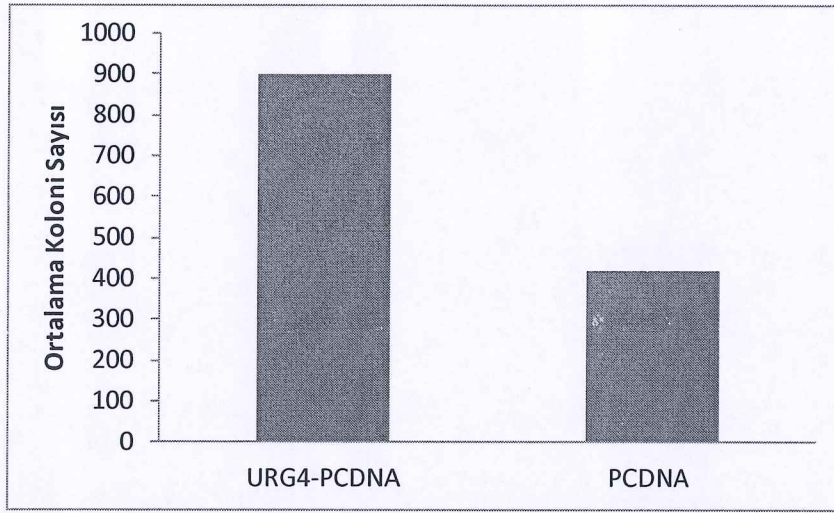
A: URG4-pCDNA ve pCDNA peletlerinden elde edilen RNA kalıp olarak kullanılarak elde edilen cDNA ve spesifik URG-4 primerleri kullanılarak yapılan sq-RTPCR sonucu gel görüntüsünün IMAGE J kullanılarak değerlendirilmesi B: URG4-pCDNA ve pCDNA peletlerinden elde edilen RNA kalıp olarak kullanılarak elde edilen cDNA ve spesifik URG-4 primerleri kullanılarak yapılan Real Time PCR ve Δ ct metodu ile analiz edilmesi, C: URG4-pCDNA vektörü ve pCDNA vektörü transfekte edilmiş hücrelerden elde peletlerin mikroskop kullanılarak hücre sayım sonucunun grafiklendirilmesi; D: URG4-pCDNA ve pCDNA vektörü transfekte edilmiş hücrelerin MTT kullanılarak canlılıklarının 550 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilmesi; E: URG4-pCDNA3 ve pCDNA peletlerinden elde edilen lizatlar kullanılarak western metodu ile URG-4 antikorunun işaretlenmesi ve sonuçların IMAGE J programı ile değerlendirilmesi

3.3.8 Koloni formasyon deneyi

URG-4 geni transfekte edilen Hep3B hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri Bölüm 2.4.9'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen koloni formasyon deneyi ile belirlendi. Buna göre URG4-pCDNA ve pCDNA transfekte edilmiş Hep3B hücreleri yaklaşık 2 hafta sonra %10 metilen mavisi ile boyandı ve 20X'lik büyütmede mikroskop kullanılarak fotoğraflandırdı. Proliferasiyona neden olan URG-4 geninin over ekspresyonu Hep3B hücrelerinde daha fazla koloni oluşturduğu, buna tezat olarak pCDNA vektörünün boş olarak transfekte edildiği Hep3B hücrelerinde koloni sayısının daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.85 ve Şekil 3.86).



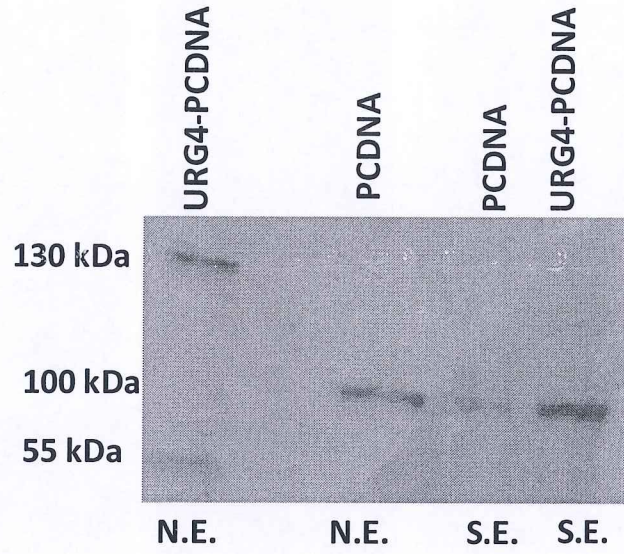
Şekil 3.85: URG-4 transfekte edilen hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerinin belirlenmesi



Şekil 3.86: Koloni formasyon deneyinin IMAGE J ile analiz sonucu

3.3.1 NE-PER kiti ile hazırlanan çekirdek ve sitoplazmik ekstraktlarda URG-4 geni ekspresyonu

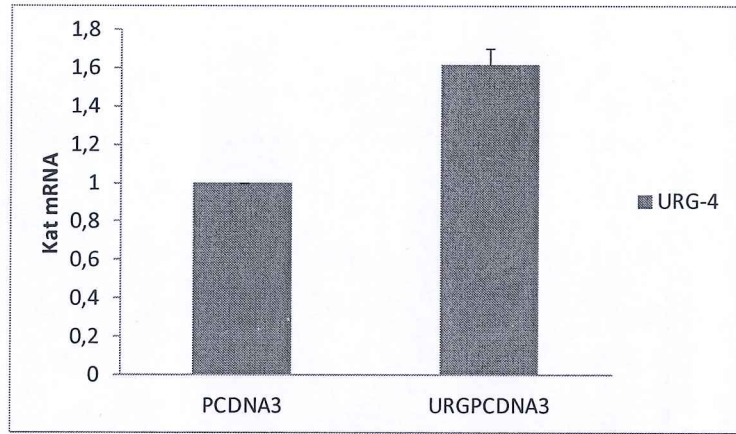
Bölüm 2.6.1.2’de ayrıntılı olarak anlatılan protokol uygulanarak kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirdiğimiz hücrelerden sitoplazmik ve nükleer ekstraktlar hazırlandı. Hazırladığımız ekstraktlardan 50 µg konsantrasyonda protein SDS jeline yüklenerek Bölüm 2.6’da anlatıldığı şekilde klasik western blot basamakları uygulandı. Membran 1/100 dilüsyon oranında Anti URG-4 poliklonal antikoru ile muamele edildi. Sonuçlar fotoğraflandı. URG-4 transfekte edilmiş hücre nükleer ekstratlarında 100 kDa civarında ki bant kaybolmuş bunun yerine 55 kDa ve 130 kDa ağırlığında iki bant oluşumu gözlemledik. Buna karşın aynı kDa ağırlığında ki bant URG-4 transfekte edilmiş sitoplazmik ekstraktlarda görülmemiştir (Şekil 3.87).



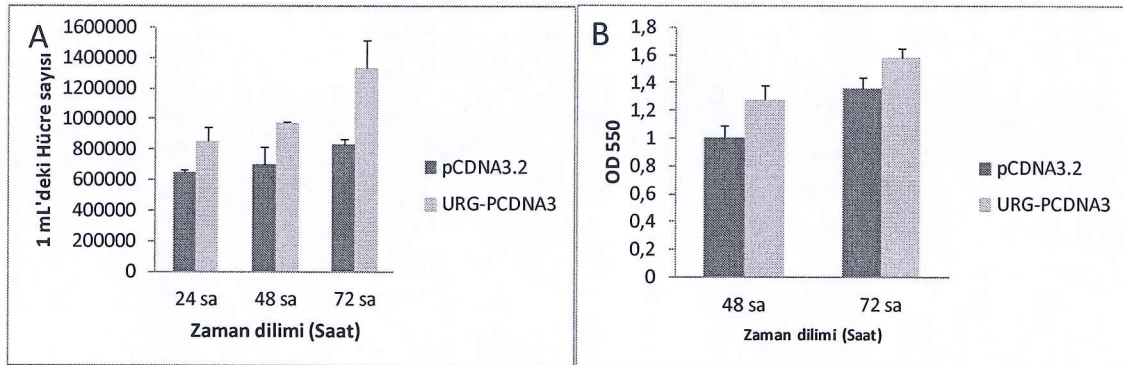
Şekil 3.87: Çekirdek ve sitoplazmik ekstraktlarda URG-4 ekspresyonunun gösterilmesi (N.E: Nüklear Ekstrakt, S.E: Sitoplazmik Ekstrakt)

3.3.2 URG-4 cDNA'sının Kalıcı Transfeksiyon metoduyla Saos-2 hücrelerine verilmesi, MTT ve RT analiz

URG-4 cDNA'sı ve boş vektörü içeren pcDNA3.2 vektörü Bölüm 2.4.7.3'de anlatıldığı şekilde Saos-2 hücrelerine kalıcı transfeksiyonu gerçekleştirildi. Bu hücre pelletlerinden Bölüm 2.5.1 ve 2.5.4 anlatıldığı şekilde RNA izolasyonu ve 1 µg RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA'lar URG-4 ve Human β-2-mikroglobulin primerleri kullanılarak Bölüm 2.5.6'da anlatıldığı şekilde qRT-PCR analizi yapıldı. Çalışma sonucunda URG-4 genini aşırı ifade eden hücrelerde mRNA seviyesinde artış gösterildi. (Şekil 3.88). Aynı zamanda MTT çalışması 6'lı plakalarda 3 tekrarlı olarak Bölüm 2.4.8'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. MTT verisi manual hücre sayımı yapılarak teyit edildi. Çalışma sonucunda URG-4 transfekte edilen hücrelerin proliferatif karakterinin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.89).



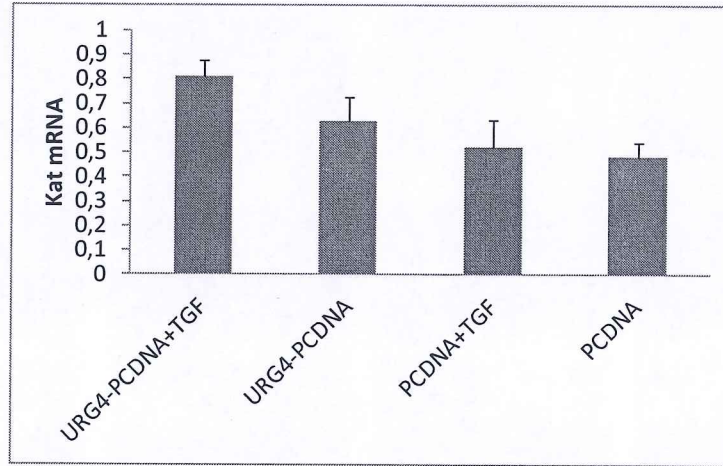
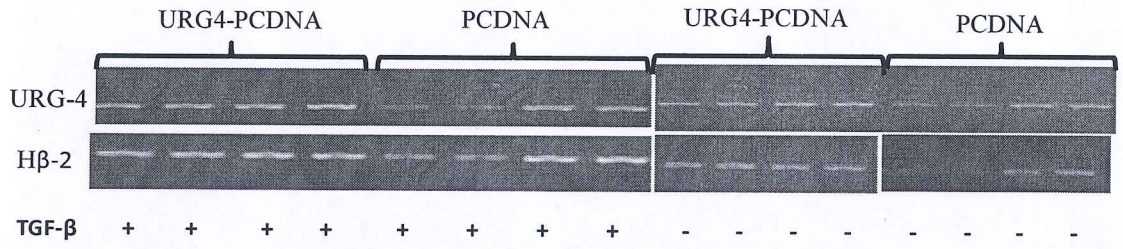
Şekil 3.88: qRT-PCR metadıyla URG-4 cDNA'sı transfekte edilmiş Saos-2 hücrelerinde ekspresyonunun gösterilmesi



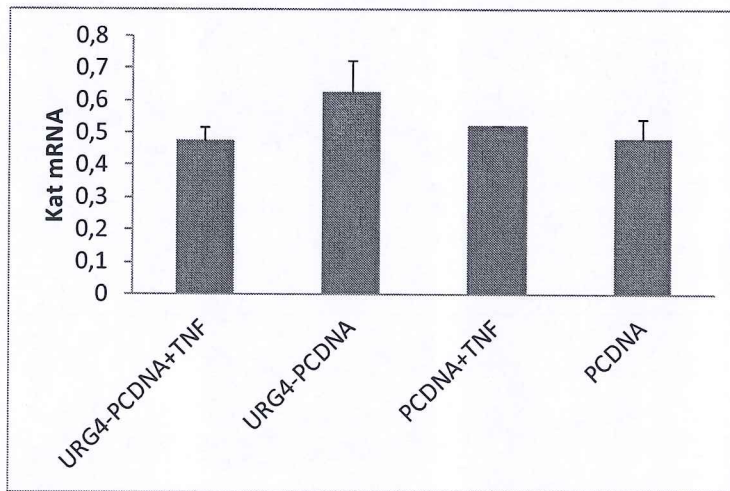
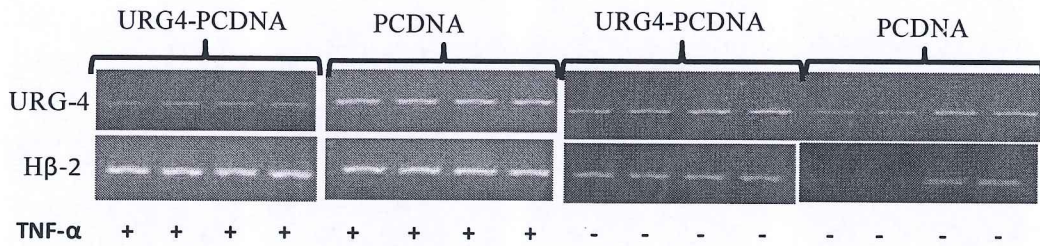
Şekil 3.89: URG-pCDNA3 transfekte edilmiş hücreleri kullanılarak yapılan proliferasyon deneylerine ait grafikler. A: Hücre sayımı, B: MTT datası

3.3.2.1 URG-4 cDNA'sını Kalıcı Olarak Transfekte Ettiğimiz Saos-2 Hücreleri Üzerine TGF- β ve TNF- α Sitokinlerinin Uygulanması

Kalıcı transfeksiyon yaptığımız Saos-2 hücreleri Bölüm 2.4.7.3'de anlatıldığı şekilde % 10 FCS ve 600 $\mu\text{g/mL}$ Geneticin antibiyotiği içeren DMEM kullanılarak yetiştirildi. 6'lı plakalara 500.000 hücre olacak şekilde paylaştırıldı. 16 saat inkübatörde beklettiğimiz hücreler üzerine 20 ng/mL TGF- β ve 500 Ü/mL TNF- α sitokinleri uygulandı ve 48 saat boyunca bekletildi. Bu hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. cDNA'lar spesifik URG-4 ve insan β -mikroglobulin primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucunda TGF- β sitokini URG-4 ifadesini arttırmaya devam ederken, TNF- α sitokininde azaltıcı yönde etki olduğu gösterildi (Şekil 3.90 ve Şekil 3.91).



Şekil 3.90: TGF- β sitokini uygulanmış cDNA'larda URG-4 geni mRNA seviyesinde ekspresyon analizi



Şekil 3.91: TNF- α sitokini uygulanmış cDNA'larda URG-4 geni mRNA seviyesinde ekspresyon analizi

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

URG-4 geni ilk olarak Hepatosellüler karsinomada 2002 yılında bulunmuş ve genin ekspresyonunun kanser hücrelerinde özellikle hepatit virüsü ile enfekte olmuş karaciğer kanseri hücrelerinde arttırdığı tespit edilmiştir [16]. HbxAG proteininin doğal efektörü olarak düşünülen bu genin ekspresyonu mide kanseri hücreleri ve osteosarkomalarda arttığı yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur [16]. Hücre siklusunda Siklin D1 ile ilişkisi olduğu aydınlatılan bu genin hakkında yapılmış olan çalışmalar oldukça kısıtlıdır [17,18]. Kanser hücrelerinde ekspresyonu artan bu genin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması terapötik açıdan oldukça önem arz etmektedir. Bu amaçla tez çalışması üç ana başlıktan oluşmaktadır.

Tezin ilk basamağında URG-4 genine ait promotor bölgesinin detaylı analizi bulunmaktadır. Bu amaçla öncelikle muhtemel promotor bölgesi gen bankasında kayıtlı olan NM_017920 *Varyant-1* cDNA'sından yararlanılarak tespit edildi. Bu dizide translasyonun başlangıç bölgesinden itibaren yaklaşık 1500 bp'lik yukarıda bulunan bölgenin çoğaltılması planlandı.

Promotor bölgesinin amplifikasyonunda kullanılacak olan primerler farklı promotor uzunluklarını çoğaltacak şekilde hazırlandı. Haberci vektör sistemine doğru oryantasyonda klonlamanın yapılabilmesi amacıyla primerlerin 5' uçlarına belirlenen enzimlerin tanıma dizileri eklendi. Bu sebeple öncelikle promotor bölgesine ait restriksiyon haritası Restriction Mapper Version 3 programı kullanılarak hazırlandı (Ek-5). Bu analize göre URG-4 geninde çalışılması planlanan 1500 bp'lik bölgeyi kesmediği tespit edilen enzimlerden *HindIII*'e ait tanıma dizisi ileri primere ve *XhoI*'e ait tanıma dizisi de geri primere eklendi. Yapılan biyoinformatik analiz sonucunda promotor bölgesinin 1500 bazlık kısmı incelendiğinde ilk 500 bazlık bölgede ve 700-900 bp'lik bölgede 2 adet potansiyel GC adası tespit edilmiştir. Bu tespit için kullanılan kriter obs/exp oranıdır. Bu oran 0,6'nın üzerinde olduğu bölgeler GC adası olarak bilinmektedir. URG-4 promotorunda tespit edilen olası GC adaları bize bu promotorunun transkripsiyonel regülasyonunda DNA metilasyonunun da önemli olabileceğini göstermektedir (Şekil 3.26). GC içeriğinin yüksek olmasından

dolayı güçlü bir sekonder yapı içeren bu bölge klasik PCR teknikleri ile çoğaltılamadı. Bu amaçla PCR’da bazı optimizasyon çalışmaları yapıldı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı, farklı genomik DNA (50 ng-300 ng) ve MgCl₂ (1-2 mM) konsantrasyonları, farklı PCR kitleri (Genome Walker), restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş gDNA’nın kalıp olarak kullanılması ve DMSO, etilen glikol gibi PCR kuvvetlendiricilerin PCR reaksiyonuna eklenmesi gibi çalışmalar gerçekleştirildi. Bütün bu çalışmalar sonucunda en büyük promotor parçası (1500 bç) çoğaltılamadı. Daha kısa parça çoğaltılacak şekilde primerler sentezlenerek ve 7-deaza GTP, DMSO ve betain süper karışımı kullanılarak yaklaşık 544 bç uzunluğunda olan URG-4 promotor parçası başarıyla çoğaltıldı. Aynı yöntem ile 5’kısaltılmış promotor parçaları da güçlendiriciler kullanılarak çoğaltıldı (Şekil 3.14, 3.15, 3.16, 3.17). Farklı bir strateji ile çoğaltılan URG-4 5’delesyonlu promotor parçaları ilk olarak TA klonlanma stratejisi ile pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Dizi analizine gönderilerek klonlanan parçaların doğruluğu ve herhangi bir mutasyon olup olmadığı belirlendi.

Klonlanan en büyük promotor parçası olan 544 bazlık bölgenin 63 bç 5’UTR’yi, 482 bç ise URG-4 promotorunu temsil etmektedir. Biyoinformatik analizi ile cDNA ve genomik DNA’nın karşılaştırılması ile muhtemel transkripsiyon başlangıç bölgesi (+1) tespit edilmiştir. Şekil 3.25’de gösterilmiştir. Bu bölge DNA data bankasına kayıt ettirilerek KJ46614 No’lu erişim numarası alındı.

URG-4 promotoru guanin sitozince (GC) oldukça zengin ve TATA kutusu olmayan bir promotor bölgesidir. Transkripsiyonun başlangıcı için TATA kutusu yerine RNA polimeraz II’nin tanıyacağı INR diziler gibi farklı düzenleyici diziler içermektedir. Bu diziler arasında SP1/GC kutusu motifleri de önemli rol oynarlar [76]. URG-4 promotoruna bağlanan muhtemel transkripsiyon faktörleri Mathinspector programı kullanılarak analiz edilmiştir ve çok sayıda transkripsiyon faktörlerinin buraya bağlandığı bulunmuştur (Şekil 3.25) Sp1/GC kutusu, Kruppel like faktör ve E2F myc aktivatör faktörlerinin bağlandığı tanıma dizileri URG-4 promotor dizisinde yoğun bir şekilde bulunmuştur. (Tablo 3.5).

Ayrıca insan URG-4 promotoru diğer memeli URG-4 promotor bölgeleri (rat ve fare) Bioedit programı kullanılarak Clustalw analizi çoklu karşılaştırmaları (Multiple alignment) yapılmıştır. Buna göre 5’UTR bölgeleri açısından promotor

bölgelerinin oldukça benzer olmasına rağmen promotor bölgelerinde farklılıklar gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 3.27). Bu durum aslında promotor regülasyonları için önemlidir. Bilinmektedir ki promotor farklılıkları tür düzeyinde de farklı transkripsiyonel regülasyonu işaret etmektedir [77].

Biyoinformatik olarak detaylıca incelenen promotor bölgesinin fonksiyonel aktivite analizi yapılabilmesi için ökaryotik haberci lusiferaz geni içeren pMetLuc vektörü içerine alt klonlaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.29, 3.30, 3.31, 3.32) Şekil 3.28'de pMetLuc vektörü içerine klonlanarak oluşturulmuş promotor parçaları verilmiştir. pMetLuc lusiferaz haberci vektörü *Metridia longa* tuzlu su Capepod türünden klonlanmış 24 kDa ağırlığında N-terminal ucunda 17 aa'lik salgılanmasını sağlayan diziyide içeren lusiferaz proteinini içermektedir. URG-4 promotor bölgesi 5'delesyonlu parçaları bu vektörün protein kodlayan dizinin hemen önünde bulunan MCS (Multiple Coding Site) bölgesine klonlanarak lusiferaz proteinin üretilmesi ve medyuma salgılanması sağlanmıştır. Medyuma salınan lusiferaz enzimi substratı ile birleştirilerek luminometrede promotor aktiviteleri belirlenmiştir. Geçici olarak kalsiyum-fosfat metoduyla Hep3B hücrelerine transfekte edilen promotor parçalarının 48 saat zaman dilimi sonunda ölçümleri yapıldı. En yüksek promotor aktiviteyi -109/+63 promotor parçasının gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.35). Transkripsiyon başlangıç bölgesine (+1) en yakın olan bölge olmasından dolayı bu bölgenin kor promotor olması şaşırtıcı değildir. URG-4 geni promotor bölgesinde olası bağlanma bölgesi olan bazı transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel aktivitede oluşturdukları etki kotransfeksiyon deneyleri ile belirlendi. Hep3B hücrelerinde hUSF, hSP1 ve xC/EBP α transkripsiyon faktörleri ve URG-4 promotor parçaları birlikte tranfekte edilerek bazal promotor aktivitelerine olan etkileri belirlendi. Buna göre, hSP1 transkripsiyon faktörünün -109/+63 URG-4 promotor parçası haricinde diğer üç konstrakt üzerinde arttırıcı etkisinin olduğu tespit edildi. Sadece bağlanmış olduğu değil aynı zamanda bağlanması promotor aktivitesini arttırıcı yönde etki ettiği tespit edildi (Şekil 3.36). hUSF transkripsiyon faktörü ise -344/+63 ve -482/+63 promotor parçalarının aktivitesini arttırdığı Şekil 3.37'de gösterilmektedir. xC/EBP α transkripsiyon faktörünün ise -344/+63 ve -109/+63 promotor parçalarının üzerinde istatistiki olarak önemli bir etki oluşturmadığı tepit edildi (Şekil 3.38). Bütün bu bulgular RT-PCR analiziyle mRNA seviyesinde de gösterilmiştir (Şekil 3.39). Fonksiyonel protein-DNA etkileşimi olarak bilinen

EMSA çalışmaları Pierce LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit™ kullanılarak gerçekleştirildi. Primerler, yoğunlukla transkripsiyon faktörlerinin bağlanma gerçekleştirdiği bölgelere özgün olarak tasarlandı. Primerler tasarlanırken 30 bp lik bir bölge alındı. Bu bölgenin ileri ve geri primerleri dizayn edildi. Tek zincirli olarak sentez ettirilen primerler bağlanma reaksiyonu ile çift zincirli hale getirildi (Bkz: Bölüm 2.7.2.2). EMSA çalışmalarında incelenen bölge Şekil 3.40'da gösterilmiştir. Bu primerler biyotinlenerek sıcak prob ve biyotinlenmemiş soğuk prob olarak yarışma deneylerinde kullanılmıştır. Aynı zamanda soğuk prob olarak SP1, USF, CEBP ve AP1 transkripsiyon faktörleri de yarışma deneylerine dahil edilmiştir (Tablo 3.6). EMSA'da, dokuya spesifik cevabı gözlemleyebilmek amaçlı Hep3B ve Saos-2 nükleer ekstraktları kullanılarak gerçekleştirildi. Hep3B hücrelerinde K1, K2 ve K3 oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.42). Oluşan bu komplekslerin 500 kat SP1 soğuk probu kullanıldığında yok olduğu gözlemlendi. Saos-2 hücrelerinde ise K1 ve K2 oluşumu gözlemlendi (Şekil 3.41). Aynı şekilde SP1 transkripsiyon faktörünün soğuk probu kullanıldığında bu komplekslerin yok olduğu tespit edildi. her iki dokuda da SP1 transkripsiyon faktörünün URG-4 promotor bölgesine bağlandığını göstermektedir. Hep3B hücrelerinde SP1 transkripsiyon faktörü bağlanmasının spesifitesini gösterebilmek amaçlı süpershift yarışma deneyleri SP1 antikoru bağlanma reaksiyonuna eklenerek gerçekleştirildi ve SP1 antikoru bağlandığında ağırlaşan kompleks fotoğraf üzerinde oklarla gösterildi (Şekil 3.42). Böylece, Sp1 transkripsiyon faktörünün biyoinformatik analiz sonucunda tespit edilen sonucu *in vitro* olarak da kanıtlanmış oldu.

Tezin ikinci basamağını URG-4 geninin sitokinlerle regülasyonu oluşturmaktadır. Sitokinler, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyici salgılanan glikoproteinlerdir. Hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak ilgili olduğu genin ekspresyonunu artırır veya azaltırlar [22]. Tez çalışması kapsamında hücre proliferasyonu, büyümenin inhibisyonu ve farklılaşma gibi çeşitli görevlere sahip olan TGF- β sitokini ile hücre büyümesi, tümör oluşumu, tümörijenite, enflamasyon, viral replikasyon, septik şok ve otoimmün gibi fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan pleiotropik bir sitokin olan TNF- α sitokinleri seçilmiştir [24,25,48]. Doza bağımlı ve zamana bağımlı cevabın incelenmesi amacıyla 10, 100, 200 ve 500 Ü/mL olacak şekilde geniş doz aralığı ve 1, 3, 6, 24, 48, 72 saat olarak geniş zaman aralığı belirlenmiştir. Hep3B hücrelerinde URG-4 geni etkisi araştırılmasının yanı sıra yan

model olarak PC3 hücre hattı seçilmiştir. Bu deneysel plan oluşan etkinin dokuya spesifik olup olmadığını belirlemek içindir. Oluşan etki hem mRNA seviyesinde qPCR metodu uygulanarak hem de protein seviyesinde western blotting ve immunoflorasan tekniği ile gösterildi.

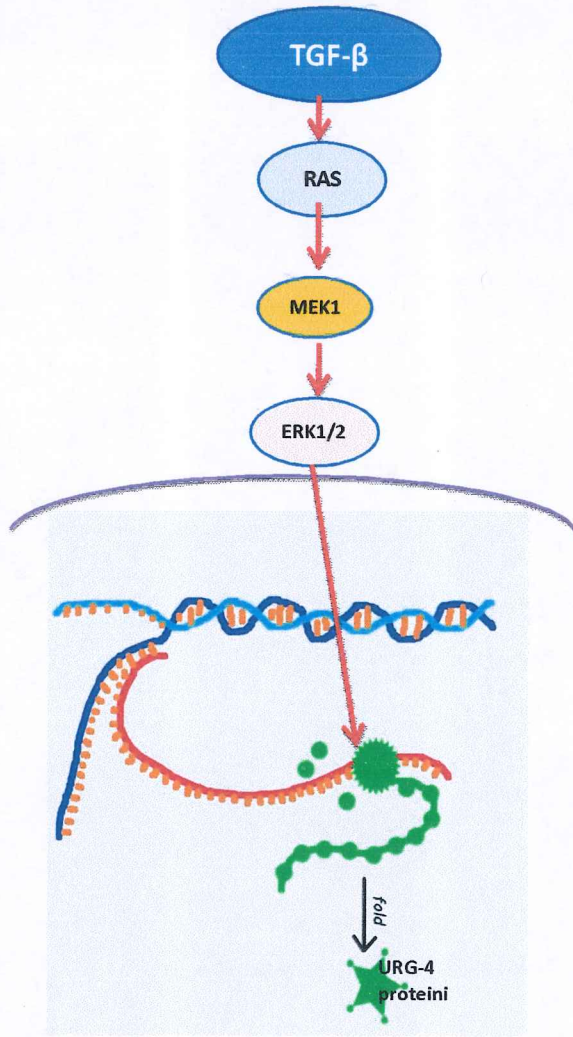
TGF- β sitokini Smad bağımlı ve Smad bağımsız sinyal iletimini gösteren bir sitokindir. Bu protein görevlerini TGF- β tip I, tipII ve tipIII reseptörlerine bağlanarak yerine getirmektedir. Ancak TBRII ve TBRI reseptörlerinin pek çok insan kanserlerinde mutasyona uğradığı ve TGF- β cevabının bu kanserlerde kapalı olduğu yapılan literatür analizleri sonucunda elde ettiğimiz bulgular arasındadır [28-30]. Bu yüzden uygulanan TGF- β cevabının Hep3B hücrelerinde oluşup oluşmadığının test edilmesi oldukça önem arz etmektedir. MTT analizi yoluyla Hep3B hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Özellikle 24 ve 48. saatlerde görülen azalmalar Hep3B hücrelerinde bu reseptörlerin mutant olmadığını ve sitokinin sinyal oluşumunu başlatabildiği bulgusunu bize söylemektedir (Şekil 3.44). TGF- β uygulanan örneklerde Smad 2/3 proteininin arttığını göstererek de Hep3B hücrelerinin bu sitokine dirençli olmadığını gösterilmiştir (Şekil 3.59).

Yaptığımız çalışma sonucunda TGF- β sitokininin hem erken (1, 3, 6) hem de geç saatlerde (24, 48 ve 72) özellikle 10 ve 100Ü/mL dozlarda URG-4 geni ekspresyonunu arttırdığı hem mRNA (qRT-PCR) hemde protein seviyesinde (Western Blotting ve IFC) gösterildi (Şekil 3.45 ve 3.53). Aynı etki özellikle 100 Ü/mL dozda PC3 hücrelerinde de gösterilmiştir (Şekil 3.46).

Promotor bölgesi üzerine etkisinin aydınlatılması amacıyla promotor konsantraktlarının transfekte ettiğimiz kuyucuklara TGF- β sitokini uygulayarak bazal aktivitelerinde oluşan değişikliği gözlemledik. Yaptığımız analiz sonucunda sitokinin -344/+63 URG-4 promotor parçasının bazal aktivitesini arttırdığı tespit edildi (Şekil 3.56). Diğer promotor parçalarında herhangi bir arttırıcı etki rastlanmamıştır. Bunun nedeni, özellikle -344 ile -482 arasında bu arttırıcı etkiyi bastırarak farklı transkripsiyon faktörü etkileşimlerin bulunması olabilir. Bu bölgenin delesyonu TGF- β cevabın transkripsiyonel düzeyde arttırdığını göstermektedir.

URG-4 genini regüle ettiğini düşündüğümüz bu sitokinin çeşitli yolak inhibitörleri kullanarak mRNA seviyesindeki değişiklikleri inceledik. Yapılan

inhibitör deneylerinde sikloheksimid, protein sentezi inhibitörü, Mek-1 MAPK inhibitörü, wortmanin ise PI3K inhibitörüdür. 500 Ü/mL TGF- β 6 saat uygulama sonucu URG-4 mRNA'sı arttırmıştır. Ayrıca aynı durum, sikloheksimid TGF- β uygulamasından elde edilmiştir. Özellikle sikloheksimid uygulaması protein sentezini inhibe ettiği için mRNA populasyonunun tam bir göstergesi olacağı unutulmamalıdır. MEK-1 uygulaması ise TGF- β artışını inhibe ederken Wortmanin uygulaması ise TGF- β cevabını inhibe edemediğini göstermektedir. Yani TGF- β URG-4 mRNA ve protein düzeyindeki artışı MEK-1 üzerinden oluşturmaktadır. Bu olası yol Şekil 4.1'de şematize edilmiştir (Şekil 3.57 ve Şekil 3.58).



Şekil 4.1: URG-4 geni ifadesinin TGF- β sitokini üzerinden olası düzenlenmesi

Yalnız uygulanan inhibitörlerin DMSO'da çözülmesi nedeniyle aynı miktarda DMSO da hücrelere uygulanmıştır (Şekil 3.58). Uygulanan DMSO'nun Smad2/3

proteinini TGF- β cevabı kadar indüklediği görülmektedir (Şekil 3.59). DMSO'nun bazı hücre içi yolları aktive ettiği ve bazı hücre farklılaşmalarını indüklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [73]. Örneğin DMSO'nun eritpoetik farklılaşmayı p38 yolu üzerinde yaptığı Breig ve ark 2013 tarafından gösterilmiştir [73].

TNF- α sitokini 3 monomer içeren Tip II transmembran glikoproteindir. TNF sitokini bir çok biyolojik aktivitesini TNFR1'e bağlanarak gösterir [49]. TNF- α tümörjeniteye neden olan sitokin olduğundan URG-4 geni ile bir bağlantısı olabileceğini düşündük. İlk olarak bu sitokinin Hep3B üzerine etkisini MTT analizi ile inceledik. Yaptığımız çalışma sonucunda sitokin 24 ve 48 saatleri sonunda Hep3B hücrelerini azaltırken, 72. saat sonunda etkisi artıcı yönde değişmektedir. Yapılan başka bir çalışma serum açlığına bırakılmış ve bırakılmamış Hep3B hücrelerinin TNF- α konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Literatürde, Hep3B hücrelerinde serum açlığı olan hücrelerde düşük dozlarda artış olurken yüksek dozlarda azalma olduğu söylenmektedir [78]. Ancak uygulanan dozlar ve zaman örtüşmediği için sonuçların karşılaştırılması pek mümkün olmamaktadır. Genel olarak MTT analizi sonucunda Hep3B hücrelerinin TNF- α sitokinine yanıt oluşturduğu çalışma sonucunda tespit edildi (Şekil 3.60).

URG-4 geni ifadesini bütün saatlerde özellikle 6, 24 ve 48. saatlerde belirgin olarak attırdığı (Şekil 3.62) gözlemlendi. Aynı arttırıcı etki hepatoma olmayan yan model olarak seçilen prostat kanseri hücre modeli (PC3) üzerinde de görüldü. Bu artış bize iki ayrı doku modelinde URG-4 geninin TNF- α sitokinine arttırıcı yönde ilişkisi olduğunu göstermektedir (Şekil 3.63). Yapılan analizler sonucunda 10 Ü/mL dozda sitokinin erken ve geç saatlerde URG-4 genini arttırdığı, daha yüksek dozlarda ise 6, 24, 48 ve 72. saatlerde arttırıcı yönde etki ettiği tespit edildi (Şekil 3.63). Aynı etki western tekniği ile protein seviyesinde de gözlemlenmiştir (Şekil 3.64).

Promotor aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde TNF- α sitokininin insan URG-4 promotor dizilerinin bazal aktivitesini azalttığı tespit edildi. TNF- α 'nın arttırıcı etkisini görememizin nedeni, bu promotor aralığında TNF α 'nın regüle ettiği bir transkripsiyon faktörünün URG-4 promotoru üzerine bağlanmaması olarak düşünülebilir (Şekil 3.65).

TNF- α sitokini TNFRI reseptörüne bağlandığında TRADD (TNFRI Bağlantılı Ölüm domaini: TNFRI-associated Death Domain) ve FADD (FAS bağlantılı ölüm Domaini: FAS-associated death domain) adaptör proteinleri aktive olur. TRADD ve FAD adaptör proteinleri TNFRI'de bulunan ölüm domainlerine bağlanır ve kaspaz yolağı aktive olur. İkinci apoptotik yolak TRADD'ın RIP (Receptor interacting protein: Reseptör ilişkili protein) adı verilen proteini aktive etmesiyle başlar [47]. TNFRII'ye bağlandığında ise NFK β transkripsiyon faktörünü aktive eder ve hücre yaşayabilirliği yolakları çalışır.

Yapılan inhibitör deneyleri çerçevesinde Mek1 MAPK inhibitörü, wortmanin ise PI3K inhibitörü olarak ayrıca SP600125 ise JNK yolu inhibitörü olarak kullanılmıştır. 200 Ü/mL TNF- α 6 saat uygulama sonucu URG-4 mRNA'sı arttırdığı tespit edildi. MEK-1 inhibitörünün uygulaması TNF- α artışı inhibe etmezken SP600125 uygulaması ise hem RNA hemde protein düzeyinde URG-4'ün TNF- α cevabını inhibe etmektedir (Şekil 3.66 ve 3.67) Dolayısıyla çalışma sonucunda sitokinin JNK yolu üzerinden URG-4 geni ekspresyonunu etkilediği tespit edildi. Yani TNF- α sitokini Hep3B hücrelerinde TNFRII üzerinden JNK'yı aktive ederek URG-4 geni ekspresyonunu arttırmakta olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir.

Tezin son aşaması URG-4 proteini hakkında bilgi edinmemizi sağlayan basamakları içermektedir. URG-4 geninin proteini hakkında bilgiler oldukça kısıtlıdır. URG-4 genine ait 4 tane varyant bulunmaktadır. Bu varyantların hücrede nerede buldukları ve ne görev yaptıkları konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Genin proteini ektopik ekspre edildiğinde proliferatif özellikte olduğu analiz edilmiş ancak fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu amaçla ilk olarak genin ifadesini İnsan kanı, MG-63, MCF-7, DU145, Huvec, Isckawa, Hela, Hep3B, PC3, HT29, Saos-2 ve HL-60 gibi çeşitli hücre hatlarında ifadesi araştırılmıştır. Ekspresyon analizlerini RT-PCR metoduyla incelediğimizde genin en çok olarak MCF-7 hücrelerinde ekspre olduğunu gösterildi (Şekil 3.71). Protein seviyesinde en yüksek olarak HL-60 hücrelerinde bulunmuştur (Şekil 3.72).

Hücre lokalizasyonu IFC metodu ile PC3 ve Hep3B hücre hatlarında incelenmiş, her iki hücre hattında da hem çekirdek hemde sitoplazmada bulunduğu yeşil florasan ışına veren antikolar kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 3.72 ve 3.73).

Aynı şekilde URG-4 cDNA'sının ektojik ekspre olduğu hücre ve olmadığı hücrelerden NE-PER kiti TM kullanılarak hazırlanan nüklear ve sitoplazmik ekstraktlarla yapılan western analiz sonucu bize URG-4 geni over ekspre olan hücrelerde 130 kDA civarında da bant oluşumu gözlenmiştir. Ekspresyonu hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunmuştur (Şekil 3.87).

URG-4 geni 7. Kromozomun kısa kolunda olup yaklaşık 50 bin bazlık diziyi içermektedir (43,915,501-43,967,000). İnsanda URG-4 genine ait 4 varyantı bulunmaktadır. *Varyant 1* NM_017920, *Varyant 2* NM_001077664, *Varyant 3* NM_001077663 ve *Varyant-4* NM_001290076 erişim numaralarıyla gen bankasında bulunmaktadır. *Varyant-1* mRNA'sı 3609bç, *Varyant-2* 3831 bç, *Varyant-3* 3036 ve *Varyant-4* mRNA'sı 3957 bç uzunluğundadır (Şekil 3.76). URG-4 genine ait varyantlar biyoinformatik analizlerle karşılaştırıldığında translasyonel başlangıç kodonu 1. ve 3. varyantlarda ilk ekzonda yer alırken *Varyant-2'de* 4. ekzonda bulunduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra *Varyant-3'ün* (931 aminoasit) diğer varyantlarla karşılaştırıldığında en büyük proteini kodladığı tespit edildi (Şekil 3.77).

İkinci aşama olarak varyant mRNA'ları birbirleriyle blast yapıldığında *Varyant-2 ve Varyant-4'ün* ilk ekzonu olan 1-267 bç'lik bölgenin bu varyantlara spesifik olduğu teyit edildi. Bu varyantların hangi kanser hücrelerinde ifade olduğunun merak edilmesi üzerine bu bölgeye spesifik primerler tasarlandı ve sqPCR çalışması yapıldı. Analiz sonucunda *Varyant-2 ve Varyant-4 cDNA'sında Varyant -1 ve Varyant-3 cDNA'sının* ekspre olduğu kanser hücre hatlarında ekspre olduğu tespit edildi (Şekil 3.78).

URG-4 proteininin yapısı ve işleyişi hakkında literatürde yeterli bilgi bulunamasından dolayı varyant 1 protein dizisini <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> web tabanı üzerinden yükleyerek biyoinformatik protein analizi yaptırıldı. Analiz sonucunda URG-4 proteininin 3 boyutlu yapısı hakkında 5 model önerilmiştir. 5 modelden C değeri en yüksek olan URG-4 proteinine en benzer model olarak düşünülmektedir (Şekil 3.79).

Z skoru baz alınarak yapılan biyoinformatik analiz sonucunda diziyeye en yakın kalıp HUMAN GUANYLATE BINDING PROTEIN-1 IN COMPLEX WITH THE GTP ANALOGUE,GMPPNP: İnsan Guanilat Bağlanma Proteini'dir.

Tm skoru hesaplanarak. yapılan analiz sonucunda 0,881 değeriyle “Crystal Structure of The Cand1-Cul1-Roc1 Complex” enzimi yapısal analogu olarak tespit edilmiştir.

I-TASSER fonksiyonel özellikler, EC (Yüzde Enzim) değerleri, GO (Gene Ontoloji) ve BS (Bağlanma Bölgeleri) değerleri hesaplanarak belirlenir. Program tarafından bu değerler analiz edildiğinde 5 enzim homoloğu önerilmektedir. Bu enzimler Geranylgeranyltransferase from rat brain, Sellobiyoz fosforilaz, İnsülin değrede eden enzim, rat protein farnesiltransferaz ve Glutamat sentaz olarak önerilmektedir.

URG-4 *Varyant-1* cDNA’sının tamamı ATG ve sonlanma kodonlarını içerecek şekilde ökaryotik ekspresyonu vektörü olan pCDNA3.2 içine klonlandı. Topo Gateway kiti™ kullanılarak gerçekleştirilen klonlama sonucunda oluşan rekombinant plazmit dizi analizine gönderilecek cDNA’da herhangi bir mutasyon olup olmadığı incelendi. URG-4 geni içeren pCDNA3.2 vektörü Hep3B hücrelerine geçici transfekte edildi ve ekspresyon seviyesindeki artış RT-PCR, sq-PCR ve western metodu ile gösterildi. URG-4 transfekte edilen hücrelerde genin ekspresyonunda artış olmaktadır. Proliferatif özelliği MTT ve hücre sayımı metodu kullanılarak incelenmiş, çalışma sonucunda URG-4 transfekte edilen hücrelerde proliferasyonun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.84B ve 3.84C) Aynı zamanda koloni oluşturma kabiliyeti Hep3B hücrelerinde koloni formasyon deneyi ile tespit edilmiştir. URG-4 transfekte edilmiş hücrelerde koloni oluşumunun 2 kat arttığı yapılan çalışma sonucunda analiz edilmiştir (Şekil 3.85 ve Şekil 3.86).

Dokuya spesifik cevabın oluşup oluşmadığı gözlemlenmesi adına URG-4 geni cDNA’sı Saos-2 hücrelerine kalıcı olarak tranfekte edildi. Ektopik ifadesinin başarılı olup olmadığı qPCR metoduyla belirlendi. Aynı zamanda proliferatif karakterinin Hep3B hücrelerinde olduğu gibi Saos-2 hücrelerinde de oluştuğu yapılan MTT ve hücre sayımı sonuçlarında gösterilmiştir. URG-4 geninin proliferatif özelliğinin vurgulandığı Hep3B hücreleri ile ilgili olan çalışmalar mevcuttur. Ancak Saos-2’lerde ilk defa yaptığımız çalışma sonucunda gösterilmiş oldu. TGF-β ve TNF-α sitokinlerinden nasıl etkilendiği RT- analiz yöntemiyle belirlendi. Yapılan analiz sonucunda URG-4 ektopik ekspre olan hücrelerde TGF-β sitokini URG-4

mRNA seviyesinde daha fazla artışa neden olurken, TNF- α sitokini tam tersi bir şekilde URG-4 ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 3.90, 3.91).

5. KAYNAKLAR

- [1] [online] (13.05.2014), www. Bebymackenzie.org, “What is cancer, What are the signs, Could my baby have it?”.
- [2] Alican, F., *Kanser*, İstanbul: Afa Matbaacılık, (1997).
- [3] William, S. K., Michael R. C. and Charlotte, A. S., *Genetik Kavramlar*, (Çev: C. Öner), Palme Yayıncılık, (2003).
- [4] Komarova, N. L., Sengupta, A. ve Nowak, M. A., “Mutation–selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability”, *Journal of Theoretical Biology*, 223, 433–450, (2003).
- [5] Sherr, C. J., ve McCormick, F., “The RB and p53 pathways in cancer”, *Cancer Cell*, 2, 103-112, (2002).
- [6] Wang, Y. Z. ve Wong, Y. C., “Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer: A Review”, *Ural Oncol*, 3 (4), 41-46, (1997).
- [7] Diamandis, E. P., “Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer”, *Clinica Chimica Acta*, 257, 157-180, (1997).
- [8] Jackson, A. L. ve Loeb, L. A., “The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer”, *Mutation Research*, 477, 7–21, (2001).
- [9] Mallikarjun, P., Navjotsingh, P, Zheng D., “Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation”, *Cell. Mol. Life Sci*, 70, 4009–4021, (2013).
- [10] Elledge, S. J., “Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis”, *Science*, 274, 1664–1672, (1996).
- [11] Nurse, P, “A long twentieth century of the cell cycle and beyond”, *Cell*, 100, 71–78, (2000).
- [12] Cimprich, K. A., Cortez, D., “ATR: an essential regulator of genome integrity”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 616–627, (2008).

- [13] Dai, Y., Grant, S., “New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network”, *Clin Cancer Res*, 16, 376–383, (2010).
- [14] Santiago, D. M., Míriam, T. C., Anibal, M., Marta, C., “Targeting cell cycle regulation in cancer therapy”, *Pharmacology & Therapeutics*, 138, 255–271, (2013).
- [15] Micheal J. B., “Cell Cycle and Proliferation”, *Cell Signalling Biology*, doi:10.1042/csb0001009, (2012).
- [16] Jinghui, H., Bing, Z., Lei, L., Zhaorui, L., Yingmei, W., Xiaoting, Y., Satiroğlu-Tufan, N. L., Jie, L. and Zhuojing, L., “The expression of novel gene URG4 in osteosarcoma correlation with patients’ prognosis”, *Pathology*, 41(2),149–154, (2009)
- [17] Jiugang, S., Huahong, X., Zhaorui, L., Guitao, Y., Rui, D., Yulei, D., Xue, Z., HaiFeng, J., Juan, G., Jie, L. and Daiming, F., “Enhanced Cell Survival of Gastric Cancer Cells by a Novel Gene URG4”, *Neoplasia*, 8, 995–1002, (2006).
- [18] Satiroglu-Tufan, N.L., Dodurga, Y., D., Gok, Cetinkaya A., and Feitelson M.A., “RNA interference-mediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells”, *Genet. Mol. Res.*, 9 (3), 1557-1567, (2010).
- [19] Satiroglu Tufan, N. L., Zhaorui, L., Liu, J., Jingbo, P., Patrick, A., Kewy, M., Clayton, M., M., Zhuz M. and Feitelson M. A., “Hepatitis Bx Antigen Stimulates Expression of a Novel Cellular Gene, URG4, that Promotes Hepatocellular Growth and Survival”, *Neoplasia*, 4, 355–368, (2002).
- [20] Xie, C, Song, L. B., Wu, J. H., Li, J., Yun, J. P., “Upregulator of Cell Proliferation Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma and Contributes to Hepatocarcinogenesis by Downregulating FOXO3a”, doi: 10.1371/journal.pone.0040607, (2012).
- [21] Dodurga, Y, Yonguc, G. N., Avci, C. B, Bagci, G., Gunduz, C., Satiroglu-Tufan, N. L., “Investigation of microRNA expression changes in HepG2 cell

- line in presence of URG4/URGCP and in absence of URG4/URGCP suppressed by RNA interference”, *Mol Biol Rep*, 39 (12), 11119–11124, (2012).
- [22] Walid, S., Anup, K. S., Kefah, M., “The Role of Suppressors of Cytokine Signalling in Human Neoplasms”, *Molecular Biology International*, 2014, 1-24, (2014).
- [23] Burska, A., Boissinot, M. and Ponchel, F., “Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis”, *Mediators Inflamm.*, 2014, 1-24, (2014).
- [24] Massagué, J., Blain, S. W. and Lo, R. S., “TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders”, *Cell*, 103, 295–309, (2000).
- [25] Pardali, K. and Moustakas, A., “Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1775, 21–62, (2007).
- [26] Hartsough, M. T. and Mulder, K. M., “Transforming growth factor- β signaling in epithelial cells”, *Pharmacol. Ther.*, 75 (1), 21–41, (1997).
- [27] Bierie, B. and Moses, H. L., “TGF- β and cancer”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 29–40, (2006).
- [28] de Caestecker, M. P., Piek, E. and Roberts, A. B., “Role of transforming growth factor- β signaling in cancer”, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92 (17), 1388–1402, (2000).
- [29] Lampropoulos, P., Zizi-Sermpetzoglou, A., Rizos, S., Kostakis, A., Nikiteas, N. and Papavassiliou, A. G., “TGF-beta signalling in colon carcinogenesis”, *Cancer Lett.*, 314, 1–7, (2012).
- [30] Leivonen, S. K. and Kähäri, V. M., “Transforming growth factor- β signaling in cancer invasion and metastasis”, *Int. J. Cancer*, 121, 2119–2124, (2007).
- [31] Massagué, J. and Gomis, R. R., “The logic of TGF β signaling”, *FEBS Lett.*, 580, 2811–2820, (2006).

- [32] Guo, Y. and Kyprianou, N. "Restoration of Transforming Growth Factor β Signaling Pathway in Human Prostate Cancer Cells Suppresses Tumorigenicity via Induction of Caspase-1-mediated Apoptosis", 59, 1366–1371, (1999).
- [33] Tian, M. and Schiemann, W. P., "The TGF- β paradox in human cancer: an update", *Future Oncol.*, 5 (2), 259–271, (2009).
- [34] Bierie, B. and Moses, H. L., "TGF- β and cancer", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 29–40, (2006).
- [35] Bierie, B. and Moses, H. L., "Transforming growth factor beta (TGF- β) and inflammation in cancer", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21, 49–59, (2010).
- [36] Leivonen, S. K. and Kähäri, V. M., "Transforming growth factor- β signaling in cancer invasion and metastasis", *Int. J. Cancer*, 121, 2119–2124, (2007).
- [37] Massagué, J., Blain, S. W. and Lo, R. S., "TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders", *Cell*, 103, 295–309, (2000).
- [38] Markowitz, S. D. and Roberts, A. B., "Tumor suppressor activity of the TGF- β pathway in human cancers", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 7 (1), 93–102, (1996).
- [39] Miyazono, K., Ehata, S. and Koinuma, D., "Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer", *Ups. J. Med. Sci.*, 117, 143–152, (2012).
- [40] Pardali, K. and Moustakas, A., "Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer", *Biochim. Biophys. Acta*, 1775, 21–62, (2007).
- [41] Shi, Y. and Massagué, J., "Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus", *Cell*, 113, 685–700, (2003).
- [42] Huber, M. A., Kraut, N., and Beug, H., "Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression", *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17, 548–558, (2005).

- [43] Roberts, A. B., Tian, F., Byfield, S. D., Stuelten, C., Ooshima, A., Saika, S. and Flanders, K. C., "Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 19–27, (2006).
- [44] Jakowlew, S. B., "Transforming growth factor- β in cancer and metastasis", *Cancer Metastasis Rev.*, 25, 435–457, (2006).
- [45] Mu, X., Lin, S., Yang, J., Chen, C., Chen, Y., Herzig, M. C., Washburn, K., Halff, G. A., Walter, C. A., Sun, B. and Sun, L. Z., "TGF- β signaling is often attenuated during hepatotumorigenesis, but is retained for the malignancy of hepatocellular carcinoma cells", *PLoS One*, 8 (5), 1-12, (2013).
- [46] Drazen, B., Zimonjic, Xiaoling, Z., Ju-Seog, L., Veronika, U.-B., Veenu, T., Snorri, S. T., Nicholas C. P., "Acquired genetic and functional alterations associated with transforming growth factor type I resistance in Hep3B human hepatocellular carcinoma cell line", *J. Cell. Mol. Med.*, 13,3985-3992, (2009).
- [47] Denise L. F., Miriam D., "TNF receptor 2 and disease: autoimmunity and regenerative medicine", *Frontiers in Immunobiology*, 4, doi: 10.3389/fimmu.2013.00478. (2013).
- [48] Croft, M., "The TNF family in T cell differentiation and function - Unanswered questions and future directions", *Semin. Immunol.*, (in press) (2014).
- [49] Jarrot, P. A. and Kaplanski, G., "Anti-TNF-Alpha Therapy and Systemic Vasculitis", *Mediators Inflamm.*, 2014, 1-9, (2014).
- [50] Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., Goeddel, D. V., "TRAF2-mediated activation of NF-kappaB by TNF receptor 2 and CD40", *Science*, 269, 1424–7, (1995).
- [51] Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., Goeddel, D.V., "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor.", *Cell*, 78, 681–92. (1994).

- [52] Aggarwal, B. B, Gupta, S. C, Kim, J. H, "Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey", *Blood* 119, 651–665, (2012).
- [53] Sabio, G. and Davis, R. J., "TNF and MAP kinase signalling pathways", *Semin. Immunol.*, (in press) (2014).
- [54] Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Mannel, D. N., Scheurich, P. "TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1", *Eur J Immunol*, 28, 257–263, (1998).
- [55] Böcker, W., Docheva, D., Prall, W. C., Egea, V., Pappou, E., Rossmann, O., "IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells" *J Mol Med*, 86, 1183–1192, (2008).
- [56] Yıldırım, H., "Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi", Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, (2009).
- [57] G., "Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280 absorbance ratios", *BioTechniques*, 18 (1), 62-63, (1995).
- [58] Köçkar, F. T., "Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene", Ph.D, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, (1999).
- [59] Paul, N., Shum, J., Le, T., "Hot start PCR", *Methods Mol Biol*, 630 301-18, (2010).
- [60] Korbie, D. J., Mattick, J. S., "Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification", *Nat Protoc*, 3 (9), 1452-6, (2008).
- [61] Froger, A., Hall, J. E., "Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method", *J Vis Exp*, (6), 253, (2007).
- [62] Aydın, M., "İnsan Karbonik Anhidraz I (hCA I) Geninin Klonlanması, *E.Coli*'de Ekspresyonu ve Phe91Asn Yönlendirilmiş Mutageniziyle Elde Edilen Mutant Enzimin inhibitörlere Karşı ilgisinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, (2007).

- [63] Scientific, T., GeneJET Plasmid Miniprep Kit Product Information, Thermo Fisher Scientific Inc., 2011.
- [64] [online], (23.07.2013), www.thermoscientific.com/fermentas.
- [65] Markova, S. V., "Cloning and Expression of cDNA for a Luciferase from the Marine copepod *Metridia longa*", *J Biol Chem*, 279 (5), 3212-3217, (2004).
- [66] Strober, W., "Trypan blue exclusion test of cell viability", *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3 Appendix 3B, (2001).
- [67] Berridge, M. V, Herst, P. M. and Tan, A S., "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction", *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152, (2005).
- [68] Fritschy, J. M., Härtig, W., "Immunofluorescence", eLS, John Wiley & Sons, Ltd, Almany, (2001).
- [69] Hellman, L. M., Fried, M. G., "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions", *Nat Protoc*, 2 (8), 1849-61, (2007).
- [70] Abramoff, M.D., M., P.J., R., S.J., "Image Processing with ImageJ", *Biophotonics International*, 11 (7), 36-42, (2004).
- [71] Ralser, M., Querfurth, R., Warnatz, H. J., Lehrach, H., Yaspo, M. L., Krobitsch, S., "An efficient and economic enhancer mix for PCR", *Biochem Biophys Res Commun*, 347 (3), 747-51, (2006).
- [72] Alper, M., Kockar, F., "IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway", *Mol Cell Biochem*, DOI 10.1007/s11010-014-2056-9, (2014).
- [73] Osman, B., Oriane T. S., Faouzi B., "Combined inhibition of PI3K and activation of MAPK p38 signaling-pathways trigger erythroid alternative splicing switch of 4.1R pre-mRNA in DMSO-induced erythroleukemia cells", *Cellular Signalling*, 25, 2453-2461, (2013).
- [74] [online], (13.05.2014), <http://www.abcam.com/urg4-antibody-ab103323.html>

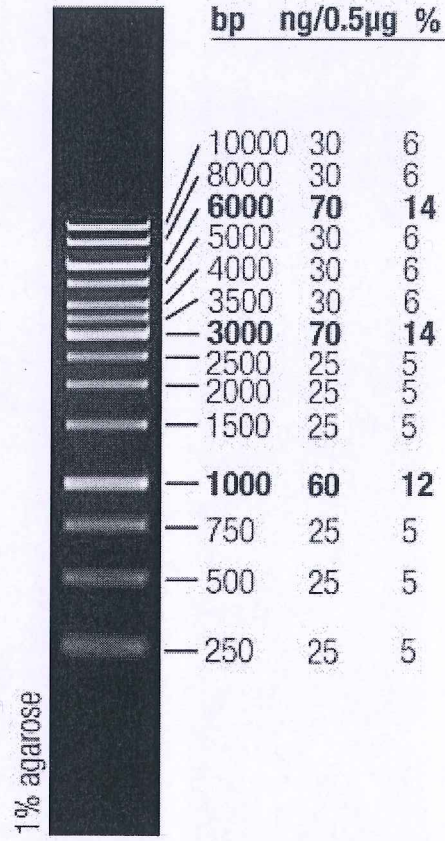
- [75] Alper K and Yang Z., "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction", *Ambrish Roy*, doi:10.1038/nprot.2010.5, (2010).
- [76] Seizl, M., Hartmann, H., Hoeg, F., Kurth, F., Martin, D. E., Ding, J., Cramer, P., "A Conserved GA Element in TATA-Less RNA Polymerase II Promoters", *PLoS ONE*, Volume 6 (11), 1-8, (2011).
- [77] Kockar, F. T., Foka, P., Hughes, T. R., Kousteni, S., Ramji, D. P., "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 Rec*, 29 (2), 362-72, (2001).
- [78] Xingrui, K., Yingying, J., Weijie, D., Kai, S., Zhipeng, H., Fei, Y., Guofeng, Y., Qingmin, F., Lu, G., Qiudong, Z., Xue, Z., Rong, L., Lixin, W. and Mengchao, W., "Tumor necrosis factor- α attenuates starvation-induced apoptosis through upregulation of ferritin heavy chain in hepatocellular carcinoma cells", *BMC Cancer*, 13, 438-452, (2013)

EKLER

6. EKLER

EK -A: DNA MARKER 1KB

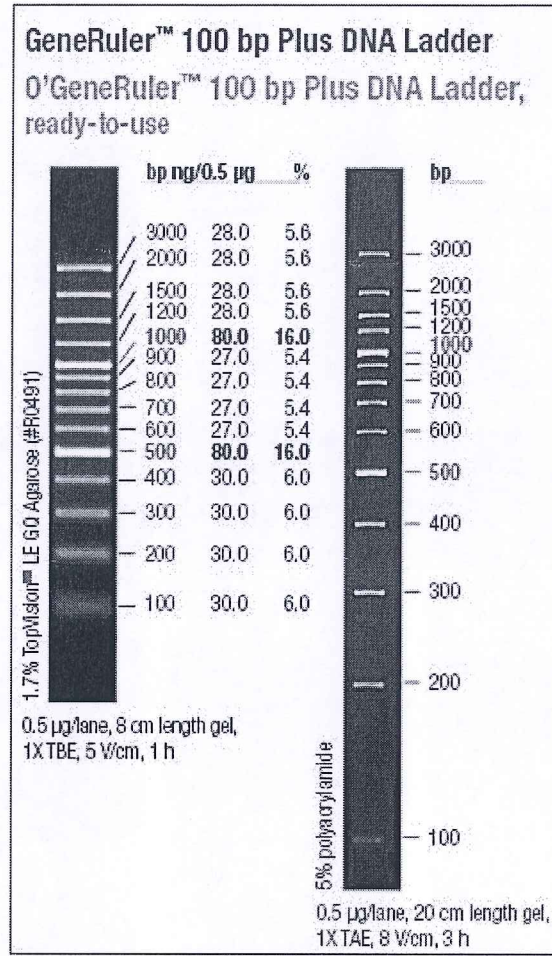
GeneRuler 1 kb DNA Ladder



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

Şekil 6.1: DNA büyüklük belirteci (1 kb) SM0311 Fermentas

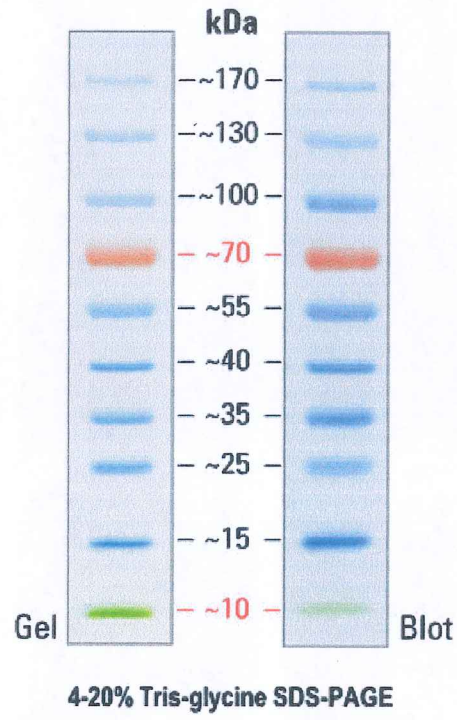
EK- B DNA MARKER 100bp



Şekil 6.2: DNA büyüklük belirteci (100bp)

EK- C PROTEİN MARKER

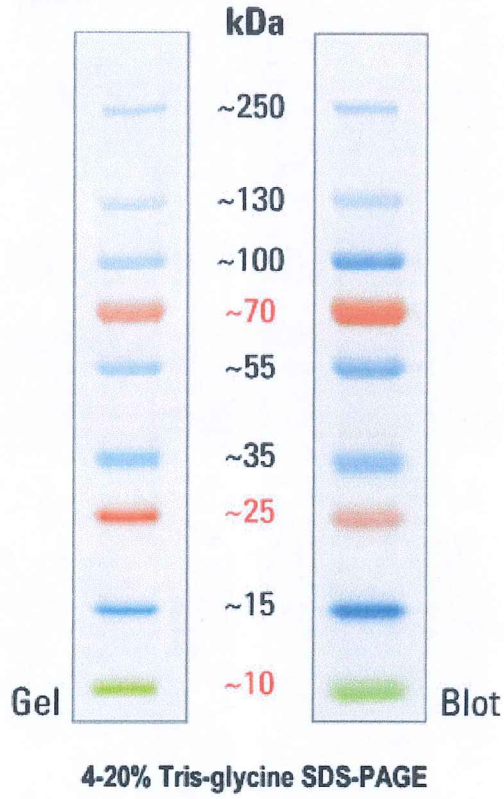
Representative picture of PageRuler Prestained Protein Ladder



Şekil 6.3: Protein büyüklük göstergesi (PAGE ruler prestained Fermentas /26616)

EK- D PROTEİN MARKER

Representative picture of PageRuler Plus Prestained Protein Ladder



Şekil 6.4: Protein büyüklük göstergesi (PAGE ruler prestained Fermentas /26619)

EK- E URG-4Promotor Bölgesi Restriksiyon Haritası

Noncutters: AatII, AbsI, AccI, AclI, AflIII, AflIII, AgeI, AjuI, AlfI, AloI, AlwNI, ApaLI, ArsI, AscI, AsuII, AvrII, BaeI, Ball, BamHI, BbvCI, BccI, BciVI, BclI, Bfil, BglI, BpII, BsaAI, BsaBI, BsePI, BseRI, BsgI, Bsml, Bsp1407I, BspHI, BstEII, BtgZI, CspCI, DraIII, DrdI, Eam1105I, EciI, Eco47III, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Fall, FokI, FseI, FspAI, HindII, HindIII, HpaI, MauBI, MfeI, MluI, MslI, NcoI, NdeI, NheI, NruI, NspI, OliI, PacI, PflMI, PmaCI, PmeI, PpiI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PvuI, RsrII, SacI, Sall, SanDI, SapI, ScaI, PI-SceI, SexAI, Sfil, Sgfl, SgrAI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, StyI, SwaI, TaqII, TatI, TsoI, TspGWI, XbaI, XcmI, XhoI

Tablo 6.1: URG-4Promotor Bölgesi Restriksiyon Haritası

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>BtrI</u>	CACGTC	6	blunt	1	803
<u>NaeI</u>	GCCGGC	6	blunt	1	92
<u>PvuII</u>	CAGCTG	6	blunt	1	187
<u>SspI</u>	AATATT	6	blunt	1	1187
<u>StuI</u>	AGGCCT	6	blunt	1	404
<u>XmnI</u>	GAANNNTTC	6	blunt	1	1516
<u>AarI</u>	CACCTGC	7	five_prime	1	253
<u>BglIII</u>	AGATCT	6	five_prime	1	1577
<u>Bpu10I</u>	CCTNAGC	6	five_prime	1	1025
<u>BseYI</u>	CCCAGC	6	five_prime	1	187
<u>Cfr10I</u>	RCCGGY	6	five_prime	1	90
<u>Clal</u>	ATCGAT	6	five_prime	1	844
<u>Esp3I</u>	CGTCTC	6	five_prime	1	475
<u>NarI</u>	GGCGCC	6	five_prime	1	68
<u>NotI</u>	GCGGCCGC	8	five_prime	1	55
<u>PasI</u>	CCCWGGG	7	five_prime	1	318
<u>PleI</u>	GAGTC	5	five_prime	1	642
<u>PpuMI</u>	RGGWCCY	7	five_prime	1	161
<u>SfaNI</u>	GCATC	5	five_prime	1	1225
<u>SmlI</u>	CTYRAG	6	five_prime	1	1324
<u>Tth111I</u>	GACNNGTC	6	five_prime	1	1538
<u>XhoII</u>	RGATCY	6	five_prime	1	1577

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>ApaI</u>	GGGCCC	6	three_prime	1	157
<u>BseSI</u>	GKGCMC	6	three_prime	1	157
<u>HaeII</u>	RGCICY	6	three_prime	1	71
<u>Hpy99I</u>	CGWCG	5	three_prime	1	5
<u>KpnI</u>	GGTACC	6	three_prime	1	490
<u>PstI</u>	CTGCAG	6	three_prime	1	593
<u>SacII</u>	CCGCGG	6	three_prime	1	61
<u>BsrBI</u>	CCGCTC	6	blunt	2	28, 104
<u>SmaI</u>	CCCGGG	6	blunt	2	158, 179
<u>AcyI</u>	GRCGYC	6	five_prime	2	3, 68
<u>ApoI</u>	RAATTY	6	five_prime	2	1307, 1512
<u>AvaI</u>	CYCGRG	6	five_prime	2	156, 177
<u>AvaII</u>	GGWCC	5	five_prime	2	161, 1418
<u>Eco3II</u>	GGTCTC	6	five_prime	2	27, 1248
<u>EcoNI</u>	CCTNNNNNAGG	6	five_prime	2	316, 642
<u>HgaI</u>	GACGC	5	five_prime	2	11, 120
<u>PfoI</u>	TCCNGGA	6	five_prime	2	106, 1411
<u>Tsp45I</u>	GTSAC	5	five_prime	2	1387, 1550
<u>VspI</u>	ATTAAT	6	five_prime	2	1183, 1342
<u>AgsI</u>	TTSAA	5	three_prime	2	1132, 1476
<u>BarI</u>	GAAGNNNNNTAC	7	three_prime	2	1026, 1058
<u>BcgI</u>	CGANNNNNTGC	6	three_prime	2	824, 858
<u>BdaI</u>	TGANNNNNNTCA	6	three_prime	2	1481, 1515
<u>BsaXI</u>	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	2	119, 149
<u>BseMII</u>	CTCAG	5	three_prime	2	470, 1270
<u>BstXI</u>	CCANNNNNTGG	6	three_prime	2	257, 821
<u>HaeIV</u>	GAYNNNNNRTC	6	three_prime	2	1225, 1259
<u>HphI</u>	GGTGA	5	three_prime	2	147, 1544
<u>MmeI</u>	TCCRAC	6	three_prime	2	438, 1032
<u>NmeAIII</u>	GCCGAG	6	three_prime	2	44, 855
<u>TstI</u>	CACNNNNNTCC	6	three_prime	2	119, 151
<u>BbvI</u>	GCAGC	5	five_prime	3	26, 185, 238
<u>BspMI</u>	ACCTGC	6	five_prime	3	253, 320, 635

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>CfrI</u>	YGGCCR	6	five_prime	3	55, 92, 783
<u>DraII</u>	RGGNCCY	6	five_prime	3	79, 161, 321
<u>TseI</u>	GCWGC	5	five_prime	3	14, 173, 226
<u>BsrDI</u>	GCAATG	6	three_prime	3	539, 1226, 1575
<u>BsrI</u>	ACTGG	5	three_prime	3	600, 786, 1266
<u>BtsI</u>	GCAGTG	6	three_prime	3	454, 799, 1018
<u>Eco57I</u>	CTGAAG	6	three_prime	3	413, 646, 1053
<u>GsuI</u>	CTGGAG	6	three_prime	3	102, 279, 583
<u>BsmAI</u>	GTCTC	5	five_prime	4	27, 475, 1248, 1527
<u>TfiI</u>	GAWTC	5	five_prime	4	585, 1055, 1262, 1472
<u>Hin4I</u>	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	4	1226, 1258, 1524, 1556
<u>SduI</u>	GDGCHC	6	three_prime	4	157, 854, 1065, 1090
<u>MboII</u>	GAAGA	5	three_prime	5	660, 1181, 1287, 1346, 1443
<u>TspRI</u>	CASTG	5	three_prime	5	454, 607, 786, 799, 1018
<u>Eco57MI</u>	CTGRAG	6	three_prime	6	102, 279, 413, 583, 646, 1053
<u>TauI</u>	GCSGC	5	three_prime	6	57, 60, 63, 97, 100, 212
<u>TspDTI</u>	ATGAA	5	three_prime	6	598, 905, 1193, 1300, 1501, 1506
<u>FauI</u>	CCCGC	5	five_prime	9	39, 95, 109, 186, 197, 231, 238, 909, 914
<u>EcoRII</u>	CCWGG	5	five_prime	13	81, 118, 213, 249, 256, 317, 853, 871, 1081, 1109, 1254, 1411, 1555

EK -F TRANKRİPSİYON FAKTÖRÜ BAĞLANMA BÖLGELERİ

Tablo 6.2: Trankripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgeleri

Trankripsiyon Faktörleri	Matriks	Bağlanma Pozisyonu	Zincir
X-box binding factors	V\$XBOX.01	12	-
Winged helix binding sites	V\$WHN.01	20	+
E-box binding factors	V\$MYCMAX.03	24	+
Core promoter motif ten elements	O\$HMTE.01	34	+
Activator-, mediator- and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	O\$XCPE1.01	47	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F4.01	47	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP4.01	49	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$NGFIC.01	55	-
Human and murine ETS1 factors	V\$PEA3.01	61	-
CTCF and BORIS gene family,	V\$CTCF.02	67	-
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.03	67	-
E-box binding factors	V\$MYCMAX.03	69	-
Nuclear respiratory factor 1	V\$NRF1.01	71	-
Nuclear respiratory factor 1	V\$NRF1.01	72	+
CTCF and BORIS gene family	V\$CTCF.02	78	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.02	83	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F3.02	86	+
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	86	-
Neuron-specific olfactory factor	V\$EBF1.01	87	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$CKROX.01	91	+
Krüppel like transcription factors	V\$KKLF.01	91	+
C2H2 zinc finger	V\$ZNF263.01	91	-

transcription factors 7			
GC-Box factors SP1/GC	V\$GC.01	92	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	93	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	94	-
Zfx and Zfy - transcription factors implicated in mammalian sex determination	V\$ZFX.01	98	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$WT1.01	115	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	116	-
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.03	119	-
CTCF and BORIS gene family	V\$CTCF.04	122	-
CTCF and BORIS gene family	V\$CTCF.01	123	+
Winged helix binding sites	V\$WHN.01	130	+
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.02	130	-
ZF5 POZ domain zinc finger	V\$ZF5.02	131	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$GC.01	142	+
Ras-responsive element binding protein	V\$RREB1.01	145	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF202.01	146	-
RXR heterodimer binding sites	V\$VDR_RXR.06	147	+
Sterol regulatory element binding proteins	V\$SREBP.01	151	-
Krueppel like transcription factors	V\$KCLF.01	152	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZKSCAN3.01	152	-
Ras-responsive element binding protein	V\$RREB1.01	155	-
RXR heterodimer binding sites	V\$VDR_RXR.04	156	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF202.01	156	-
Sterol regulatory element binding proteins	V\$SREBP.02	161	-
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZKSCAN3.01	162	-

Heat shock factors	V\$HSF1.02	184	-
Homolog to deformed epidermal autoregulatory factor-1 from D. melanogaster	V\$NUDR.01	191	-
CTCF and BORIS gene family	V\$CTCF.01	195	+
Neuron-restrictive silencer factor	V\$NRSE.01	198	+
Selenocysteine tRNA activating factor	V\$ZNF76_143.01	201	-
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$HEN1.02	203	-
Myoblast determining factors	V\$MYOD.01	203	+
AP4 and related proteins	V\$AP4.02	204	+
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$HEN1.01	204	+
Myoblast determining factors	V\$MYOGENIN.02	204	-
NeuroD, Beta2, HLH domain	V\$ATOH1.01	204	-
CTCF and BORIS gene family	V\$CTCF.01	205	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	207	+
Krüppel like transcription factors	V\$KLF7.01	209	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.01	210	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	211	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZNF300.01	211	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F4.01	212	+
Ras-responsive element binding protein	V\$RREB1.01	212	-
Krüppel like transcription factors	V\$BKLF.01	214	+
CTCF and BORIS gene family	V\$CTCF.01	215	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$GC.01	215	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$WT1.01	216	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	216	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	217	-
EGR/nerve growth factor	V\$EGR1.02	218	+

induced protein C & related factors			
RXR heterodimer binding sites	V\$VDR_RXR.05	219	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZKSCAN3.01	219	-
Krueppel like transcription factors	V\$KLF7.01	220	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.01	221	+
Myc associated zinc fingers	V\$MAZR.01	222	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZBP89.01	222	-
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F4.01	223	+
EGR/nerve growth factor induced protein C & related factors	V\$EGR1.02	223	+
Krueppel like transcription factors	V\$KKLF.01	225	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	226	+
C2H2 zinc finger transcription factors 2	V\$ZF9.01	228	-
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	V\$PAX6.02	230	+
Estrogen response elements	V\$ESRRB.01	238	+
Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	V\$GCM1.02	241	+
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	249	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP4.01	256	-
Krueppel like transcription factors	V\$KLF7.02	257	-
NeuroD, Beta2, HLH domain	V\$NEUROD1.01	261	+
Myoblast determining factors	V\$E47.01	262	-
Selenocysteine tRNA activating factor	V\$ZNF76_143.01	264	+
Pancreas transcription factor 1, heterotrimeric transcription factor	V\$PTF1.01	267	+
Vertebrate homologues of enhancer of split complex	V\$DEC2.01	269	-
E-box binding factors	V\$USF.04	270	-
Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	V\$TAL1_E2A.01	270	+
Two-handed zinc finger homeodomain transcription	V\$AREB6.03	270	-

factors			
Activator protein 2	V\$TCFAP2B.01	276	+
Activator protein 2	V\$TCFAP2B.01	277	-
Human and murine ETS1 factors	V\$ELK1.02	285	+
Homolog to deformed epidermal autoregulatory factor-1 from D. melanogaster	V\$NUDR.01	288	-
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	V\$HDBP1_2.01	291	-
GC-Box factors SP1/GC	V\$SP1.03	296	+
E2F-myc activator/cell cycle regulator	V\$E2F.02	310	+
Barbiturate-inducible element box from pro+eukaryotic genes	V\$BARBIE.01	316	+
GATA binding factors	V\$GATA1.04	325	+
Peroxisome proliferator activated receptor homodimers	V\$PPARG.01	328	+
Peroxisome proliferator activated receptor homodimers	V\$PPARG.01	328	-
Activator protein 2	V\$TCFAP2B.01	335	+
Activator protein 2	V\$TCFAP2B.01	336	-
Mouse Krueppel like factor	V\$MOK2.02	337	+
PAR/bZIP family	V\$TEF_HLF.01	345	+
RXR heterodimer binding sites	V\$VDR_RXR.05	345	-
Brachyury gene, mesoderm developmental factor	V\$TBX5.01	358	-
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	V\$PAX6.03	358	+
PAR/bZIP family	V\$TEF.01	363	+
cAMP-responsive element binding proteins	V\$E4BP4.01	364	+
PAR/bZIP family	V\$TEF_HLF.01	364	-
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	V\$ISX.01	365	-
Distal-less homeodomain transcription factors	V\$DLX3.01	365	+
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C,	V\$HOXB6.01	366	-

D			
Homeodomain transcription factors	V\$NOBOX.01	367	+
Lim homeodomain factors	V\$LHX4.01	367	+
Bicoid-like homeodomain transcription factors	V\$PCE1.01	368	+
Homeobox transcription factors	V\$GSH2.01	368	+
Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	V\$S8.01	370	+
Distal-less homeodomain transcription factors	V\$DLX2.01	370	-
AT rich interactive domain factor	V\$BRIGHT.01	374	-
Homeodomain transcription factors	V\$HHEX.01	374	+
Brn-5 POU domain factors	V\$BRN5.03	375	+
Distal-less homeodomain transcription factors	V\$DLX3.01	376	+
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	V\$HOXB8.01	377	-
Abdominal-B type homeodomain transcription factors	V\$HOXA9.02	378	-
Homeodomain transcription factors	V\$MSX.01	378	+
NK6 homeobox transcription factors	V\$NKX61.01	378	+
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	V\$HMGA.01	378	+
PAR/bZIP family	V\$TEF.01	383	+
cAMP-responsive element binding proteins	V\$E4BP4.01	384	+
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	V\$SOX9.03	396	+
PAX-2/5/8 binding sites	V\$PAX8.01	409	-
PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites	V\$PAX6.01	412	-
Brn-5 POU domain factors	V\$BRN5.03	418	-
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	V\$HOX1-3.01	424	-
Brn-5 POU domain factors	V\$BRN5.04	425	+

Brn POU domain factors	V\$BRN3.03	426	-
Homeodomain transcription factors	V\$BARX2.01	426	-
Paralog hox genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	V\$HOXB3.01	427	+
NKX homeodomain factors	V\$NKX25.02	427	-
MEF2, myocyte-specific enhancer binding factor	V\$MEF2.01	428	-
Homeobox transcription factors	V\$GSH1.01	429	-
NK6 homeobox transcription factors	V\$NKX61.01	429	-
snRNA-activating protein complex	V\$PSE.02	429	-
Motif composed of binding sites for pluripotency or stem cell factors	V\$OSNT.01	435	+
Hepatic Nuclear Factor 1	V\$HNF1.03	438	-
C-abl DNA binding sites	V\$CABL.01	440	+
Fork head domain factors	V\$FHXB.01	440	+
MYT1 C2HC zinc finger protein	V\$MYT1L.01	444	-
Nuclear factor of activated T-cells	V\$NFAT5.02	444	-
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	V\$SOX5.01	445	+
Glucocorticoid responsive and related elements	V\$ARE.02	463	+
DM domain-containing transcription factors	V\$DMRT5.01	504	-
SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	V\$SOX9.01	506	-
Abdominal-B type homeodomain transcription factors	V\$HOXD12.01	513	+
FAST-1 SMAD interacting proteins	V\$FAST1.02	521	+
Vertebrate TATA binding protein factor	O\$VTATA.01	527	+
Estrogen response elements	V\$ERR.01	528	-
MYT1 C2HC zinc finger protein	V\$MYT1.01	529	+
NKX homeodomain factors	V\$NKX24.01	529	+

SOX/SRY-sex/testis determinig and related HMG box factors	V\$SOX9.03	530	-
Vertebrate steroidogenic factor	V\$SF1.01	533	-
Octamer binding protein	V\$OCT.01	555	+
NKX homeodomain factors	V\$NKX29.01	559	+

EK-G URG-4 Varyant 1 mRNA'sı restriksiyon haritası

Noncutters: AclI, AflII, AgeI, AjuI, AlfI, ArsI, AscI, BarI, BcgI, BciVI, BglII, BsaAI, BsaBI, BsePI, BtgZI, EciI, Eco47III, EcoRI, EcoRV, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NdeI, NheI, NmeAIII, NruI, PacI, PmaCI, PmeI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PsrI, PvuI, RsrII, PI-SceI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SspI, SwaI, TaqII, TfiI, TsoI, TstI, Tth111I, VspI, XbaI

Tablo 6.3: URG-4 Varyant 1 mRNA'sı restriksiyon haritası

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>FspAI</u>	RTGCGCAY	8	blunt	1	829
<u>NaeI</u>	GCCGGC	6	blunt	1	1940
<u>ScaI</u>	AGTACT	6	blunt	1	1723
<u>XmnI</u>	GAANNNTTC	6	blunt	1	1558
<u>AarI</u>	CACCTGC	7	five_prime	1	3179
<u>AbsI</u>	CCTCGAGG	8	five_prime	1	2204
<u>ApaI</u>	GTGCAC	6	five_prime	1	3584
<u>AsuII</u>	TTCGAA	6	five_prime	1	1635
<u>BclI</u>	TGATCA	6	five_prime	1	2387
<u>Bsp1407I</u>	TGTACA	6	five_prime	1	3509
<u>BspHI</u>	TCATGA	6	five_prime	1	2496
<u>BspMI</u>	ACCTGC	6	five_prime	1	3179
<u>BstEII</u>	GGTNACC	6	five_prime	1	2557
<u>Cfr10I</u>	RCCGGY	6	five_prime	1	1938
<u>ClaI</u>	ATCGAT	6	five_prime	1	2018
<u>NarI</u>	GGCGCC	6	five_prime	1	808
<u>NotI</u>	GCGGCCGC	8	five_prime	1	7
<u>PspXI</u>	VCTCGAGB	8	five_prime	1	2204
<u>SaII</u>	GTCGAC	6	five_prime	1	1414
<u>SapI</u>	GCTCTTC	7	five_prime	1	2185
<u>XhoI</u>	CTCGAG	6	five_prime	1	2204
<u>BglI</u>	GCCNNNNNGGC	6	three_prime	1	1848

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>DraIII</u>	CACNNGTG	6	three_prime	1	2557
<u>Eam1105I</u>	GACNNNNNGTC	6	three_prime	1	1053
<u>HaeII</u>	RGCGCY	6	three_prime	1	811
<u>HaeIV</u>	GAYNNNNNRTC	6	three_prime	1	1072
<u>SacI</u>	GAGCTC	6	three_prime	1	3492
<u>SacII</u>	CCGCGG	6	three_prime	1	7
<u>Sse8387I</u>	CCTGCAGG	8	three_prime	1	1360
<u>Ball</u>	TGGCCA	6	blunt	2	133, 2353
<u>BsrBI</u>	CCGCTC	6	blunt	2	38, 1845
<u>SrfI</u>	GCCCGGGC	8	blunt	2	69, 884
<u>AflIII</u>	ACRYGT	6	five_prime	2	1269, 3465
<u>ApoI</u>	RAATTY	6	five_prime	2	378, 968
<u>AvrII</u>	CCTAGG	6	five_prime	2	1860, 2518
<u>EcoNI</u>	CCTNNNNNAGG	6	five_prime	2	1279, 1497
<u>NcoI</u>	CCATGG	6	five_prime	2	2690, 3319
<u>PasI</u>	CCCWGGG	7	five_prime	2	3047, 3533
<u>SanDI</u>	GGGWCCC	7	five_prime	2	504, 1524
<u>SexAI</u>	ACCWGGT	7	five_prime	2	284, 2553
<u>AatII</u>	GACGTC	6	three_prime	2	839, 2317
<u>AloI</u>	GAACNNNNNTCC	7	three_prime	2	1543, 1575
<u>Apal</u>	GGGCC	6	three_prime	2	351, 3114
<u>BaeI</u>	ACNNGTAYC	7	three_prime	2	554, 587
<u>BsrDI</u>	GCAATG	6	three_prime	2	134, 2382
<u>DrdI</u>	GACNNNNNGTC	6	three_prime	2	747, 793
<u>Eco57I</u>	CTGAAG	6	three_prime	2	2086, 2229
<u>MmeI</u>	TCCRAC	6	three_prime	2	250, 2106
<u>Ppil</u>	GAACNNNNNCTC	7	three_prime	2	1543, 1575
<u>SphI</u>	GCATGC	6	three_prime	2	2040, 2434
<u>TspGWI</u>	ACGGA	5	three_prime	2	172, 2693
<u>BtrI</u>	CACGTC	6	blunt	3	441, 1833, 2079
<u>HindII</u>	GTYRAC	6	blunt	3	1166, 1416, 2117

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
<u>OliI</u>	CACNNNGTG	6	blunt	3	430, 1831, 2892
<u>PvuII</u>	CAGCTG	6	blunt	3	127, 511, 2320
<u>SmaI</u>	CCCGGG	6	blunt	3	69, 884, 943
<u>AccI</u>	GTMKAC	6	five_prime	3	1415, 2483, 3551
<u>BamHI</u>	GGATCC	6	five_prime	3	1319, 2547, 3096
<u>Eco31I</u>	GGTCTC	6	five_prime	3	35, 1061, 1800
<u>PfoI</u>	TCCNGGA	6	five_prime	3	305, 779, 2543
<u>SmlI</u>	CTYRAG	6	five_prime	3	1707, 2204, 3494
<u>TatI</u>	WGTACW	6	five_prime	3	1148, 1721, 3509
<u>XhoII</u>	RGATCY	6	five_prime	3	1319, 2547, 3096
<u>BsgI</u>	GTGCAG	6	three_prime	3	1693, 2059, 2850
<u>BsmI</u>	GAATGC	6	three_prime	3	72, 1643, 3280
<u>BstXI</u>	CCANNNNNNTGG	6	three_prime	3	462, 1833, 2672
<u>BtsI</u>	GCA GTG	6	three_prime	3	901, 2705, 3169
<u>StuI</u>	AGGCCT	6	blunt	4	459, 2621, 2669, 3241
<u>BbvCI</u>	CCTCAGC	7	five_prime	4	877, 1510, 1612, 2237
<u>PpuMI</u>	RGGWCCY	7	five_prime	4	504, 918, 1524, 2253
<u>BdaI</u>	TGANNNNNNTCA	6	three_prime	4	1417, 1451, 2361, 2395
<u>BfiI</u>	ACTGGG	6	three_prime	4	354, 510, 1411, 2835
<u>BplI</u>	GAGNNNNNCTC	6	three_prime	4	1669, 1701, 1767, 1799
<u>CspCI</u>	CAANNNNGTGG	7	three_prime	4	659, 694, 2087, 2122
<u>FalI</u>	AAGNNNNNCTT	6	three_prime	4	1708, 1740, 3226, 3258
<u>Hpy99I</u>	CGWCG	5	three_prime	4	66, 1420, 2125, 2602
<u>PfIMI</u>	CCANNNNNNTGG	6	three_prime	4	1816, 2256, 2274, 3539
<u>XcmI</u>	CCANNNNNNNNTGG	6	three_prime	4	141, 432, 2361,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					3205
<u>AcyI</u>	GRCGYC	6	five_prime	5	61, 452, 808, 836, 2314
<u>CfrI</u>	YGGCCR	6	five_prime	5	7, 131, 1650, 2351, 2693
<u>Esp3I</u>	CGTCTC	6	five_prime	5	111, 271, 1783, 2085, 2808
<u>HgaI</u>	GACGC	5	five_prime	5	50, 460, 1800, 3148, 3562
<u>SfaNI</u>	GCATC	5	five_prime	5	118, 402, 921, 1479, 2731
<u>Agsl</u>	TTSAA	5	three_prime	5	250, 642, 2731, 2736, 3285
<u>Nspl</u>	RCATGY	6	three_prime	5	1273, 2040, 2434, 2466, 3469
<u>AvaI</u>	CYCGRG	6	five_prime	6	67, 882, 941, 1665, 1686, 2204
<u>BsaXI</u>	ACNNNNNCTCC	6	three_prime	6	287, 317, 1543, 1573, 2080, 2110
<u>HphI</u>	GGTGA	5	three_prime	6	1057, 1791, 2289, 2373, 2569, 2823
<u>PstI</u>	CTGCAG	6	three_prime	6	320, 1070, 1360, 1520, 2577, 3176
<u>MslI</u>	CAYNNNNRTG	6	blunt	7	430, 1268, 1831, 2230, 2275, 2892, 3318
<u>Bpu10I</u>	CCTNAGC	6	five_prime	7	209, 877, 1510, 1612, 1853, 2237, 2563
<u>BseYI</u>	CCCAGC	6	five_prime	7	507, 752, 857, 985, 1763, 2048, 2320
<u>PleI</u>	GAGTC	5	five_prime	7	304, 679, 1170, 1199, 1477, 2278, 2978
<u>AlwNI</u>	CAGNNNCTG	6	three_prime	7	1021, 2236, 2256, 2544, 3088, 3507, 3539
<u>BseRI</u>	GAGGAG	6	three_prime	7	502, 597, 1083, 1444, 1653, 2143,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					2965
<u>TspDI</u>	ATGAA	5	three_prime	7	352, 1171, 1173, 1671, 2205, 2485, 3591
<u>FokI</u>	GGATG	5	five_prime	8	967, 1171, 1467, 1501, 1749, 2257, 2647, 2776
<u>StyI</u>	CCWWGG	6	five_prime	8	760, 1860, 2348, 2405, 2518, 2690, 3259, 3319
<u>MboII</u>	GAAGA	5	three_prime	8	351, 496, 796, 1326, 2202, 2748, 2957, 3386
<u>TauI</u>	GCSGC	5	three_prime	8	6, 9, 12, 1620, 1623, 1770, 1845, 2698
<u>Tsp45I</u>	GTSAC	5	five_prime	9	260, 1045, 2052, 2263, 2379, 2557, 2998, 3133, 3167
<u>GsuI</u>	CTGGAG	6	three_prime	9	289, 1551, 1555, 2029, 2107, 2359, 3166, 3252, 3502
<u>Avall</u>	GGWCC	5	five_prime	10	288, 504, 749, 918, 1524, 1584, 2200, 2253, 3194, 3274
<u>BccI</u>	CCATC	5	five_prime	10	187, 474, 949, 1336, 1449, 1731, 1881, 2014, 2577, 2875
<u>FauI</u>	CCCGC	5	five_prime	10	25, 719, 819, 1340, 1355, 1402, 1874, 3096, 3177, 3257
<u>EcoP15I</u>	CAGCAG	6	five_prime	11	570, 684, 1317, 1672, 1725, 1959, 1962, 2447, 2824, 2832, 3095
<u>Eco57MI</u>	CTGRAG	6	three_prime	11	289, 1551, 1555, 2029, 2086, 2107, 2229, 2359, 3166, 3252, 3502
<u>Drall</u>	RGGNCCY	6	five_prime	12	348, 399, 504, 918, 1524, 1746, 2210, 2253, 2306, 3111,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					3263, 3536
<u>Hin4I</u>	GAYNNNNNVTC	6	three_prime	12	1034, 1039, 1066, 1071, 1648, 1680, 2080, 2112, 2184, 2216, 2732, 2764
<u>BseSI</u>	GKGCMC	6	three_prime	13	351, 597, 934, 1353, 1825, 2462, 2613, 2889, 2932, 3114, 3299, 3402, 3588
<u>BsmAI</u>	GTCTC	5	five_prime	14	35, 111, 271, 1061, 1770, 1783, 1800, 2085, 2522, 2529, 2808, 2977, 3051, 3084
<u>BsrI</u>	ACTGG	5	three_prime	14	349, 505, 568, 657, 1066, 1406, 1572, 2090, 2475, 2618, 2841, 3142, 3269, 3388
<u>TspRI</u>	CASTG	5	three_prime	15	236, 575, 901, 1066, 1299, 1579, 2237, 2618, 2705, 2721, 2988, 3142, 3176, 3276, 3388
<u>SduI</u>	GDGCHC	6	three_prime	20	351, 446, 597, 934, 1353, 1825, 1859, 2029, 2063, 2462, 2613, 2685, 2889, 2907, 2932, 3114, 3299, 3402, 3492, 3588
<u>EcoRII</u>	CCWGG	5	five_prime	27	284, 305, 373, 415, 454, 802, 973, 1274, 1468, 1528, 1748, 1968, 2130, 2249, 2255, 2273, 2543, 2553, 2621, 2664, 3046, 3143, 3179, 3197, 3369, 3532, 3538
<u>BseMII</u>	CTCAG	5	three_prime	29	223, 312, 367, 399, 536, 623, 891, 1030, 1180, 1213, 1501, 1583, 1598, 1603,

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
					1720, 1765, 1795, 1844, 1898, 2023, 2228, 2362, 2431, 2554, 2630, 2906, 3030, 3095, 3214
<u>BbvI</u>	GCAGC	5	five_prime	32	36, 510, 536, 587, 1052, 1301, 1331, 1402, 1502, 1552, 1610, 1653, 1709, 1922, 1973, 1976, 1988, 2060, 2159, 2182, 2232, 2431, 2559, 2587, 2658, 2808, 2846, 2881, 3076, 3111, 3168, 3452
<u>TseI</u>	GCWGC	5	five_prime	32	49, 523, 549, 600, 1065, 1289, 1344, 1390, 1515, 1540, 1623, 1641, 1697, 1935, 1986, 1989, 2001, 2073, 2172, 2195, 2220, 2419, 2572, 2575, 2646, 2796, 2859, 2869, 3064, 3124, 3156, 3440

EK-H Varyant 1 cDNA'sına ait dizi analizi sonucunun NCBI veritabanında karşılaştırılması

URG-4	1	GAGACCTCGCTGCGCTCATGGCGTCGCCCGGGCATTAGATTGGGAGAAGTAGCCCCAG	60
NCBI	41	GAGACCTCGCTGCGCTCATGGCGTCGCCCGGGCATTAGATTGGGAGAAGTAGCCCCAG	100
URG-4	61	AAATAAAAGCATCAGAGAGACGAACAGCTGTGGCCATTGCAGATTTGGAATGGAGAGAAA	120
NCBI	101	AAATAAAAGCATCAGAGAGACGAACAGCTGTGGCCATTGCAGATTTGGAATGGAGAGAAA	160
URG-4	121	TGGAAGGAGATGATTGCGAGTCCGTTATGGAGATGGTACAAATGAGGCTCAGGACAATG	180
NCBI	161	TGGAAGGAGATGATTGCGAGTCCGTTATGGAGATGGTACAAATGAGGCTCAGGACAATG	220
URG-4	181	ATTTTCCAACAGTGGAGAGAAGCAGGCTTCAAGAAATGCTGTCACTTTGGGCCTAGAGA	240
NCBI	221	ATTTTCCAACAGTGGAGAGAAGCAGGCTTCAAGAAATGCTGTCACTTTGGGCCTAGAGA	280
URG-4	241	CGTACCAGGTCCAGAAACTCAGCCTCCAGGACTCTCTGCAGATCAGTTTTGACAGTATGA	300
NCBI	281	CGTACCAGGTCCAGAAACTCAGCCTCCAGGACTCTCTGCAGATCAGTTTTGACAGTATGA	340
URG-4	301	AGAACTGGGCCCCTCAGGTTCCCAAAGACTTGCCCTGGAATTTCTCAGGAAGTTGCAGG	360
NCBI	341	AGAACTGGGCCCCTCAGGTTCCCAAAGACTTGCCCTGGAATTTCTCAGGAAGTTGCAGG	400
URG-4	361	CCCTCAATGCTGATGCCAGGAATACCACTATGGTGTGGACGTGCTCCAGACGCCAGGC	420
NCBI	401	CCCTCAATGCTGATGCCAGGAATACCACTATGGTGTGGACGTGCTCCAGACGCCAGGC	460
URG-4	421	CTGTGGAGAAGGAGAGCCAGATGGAAGAGGAGATCATCTACTGGGACCCAGCTGATGACC	480
NCBI	461	CTGTGGAGAAGGAGAGCCAGATGGAAGAGGAGATCATCTACTGGGACCCAGCTGATGACC	520
URG-4	481	TTGCTGCCGACATTTATTCCTTTTCTGAGCTGCCACCCCTGATACGCCAGTGAACCCCT	540
NCBI	521	TTGCTGCCGACATTTATTCCTTTTCTGAGCTGCCACCCCTGATACGCCAGTGAACCCCT	580
URG-4	541	TAGACCTTCTGTGCCCTGCTGCTCTCCTCAGACAGTTTCTGCAACAAGAAATAGCGT	600
NCBI	581	TAGACCTTCTGTGCCCTGCTGCTCTCCTCAGACAGTTTCTGCAACAAGAAATAGCGT	640

URG-4 601 TGAAAATGGCCCTCTGCCAGTTTGCCTCCACTCGTGTGCCTGACTCGGAGAACCACT 660
 |||
 NCBI 641 TGAAAATGGCCCTCTGCCAGTTTGCCTCCACTCGTGTGCCTGACTCGGAGAACCACT 700

 URG-4 661 ACCATACATTTCTGCTGTGGGCCATGCGGGGCATTGTGAGGACATGGTGGTCCCAGCCCC 720
 |||
 NCBI 701 ACCATACATTTCTGCTGTGGGCCATGCGGGGCATTGTGAGGACATGGTGGTCCCAGCCCC 760

 URG-4 721 CAAGGGGCATGGGGAGCTTCCGGGAAGACAGCGTGGTCTTGTCCAGGGCGCCCGCCTTCG 780
 |||
 NCBI 761 CAAGGGGCATGGGGAGCTTCCGGGAAGACAGCGTGGTCTTGTCCAGGGCGCCCGCCTTCG 820

 URG-4 781 CCTTCGTGCGCATGGACGTGAGTAGCAACTCCAAGTCCCAGCTTCTCAACGCCGTCTCA 840
 |||
 NCBI 821 CCTTCGTGCGCATGGACGTGAGTAGCAACTCCAAGTCCCAGCTTCTCAACGCCGTCTCA 880

 URG-4 841 GCCCGGGCCACAGGCAGTGGGACTGCTTCTGGCATCGGGACCTCAACTGGGCACCAATG 900
 |||
 NCBI 881 GCCCGGGCCACAGGCAGTGGGACTGCTTCTGGCATCGGGACCTCAACTGGGCACCAATG 940

 URG-4 901 CCCGGGAGATTTTCGGATGGGTTGGTAGAAATTTCTGGTTTTTTCCAGCGGAAGGGAGG 960
 |||
 NCBI 941 CCCGGGAGATTTTCGGATGGGTTGGTAGAAATTTCTGGTTTTTTCCAGCGGAAGGGAGG 1000

 URG-4 961 ACTTGGACATTTTCCAGAACCTGTGGCCTTCTGAACCTGAGAGGTGACATCGGGTCTC 1020
 |||
 NCBI 1001 ACTTGGACATTTTCCAGAACCTGTGGCCTTCTGAACCTGAGAGGTGACATCGGGTCTC 1060

 URG-4 1021 ACTGGCTGCAGTTTAAGCTCTTGACAGAAATCTCCTCCGCTGTGTTTATATTGACTGACA 1080
 |||
 NCBI 1061 ACTGGCTGCAGTTTAAGCTCTTGACAGAAATCTCCTCCGCTGTGTTTATATTGACTGACA 1120

 URG-4 1081 ATATCAGTAAGAAGGAATACAAATTGCTGTACTCCATGAAGGAGTCAACCACAAAATACT 1140
 |||
 NCBI 1121 ATATCAGTAAGAAGGAATACAAATTGCTGTACTCCATGAAGGAGTCAACCACAAAATACT 1180

 URG-4 1141 ACTTCATCCTGAGTCCCTACCGTGGGAAGCGCAACACAAACCTGAGATTTCTGAATAAGT 1200
 |||
 NCBI 1181 ACTTCATCCTGAGTCCCTACCGTGGGAAGCGCAACACAAACCTGAGATTTCTGAATAAGT 1240

 URG-4 1201 TAATTCCTGTGCTGAAAATAGACCACTCACATGTCCTGGTAAAGGTCAGCAGCACTGACA 1260
 |||
 NCBI 1241 TAATTCCTGTGCTGAAAATAGACCACTCACATGTCCTGGTAAAGGTCAGCAGCACTGACA 1300

 URG-4 1261 GCGACAGCTTCGTGAAGAGGATCCGGGCCATCGTTGGGAATGTGCTGCGGGCACCCCTGCA 1320
 |||

NCBI	1301	GCGACAGCTTCGTGAAGAGGATCCGGGCCATCGTTGGGAATGTGCTGCGGGCACCCGTGCA	1360
URG-4	1321	GGCGGGTATCTGTGGAGGACATGGCGCACGCAGCCCCAAACCTGGGCCTAAAGGTGACG	1380
NCBI	1361	GGCGGGTATCTGTGGAGGACATGGCGCACGCAGCCCCAAACCTGGGCCTAAAGGTGACG	1420
URG-4	1381	AGGACTGTGAGGAGTGTGAGAAAGCGAAAGACCGGATGGAGAGGATTACCAGGAAAATCA	1440
NCBI	1421	AGGACTGTGAGGAGTGTGAGAAAGCGAAAGACCGGATGGAGAGGATTACCAGGAAAATCA	1480
URG-4	1441	AAGACTCGGATGCCTACAGAAGGGACGAGCTGAGGCTGCAGGGGACCCCTGGAGAAAGG	1500
NCBI	1481	AAGACTCGGATGCCTACAGAAGGGACGAGCTGAGGCTGCAGGGGACCCCTGGAGAAAGG	1540
URG-4	1501	CAGCCCAAGTGGAGAAGGAGTTCTGCCAGCTCCAGTGGGCCGTGGACCCCTGAGAAGC	1560
NCBI	1541	CAGCCCAAGTGGAGAAGGAGTTCTGCCAGCTCCAGTGGGCCGTGGACCCCTGAGAAGC	1600
URG-4	1561	ACAGGGCTGAGCTGAGGCGGCGCTGCTAGAACTTCGAATGCAGCAGAACGGCCATGATC	1620
NCBI	1601	ACAGGGCTGAGCTGAGGCGGCGCTGCTAGAACTTCGAATGCAGCAGAACGGCCATGATC	1660
URG-4	1621	CCTCCTCGGGGTGCAGGAGTTCATCTCGGGGATCAGCAGCCCCTCCTTGAGTGAGAAGC	1680
NCBI	1661	CCTCCTCGGGGTGCAGGAGTTCATCTCGGGGATCAGCAGCCCCTCCTTGAGTGAGAAGC	1720
URG-4	1681	AGTACTTCTGAGGTGGATGGAGTGGGCCTGGCACGGGTGGCCAGCCGCGACTGAGAC	1740
NCBI	1721	AGTACTTCTGAGGTGGATGGAGTGGGCCTGGCACGGGTGGCCAGCCGCGACTGAGAC	1780
URG-4	1741	AGCCTCCGAGACGCTTCTCACCTGAGACCAAAGCATGGGGGCACCACAGACGTGGGGG	1800
NCBI	1781	AGCCTCCGAGACGCTTCTCACCTGAGACCAAAGCATGGGGGCACCACAGACGTGGGGG	1840
URG-4	1801	AGCCGCTCTGGCCTGAGCCCTAGGGGTGGAACACTTCTTGCGGGAGATGGGACAGTTTT	1860
NCBI	1841	AGCCGCTCTGGCCTGAGCCCTAGGGGTGGAACACTTCTTGCGGGAGATGGGACAGTTTT	1900
URG-4	1861	ATGAGGCTGAGAGCTGTCTTGTGGAGGCAGGGAGGCTGCCGGCAGGCCAGAGGCGTTTTG	1920
NCBI	1901	ATGAGGCTGAGAGCTGTCTTGTGGAGGCAGGGAGGCTGCCGGCAGGCCAGAGGCGTTTTG	1960
URG-4	1921	CCCACTCCCAGGCTTGGCCTCGGAGCTGCTGCTGACAGGGCTGCCTCTGGAGCTAATCG	1980
NCBI	1961	CCCACTCCCAGGCTTGGCCTCGGAGCTGCTGCTGACAGGGCTGCCTCTGGAGCTAATCG	2020

URG-4 1981 ATGGGAGCACGCTGAGCATGCCCGTCCGCTGGGTACAGGGCTCCTGAAGGAGCTGCACG 2040
 |||
 NCBI 2021 ATGGGAGCACGCTGAGCATGCCCGTCCGCTGGGTACAGGGCTCCTGAAGGAGCTGCACG 2080

 URG-4 2041 TCCGACTGGAGAGACGGTCAAGGCTGGTGGTTCTGTCAACCGTCGGGGTGCCAGGCACGG 2100
 |||
 NCBI 2081 TCCGACTGGAGAGACGGTCAAGGCTGGTGGTTCTGTCAACCGTCGGGGTGCCAGGCACGG 2140

 URG-4 2101 GCAAGTCCCACTCCTCAACACCATGTTGGGCTGCGGTTTGCCACAGGGAAGAGCTGCG 2160
 |||
 NCBI 2141 GCAAGTCCCACTCCTCAACACCATGTTGGGCTGCGGTTTGCCACAGGGAAGAGCTGCG 2200

 URG-4 2161 GTCCTCGAGGGGCCCTTCATGCAGCTCATCACAGTGGCTGAGGGCTTCAGCCAGGACCTGG 2220
 |||
 NCBI 2201 GTCCTCGAGGGGCCCTTCATGCAGCTCATCACAGTGGCTGAGGGCTTCAGCCAGGACCTGG 2260

 URG-4 2221 GCTGTGACCACATCCTGGTATAGACTCCGGGGGCTTGATAGGTGGGGCCTTGACGTCAG 2280
 |||
 NCBI 2261 GCTGTGACCACATCCTGGTATAGACTCCGGGGGCTTGATAGGTGGGGCCTTGACGTCAG 2320

 URG-4 2281 CTGGGGACAGATTTGAGCTGGAGGCTTCCTTGCCACTCTGCTCATGGGACTGAGCAATG 2340
 |||
 NCBI 2321 CTGGGGACAGATTTGAGCTGGAGGCTTCCTTGCCACTCTGCTCATGGGACTGAGCAATG 2380

 URG-4 2341 TCACCGTGATCAGTCTAGCTGAAACCAAGGACATTCCAGCAGCTATTCTGCATGCATTTTC 2400
 |||
 NCBI 2381 TCACCGTGATCAGTCTAGCTGAAACCAAGGACATTCCAGCAGCTATTCTGCATGCATTTTC 2440

 URG-4 2401 TGAGGTTAGAAAAACGGGGCACATGCCCACTACCAGTTTGTATACCAGAACCTTCATG 2460
 |||
 NCBI 2441 TGAGGTTAGAAAAACGGGGCACATGCCCACTACCAGTTTGTATACCAGAACCTTCATG 2500

 URG-4 2461 ATGTATCTGTTCCCGGCCCTAGGCCAGAGACAAGAGACAGCTCCTGGATCCACCTGGTG 2520
 |||
 NCBI 2501 ATGTATCTGTTCCCGGCCCTAGGCCAGAGACAAGAGACAGCTCCTGGATCCACCTGGTG 2560

 URG-4 2521 ACCTGAGCAGGGCTGCAGCCAGATGGAGAAACAGGGCGACGGCTTCCGGGCACTGGCAG 2580
 |||
 NCBI 2561 ACCTGAGCAGGGCTGCAGCCAGATGGAGAAACAGGGCGACGGCTTCCGGGCACTGGCAG 2620

 URG-4 2581 GCCTGGCCTTCTGCGACCCTGAGAAGCAGCACATCTGGCACATCCAGGCCTGTGGCAGC 2640
 |||
 NCBI 2621 GCCTGGCCTTCTGCGACCCTGAGAAGCAGCACATCTGGCACATCCAGGCCTGTGGCAGC 2680

 URG-4 2641 GAGCACCTCCCATGGCCGCACTGAGCTTGGCCTACAGTGAAGCCATATTTGAATGAAGA 2700
 |||

NCBI	2681	GAGCACCTCCCATGGCCGAGTGAGCTTGGCCTACAGTGAAGCCATATTTGAATTGAAGA	2740
URG-4	2701	GATGCCTACTCGAAAACATCAGGAACGGCTTGTGCAACCAAAACAAAACATCCAGCAGC	2760
NCBI	2741	GATGCCTACTCGAAAACATCAGGAACGGCTTGTGCAACCAAAACAAAACATCCAGCAGC	2800
URG-4	2761	TCATTGAGCTGGTGAGACGGCTGTGAGTGTGCAGAGAAACCCAGTTCAGGTGTAGGAGGC	2820
NCBI	2801	TCATTGAGCTGGTGAGACGGCTGTGAGTGTGCAGAGAAACCCAGTTCAGGTGTAGGAGGC	2860
URG-4	2821	TGCTGTGGGCAGCCCTGTCTGATGGGGCACCCGTGTGGGGCTGTGCTCTGGTGCCTGAGA	2880
NCBI	2861	TGCTGTGGGCAGCCCTGTCTGATGGGGCACCCGTGTGGGGCTGTGCTCTGGTGCCTGAGA	2920
URG-4	2881	ATGGCTGGTGCCCAATCGACATGAGAAGACGAGGAAAAGACAGGGTTTGGAGTCTCCTCA	2940
NCBI	2921	ATGGCTGGTGCCCAATCGACATGAGAAGACGAGGAAAAGACAGGGTTTGGAGTCTCCTCA	2980
URG-4	2941	ACAGTGTAAAAGAGGAAGTGACCTCACAGACCAGCTCAGAGATGTTACCAAGAATATCA	3000
NCBI	2981	ACAGTGTAAAAGAGGAAGTGACCTCACAGACCAGCTCAGAGATGTTACCAAGAATATCA	3040
URG-4	3001	CAGCCCCAGGGTAGGGAGACAAGCAGCAGTTTGTCTGTCTCAGCTCCTGTCAAGGATC	3060
NCBI	3041	CAGCCCCAGGGTAGGGAGACAAGCAGCAGTTTGTCTGTCTCAGCTCCTGTCAAGGATC	3100
URG-4	3061	CTGCGGGGTGGGCCCTCTGTATAGCTGCTCTGTGCTACTGGCCCTGGAGTGGGAGCAGC	3120
NCBI	3101	CTGCGGGGTGGGCCCTCTGTATAGCTGCTCTGTGCTACTGGCCCTGGAGTGGGAGCAGC	3160
URG-4	3121	GTCCTTAGTCACTGCAGGCCAGGCGGGCAGGTGGTCCCAGGACAGAGGTGGGAAGTTG	3180
NCBI	3161	GTCCTTAGTCACTGCAGGCCAGGCGGGCAGGTGGTCCCAGGACAGAGGTGGGAAGTTG	3220
URG-4	3181	TCCTGAGGAAGCAGAAGTAGGCCTTGCTCCGCCCAACCAAGGGCCTCCAGTGGACCAG	3240
NCBI	3221	TCCTGAGGAAGCAGAAGTAGGCCTTGCTCCGCCCAACCAAGGGCCTCCAGTGGACCAG	3280
URG-4	3241	CATTCAAGATGTGAGTGCCCGTGGTGTGCAAGGCACTCCCATGGCACC GTATTTATTGAC	3300
NCBI	3281	CATTCAAGATGTGAGTGCCCGTGGTGTGCAAGGCACTCCCATGGCACC GTATTTATTGAC	3340
URG-4	3301	TGATCTGTgaaggcttccctgacccctgoccaggaagagttcactggtcgctctgtgtg	3360
NCBI	3341	TGATCTGTGAAGGCTTCCCTGACCCCTGCCAGGAAGAGTTCACTGGTCGCTCTGTTGTG	3400

URG-4	3361	ccccacagcactttgttatacctctgccacacacttcacgcagcgcgttgtaactcatgt	3420
NCBI	3401	CCCCACAGCAC TTTGTTATACCTCTGCCACACACTTCACGCAGCGCGTTGTAAC T CATGT	3460
URG-4	3421	gtttacatgtctgtccccccagactgtgagctccttgagggcagggactgtacattctcc	3480
NCBI	3461	GTTTACATGTCTGTCCCCCAGACTGTGAGCTCCTTGAGGGCAGGGACTGTACATTCTCC	3520
URG-4	3481	agctctgtgtccccagggcctggcacattgtagacgcttaataaatgtctgttaaatgaa	3540
NCBI	3521	AGCTCTGTGTCCCCAGGGCCTGGCACATTGTAGACGCTTAATAAATGTCTGTAAATGAA	3580