

TC.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**STROMAL ANTİJEN 1 (STAG 1) GENİNİN HÜCRE
PROLİFERASYONU, TRANSFORMASYONU VE DNA HASAR
YANITINDAKİ FONKSİYONEL ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİHAL AKTAŞ

DANIŞMANI

PROF. DR. MELEK ERKİŞİ

ADANA - 2010

TC.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**STROMAL ANTİJEN 1 (STAG 1) GENİNİN HÜCRE
PROLİFERASYONU, TRANSFORMASYONU VE DNA HASAR
YANITINDAKİ FONKSİYONEL ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİHAL AKTAŞ

DANIŞMANI

PROF. DR. MELEK ERKİŞİ

Tez No:.....

ADANA - 2010

KABUL VE ONAY

İç Hastalıkları Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Stromal Antijen 1 (STAG 1) Geninin Hücre Proliferasyonu, Transformasyonu ve DNA Hasar Yanıtındaki
Fonksiyonel Rolünün Belirlenmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 01/09/2010

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Melek Köksal Erkişi
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Osman Demirhan
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. İ.Oğuz Kara
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil Kasap
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, Temel Onkoloji Bölümümüzün açılmasını sağlayarak, bizlerin eğitimine destek sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Berksoy Şahin'e yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

Sayın Hocam Prof. Dr. K. Lenhard Rudolph ile tanışmama vesile olan Sayın Hocam Prof. Dr. Hikmet Akkız'a yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarımı Almanya Ulm Üniversitesi, Moleküler Tıp Enstitüsü, Max Planck Araştırma Bölümü, Kök Hücreleri Yaşlanması Birimi'nde yapmam için beni sonuna kadar destekleyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melek Erkişi'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarım boyunca her türlü konuda yardımcı olan ve yol gösteren Sayın Prof. K. Lenhard Rudolph, Dr. Yvonne Begus-Nahrman'a, Dr. med. Daniel Hartmann ve Dr. Andre Lechel'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca Almanya'da tezimin tercümesini yaparak üzerinde tartışmamızı sağlayan Sayın PD Dr. Rer. Nat Çağatay Güneş'e de sonsuz teşekkürler sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında, laboratuarda teknik konularda sorun yaşadığımda hiçbir zaman yardımını esirgemeyen M.Sc Arpita Baisantry, M.Sc. Hye-Min Lee, M.Sc. Satyavani Ravipati, Dr. rer. nat Tobias Sperka, Dr. rer. nat. Anett Illing, Dr. rer. nat Kodandaramireddy Nalapareddy, Dipl. Biochem. Kertsin Bauer, Dipl. Biol. Sarah- Fee Katz'e, teknik konuların yanı sıra, manevi konuda sürekli desteğini esirgemeyen M.Sc Pallavi Mahaddalkar, Phd. Qian Sun, Ph.D. Juan Feng, M.Sc. Parisa Eshranghi, Thomas Leucht, Natalia Kloos'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı yaptığım laboratuvar grubumuz dışında olup hiçbir zaman manevi desteğini benden esirgemeyen arkadaşlarım Woan-Ting Su, Sergio Cantero, Pablo Ferrando Villlba, Josina Schlüter, Amparo Albalate, Fabian Westernmann'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmalarımı yurt dışında yürütürken, Türkiye'de resmi işlemlerim için bana her zaman yardımcı olan ve döndüğümde de yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Özge Özgen'e yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.1 Bir Gen Olarak STAG 1.....	2
2.1.2 Kohesin Kompleksin yapısı.....	2
2.2 Telomer ve STAG 1 İlişkisi.....	3
2.2.1 Telomer Disfonksiyonu.....	4
2.3 Hücre Döngüsü.....	5
2.3.1 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları.....	6
2.4 Kanserın Moleküler Temeli.....	8
2.4.1 Onkogenler ve Kanser.....	10
2.4.2 Onkogenlerin Protein Ürünleri.....	11
2.4.3 Onkogenlerin Aktivasyonu.....	12
2.5 Tümör Baskılayıcı Genler.....	12
2.5.1 Tümör Baskılayıcı Genlerin Protein Ürünleri.....	12
2.5.2 P53 Geni.....	13
2.5.3 Apoptozisin Morfolojisi.....	19
2.5.4 Apoptozisi Uyarınları.....	20
2.5.5 Apoptozisi Baskılayıcılar.....	20
2.6 P53 ve STAG 1 Arasındaki İlişki.....	21
2.7 Gen Tedavisi.....	22
2.7.1 Gen tedavisi Tanımı.....	22

2.7.2	Malignitelerde Gen Tedavisi.....	23
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1	STAG 1 proteininin temel ekspresyonunun incelenmesi.....	26
3.2	shRNA Klonlama Sırasında Uygulanan İşlemler.....	28
3.2.1	SFFV pGIPZ vektörünün Restrüksiyon Enzimleri ile Kesilmesi.....	28
3.2.2	shRNA Oligonükleotidlerine uygulanan PCR Metodu.....	30
3.2.3	PCR Sonrası Jelden DNA ekstraksiyonu.....	30
3.2.4	shRNAların Restrüksiyon Enzimleri ile Kesilmesi.....	31
3.2.5	Ligasyon.....	32
3.2.6	Elektroporasyon.....	32
3.3	Mini Kültür İnokülasyonu.....	33
3.3.1	Mini Prep Plazmid DNA Purifikasyonu.....	33
3.4	Maksi İnokülasyonu.....	33
3.4.1	Maksi Prep Plazmid DNA Purifikasyonu.....	33
3.5	cDNAnın Vektörlere Klonlanması.....	34
3.5.1	cDNAnın Stoktan alınıp Platenlenmesi.....	34
3.5.2	Tam Boy (Full Length) pBluescript STAG 1 ‘den cDNAnın PCR Yöntemi ile Amplifikasyonu.....	35
3.5.3	PCR Sonrası DNA Ekstraksiyonu.....	36
3.5.4	PCR İşleminde Sonra STAG 1 cDNAsının XhoI ve NotI Restrüksiyon Enzimleri ile kesilmesi.....	36
3.5.5	STAG 1 cDNAsı için Kullanılan Vektörlerin (PLVX IRES mRuby, SFLV cDNA EGFP) Restrüksiyon Enzimleri ile Kesilmesi.....	37
3.5.6	PCR Sonrası DNA Ekstraksiyonu.....	39
3.5.7	PLVX IRES mRuby, SFLV cDNA EGFP ile STAG 1 cDNAsının Ligasyonu.....	39
3.6	Klonlanmış Vektörlerin Lenti X 293 T Hücrelerine Verilerek Transfekte Edilmesi ve Ardından da PD:40,5 Genç Fibroblast Hücreleri ve PD:57 Yaşlı Fibroblast Hücrelerinin Transdüksiyonu.....	40
3.6.1	Transfeksiyon ve Transdüksiyon Protokolü.....	40
3.6.2	Hücre Kültürü Metodu.....	42
3.6.3	Kültüre Alınmış Hücrelerin Toplanması ve STAG 1 protein	

ekspresyonunun incelenmesi	42
3.7 Hastalardan Alınan HCC'li ve Sağlıklı Karaciğer Dokularından Alınan Doku Kesitlerinin İmmunofloresan Metodu ile Boyanması ve STAG 1 Protein Ekspresyonunun İncelenmesi.....	44
3.7.1 İmmunofloresan Metodu.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1 STAG 1 Proteininin Fibroblast Hücrelerindeki Temel Ekspresyonu.....	46
4.2 shRNA ve cDNA Oligonükleotidlerinin Lenti Viral Vektörlere Klonlanması Sonuçları.....	47
4.3 Klonlanmış Vektörlerin Lenti X 293 T Hücrelerine Verilerek Transfekte Edilmesi ve ardından PD:40,5 genç Fibroblast Hücreleri ile PD:57 Yaşlı Fibroblast Hücrelerinin Transdüksyonu.....	51
4.4 Kültüre Alınmış Hücrelerin Toplanması ve STAG 1 Protein Ekspresyonunun İncelenmesi.....	55
4.5 Hastalardan Alınan HCC'li ve Sağlıklı Karaciğer Dokularından Alınan STAG 1 Doku Kesitlerinin Antifloresan Boyama Metodu İle Boyanması ve Protein Ekspresyonunun İncelenmesi.....	57
5.TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kohesin Kompleks Yapısı.....	3
Şekil 1.2 Telomerin T-loop yapısı.....	4
Şekil 1.3 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları.....	7
Şekil 1.4 P53 Proteininin DNA ile Oluşturduğu Kompleksin Kristalografi ile Bulunan Üç Boyutlu Yapısı... ..	14
Şekil 1.5 Genom Bütünlüğünün Devamında p53 Geninin Rolü.....	17
Şekil 1.6 Gen Tedavisi Uygulaması.....	22
Şekil 2.1 SFFV pGIPZ Vektörü.....	29
Şekil 2.2 cDNA Vektörü pBluescript STAG 1.....	34
Şekil 2.3 PLVX IRES mRuby cDNA Vektörü.....	37
Şekil 2.4 cDNA Vektörü SFLV cDNA EGFP.....	38
Şekil 3.1 İnsan Fibroblast Hücrelerindeki STAG 1, P53, GAPDH, P21 Ekspresyonları.....	46
Şekil 3.2 PCR Metoduyla pBluescript Vektöründen İzole Edilmiş STAG 1.....	48
Şekil 3.3 Sırasıyla 1.,2, ve 3. Örnekler shRNA A, 4.,5.,6. Örnekler shRNA B, 7., 8., 9. Örnekler shRNA C Oligonükleotidlerinin PCR Amplifikasyonu Sonrası Görüntüsü (110 bp).....	48
Şekil 3.4 SFFV pGIPZ shRNA A Klonları.....	49
Şekil 3.5 SFFV pGIPZ shRNA B ve SFFV pGIPZ shRNA C Klonları.....	49
Şekil 3.6 SFLV cDNA EGFP STAG 1 Klonları.....	50
Şekil 3.7 %100 Transfeksiyona Uğramış Lenti X 293 T Hücreleri.....	52
Şekil 3.8 Transdükte Edilmiş Fibroblast Large T Hücreleri.....	53
Şekil 3.9 Tekrar Transfekte Edilmiş Lenti X 293 T Hücreleri.....	54
Şekil 3.10 Transdükte Olmuş Genç İnsan Fibroblast Hücreleri PD: 40,5.....	55
Şekil 3.11 Transdükte Olmuş Yaşlı İnsan Fibroblast Hücreleri PD:57.....	55
Şekil 3.12 Fibroblast PD: 57 STAG 1 ve Beta Aktin Ekspresyonları.....	56
Şekil 3.13 HCC'li ve Sağlıklı Karaciğer Örnekleri Üzerine Yapılan immünofloresan Boyama Sonucunda DAPI ve STAG 1 Ekspresyonları.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Gen Transfer Stratejileri.....	23
Çizelge 2.1 Akrilamid jel Elektroforezi için Hazırlanan Ayırıcı ve Paketleyici Jeller İçerisindeki Maddeler ve Miktarları.....	26
Çizelge 2.2 Western Blott Yönteminde Kullanılan Primer ve Sekonder Antibadiler.....	27
Çizelge 2.3 Transfeksiyonda Kullanılan Malzemeler ve Konsantrasyonları.....	40
Çizelge 2.4 Ayırıcı ve PaketleyiciJel Solüsyonları için Kullanılan Malzemeler ve Miktarları.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
Adp-53	: Adenovirüs tümör protein 53
Adwtp53	: Adenovirüs wild tip tümör protein 53
6-OHDA	: 6-hidroksidopamin
APC	: Adenomatous poliposis koli proteini
ATM	: Ataxia telangiectasia mutanıtı
ATR	: ATM ve RAD 3 ilişkili kinaz
APS	: Amonyum persülfat
BRCA 1	: Meme kanseri 1 geni (Breast cancer 1)
BRCA 2	: Meme kanseri 2 geni (Breast cancer 2)
Cdc-25A	: Hücre bölünme siklusu 25 A fosfataz
Cdc 25 C	: Hücre bölünme döngüsü 25 homologu
Cdk 4	: Siklin bağımlı kinaz 4
Cdh 1	: Kaderin 1, tip 1, E-Kaderin
cDNA	: Komplementer DNA
CIP	: Kalf instestinal fosfat, Alkalin fosfat
cMyc	: v-myc myelositomatozis ve onkojen homologu
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
DAPI	: 4',6'-diaminidino-2-fenilindol
DCC	: Silimiş kolon kanseri geni (Deleted colon cancer gene)
DDT	: Dikloro difenol trikloroetan
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EBV	: Epstein bar virüsü
EGFP	: Epidemiyolojik büyüme faktörü proteini
E2F	: Düzenleme ve aktivitede yer alan transkripsiyon faktörü
53BP1	: P53 bağlayıcı protein
EtBr	: Etidyum bromür
FBS	: Fetal bovin serum

G	: Guanin
Gag/Pol	: Grup antijen reverse transkriptaz
γ H2AX	: Anti fosforile histon H2AX geni
GDNF	: Glial hücre hattı
HCC	: Hepatoselüler karsinoma
HCl	: Hidroklorik asit
HRP	: Yabanciturpu peroksidaz (horseradish peroxidase)
HSVtk	: Herpes simplex virüs timidin kinaz
hTERT	: Telomerazın katalitik alt ünitesi
IRES	: Internal ribozomal giriş bölgesi (Internal Ribosomal Entry Side)
LS174T	: Kolon karsinoma hücre hattı (cell line)
Mad 2	: Mitoz iplikçik kontrol noktası geni (Mitotic arrest deficient 2 gene)
mcl-1	: myeloid lösemi hücre farklılaşması proteini 1 (myeloid leukemia cell differentiation protein 1)
MDM2	: Murin çift dakika 2 homologu (Murine double minute 2 homolog)
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCNA	: Proliferatif hücre çekirdek antijeni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
P53	: Tümör protein 53
Plk1	: Polo benzeri kinaz 1 (polo like kinase 1)
POT1	: Telomer korucu gen 1 (protection of telomeres 1)
PS	: penisilin streptomisin
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog geni
RNA	: Ribonükleik asit
S fazı	: Sentez fazı
SCC 3	: Kohesinin multi alt ünitesi (Sister chromatid cohesion 3)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
ShRNA	: saç tokası RNA (small hairpin RNA)
Sic 1	: B tipi siklin (stoichiometric inhibitor of Cdk 1-Clb)

Smc 1	: Kohesinin yapısını oluşturan bir gen (Structural maintenance of chromosome 1)
Smc 3	: Kohesinin yapısını oluşturan bir gen (Structural maintenance of chromosome 3)
STAG 1	: Stromal antijen 1
T	: Timin
TAE	: Tris asetat edta
TBS-tween	: Tris tamponlu tuz çözeltisi
TEMED	: N',N', N', N-tetrametilen-etilendiamin
TERC	: Telomeraz RNA komponenti
TERT	: Telomeraz reverse transkriptaz
TIN2	: TRF1 etkileşimli protein (TRF1 interacting protein)
TPP1	: Tripeptidil peptidaz geni
TRF1	: Telomerik bağlanma proteini
VSVG	: Veziküler somatis virüsü
WT-1	: Wilms tümör protein geni 1

ÖZET

STROMAL ANTİJEN 1 (STAG 1) GENİNİN HÜCRE PROLİFERASYONU, TRANSFORMASYON VE DNA HASAR YANITINDAKİ FONKSİYONEL ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

Genler, aynı sınıftan (protein veya RNA) işlevsel ürünler şifreleyen, kalıtımın temel birimi olarak tanımlanan bölgelerdir. Bunlar aynı genom dizisinde tanımlanabilirler. Stromal Antijen 1 (STAG 1), kromozom çiftlerinin mitoz bölünmenin anafaz safasına kadar iş aygıtına tutunmasını sağlayan kohesinin, altbirimi olan SCC3'ü (sister chromatid cohesion) kodlar. Buna ek olarak, p53 bağımlı genler tanımlandığında STAG 1'in apoptozis ilişkili tümör supressör bir görevinin olduğu anlaşılmıştır. Geçmişte yapılan çalışmaların birinde de telomer yapısının korunmasında rolü olan telomer bağlayıcı protein TRF2'nin inaktive olduğunda STAG 1 geni silinmiş olan genlerden birisi olmuştur. Bundan dolayı da kromozom aberasyonlarına neden olmuş ve potansiyel tümör supressör bir gen görevi ile dikkat çekmiştir.

Bu çalışmada, STAG 1 geninin hücre proliferasyonu, transformasyonu ve DNA hasar yanıtındaki fonksiyonu belirlenmek istendi. Öncelikle STAG 1'in hücrelerdeki salınımı incelendi. Sonra genin baskılanması ve aşırı ifadesi olduğu durumlarda hücrelerdeki değişimlerin incelemek için shRNA ve cDNA oligonükleotidleri kullanıldı. Bundan sonra baskılama ve aşırı ifade deneyleri gerçekleştirildi. Ayrıca STAG 1 salınımı incelemek için sağlıklı insanlar ve hepatoselüler karsinoma (HCC) hastalarından alınmış karaciğer doku örnekleri üzerinde antikor boyama tekniği kullanıldı. Baskılama ve aşırı ifade deneyleri sonucunda başarılı klonlar gözlemlendi ve yapılan protein analizi deneyi ile doğrulandı. Antikor boyama yapılan dokularda bazı HCC'li ve sağlıklı dokularda STAG 1 ifadesi gözlenmesine rağmen bazılarında gözlenemedi. Kesin bir sonuca ulaşılabilmesi için örnek sayısının artırılmasına karar verildi.

STAG 1 geninin hücre proliferasyonu, transformasyon ve DNA hasar yanıtındaki fonksiyonunun araştırılması, tümör baskılayıcı özelliğinden dolayı özellikle kanser hastalarına uygulanacak olan gen tedavilerinde büyük katkı sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: STAG 1, tümör baskılayıcı genler, hücre proliferasyonu

ABSTRACT

DETERMINING THE FUNCTIONAL ROLE OF STROMAL ANTİGEN 1 (STAG 1) GENE IN CELL PROLIFERATION, TRANSFORMATION AND DNA DAMAGE RESPONSES

Genes which can encode same class of functional products (proteins, RNA), are the regions called basic units of hereditary. They can be identified in same genome sequence. STAG 1 is a protein coding gene, encodes SCC3, multi subunit complex of cohesin which ensures chromosome couples to be held together on spindle apparatus until the beginning of anaphase during mitosis. Addition to this, when p53 dependent genes are identified, it is understood that STAG 1 is a gene, has apoptosis related tumor suppressor role. In one of the previous studies, when telomere binding protein TRF2, has a role in protection of telomere structure, is inactivated, STAG 1 gene is one of the genes which was deleted. Therefore, it caused chromosomal aberrations and drew attention with its potential tumor suppressor activity.

In this study, it was demanded to determine functions of STAG 1 in cell proliferation, transformation and DNA damage responses. First expression of STAG 1 was analysed. Then for analysing changes in cells, shRNA and cDNA oligonucleotides were used. After that they were knocked down and overexpressed. Besides, antibody staining technique was used on tissue samples which were taken from healthy people and HCC patients to analyse STAG 1 expression. As a result of knock down and overexpression experiments, successful clones are observed and by protein analysis it was confirmed. Although on some of tissues, applied antibody staining, STAG 1 expression was observed, on some of them, expression was not observed. For significant result, it is determined to increase sample numbers.

Because of its tumor suppressor feature, investigation of STAG 1 gene in cell proliferation, transformation and DNA damage responses will supplement to gene therapies which will be applied especially on cancer patients.

Key Words: STAG 1, tumor suppressor genes, cell proliferation

1.GİRİŞ

Genlerin özellikleri ve fonksiyonlarının belirlenebilmesi konusundaki ilerlemeler hastalıklarla mücadele ve önlem araştırmalarına yeni bir bakış açısı kazandırmış ve hastanın genetik materyalini değiştirebilme çalışmalarını başlatmıştır. Gen tedavisi ile hastanın hastalıkla mücadele edebilmesi için, hücreleri içerisine genetik materyal (DNA veya RNA) sokulması ile yapılan bir tedavi şeklidir. Gen tedavisi, bir grup hastalık üzerinde çalışıldığı gibi kanserin de bir birçok tipinde çalışılmaktadır.

Lechel ve ark.¹ telomerin fonksiyonunu kaybının yaşlanma ve apoptosisi belirlemesi konusunda bir çalışma yapmış ve bu çalışmada, TRF2 (Telomerik tekrar bağlayıcı faktör) geninin baskın negatif şekli olan TRF2 $\Delta b\Delta M$ ile transgenik bir fare modeli oluşturulmuştur. Bu farede telomer fonksiyon kaybı teşvik edildiğinde karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon deneyleri yapılarak kromomal aberasyonlar incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda bazı genlerde amplifikasyon görüldüğü bazılarında silindiği dikkati çekmiştir. Bu silinen genlerden biri de STAG 1 olarak belirlenmiş ve tümör baskılayıcı özelliği olduğu düşünölmüştür.

Nakamura ve ark.² p53'e bağlı fonksiyon gösteren genleri belirlemek üzere çalışmalar yapmış ve bu genleri tespit etmişlerdir. Bu genler DNA onarımında rol alan genler, apoptozis ilişkili genler, anjiyogenezi inhibe eden genler, oksidatif strese rol alan genler, hücre döngüsünde rol alan genler hücre ölümü ya da yaşamını kontrol eden mekanizmada görevli genler ve p53'ün pozitif regölasyonunda rol alan genler olarak tespit edilmiştir. Apoptosis ilişkili gen olarak da STAG 1 belirlenmiştir.

Kanazawa ve ark.³ yapmış olduğu bir çalışmada ise STAG 1'in fonksiyonu üzerinde daha ayrıntılı bir çalışma yaparak apoptozisteki rolü üzerinde durmuştur. P53'ü teşvik edilmiş hücrelerde STAG 1 salınımının daha fazla olduğunu, STAG 1 baskılandığı durumlarda apoptozisin indirgenediğini çalışmalarında göstermiştir.

Bu çalışmada; STAG 1 geninin fonksiyonunu ortaya çıkartmak için hücre düzeyinde araştırmalar yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Bir Gen Olarak STAG 1

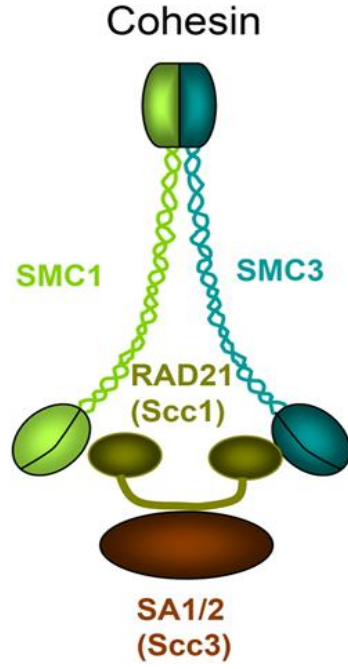
Gen, bir kalıtım birimi olup, genom dizisinde yeri tanımlanabilen, transkripsiyonu yapılan, düzenleyici veya fonksiyonel ürünler şifreleyen bölgedir^{4,5}. Genin düzenlenmesi ve transkripsiyonunun karmaşıklıklarını içeren, yeni ve öz bir tanıma göre gen aynı sınıftan (protein veya RNA) işlevsel ürünler şifreleyen, potansiyel olarak birbiriyle örtüşen, genom dizilerinin birleşimidir⁶.

STAG 1 (Stromal Antijen 1) de protein kodlayan bir gen olup, kohesin alt birimi olan SCC3 (Sister Chromatid Cohesion)'ü kodlayan bir gen dir⁷.

Ökaryotik hücrelerde, DNA molekülleri hücre döngüsünün S fazında replike olup mitoz bölünmenin anafaz safasında birbirlerinden ayrılana kadar fiziksel olarak kohesin aracılığı ile birbirlerine tutunmuş haldedirler. Kohesinin sağladığı bu kohezyon-mitoz aşamasında, kromozom çiftlerinin iğ ipliklerine bağlanması için gerekli bir durumdur.

2.1.1 Kohesin Kompleksin Yapısı:

STAG 1'in Scc3 alt birimini kodladığı kohesin kompleksi 4 farklı alt birimden oluşur. Üç alt birimi (Smc1, Smc3 ve Scc 1) üçgen yüzük modeli oluştururken dördüncü alt birimi Scc3 ise Scc1'e bağlanarak kohesinin yapısını meydana getirir⁸.



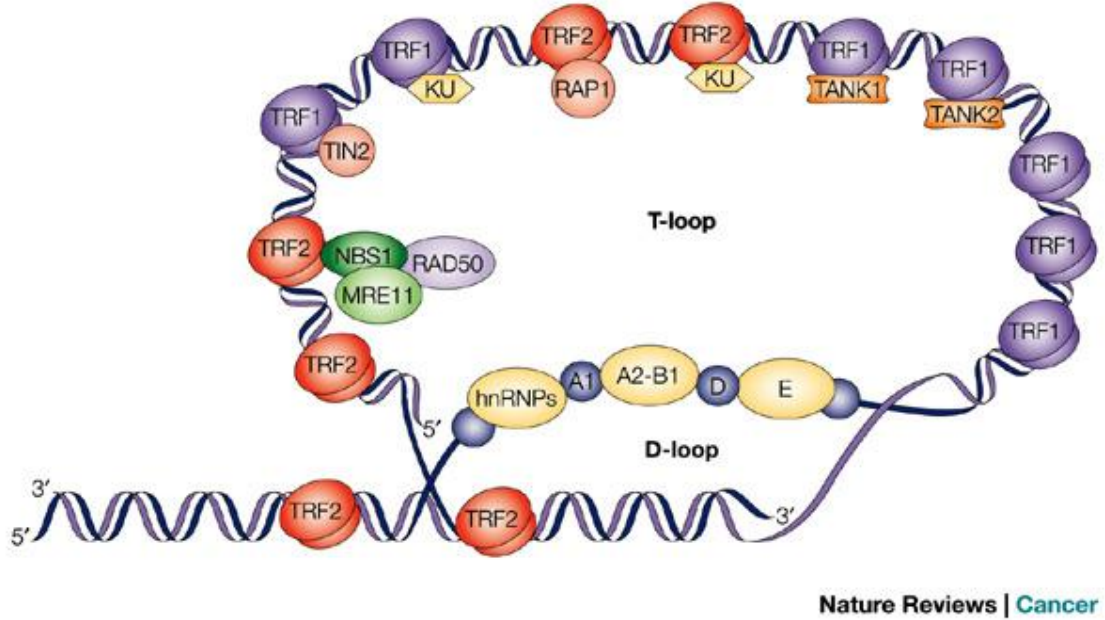
Şekil 1.1 Kohesin Kompleks Yapısı¹⁰

2.2.Telomer ve STAG 1 İlişkisi:

STAG 1, telomer kohesyonunda da yer almaktadır. Telomerler, kromozomların uçlarında yer alan DNA/Protein yapısında özelleşmiş koruyucu yapılardır¹⁰. Yapılan çalışmalar, bu koruyucu telomerik yapı kaybının, genomik dengesizliğe neden olarak belirli kanserlere ve yaşla ilişkili rahatsızlıklara yol açtığını ortaya koymaktadır.

Telomerin, 3' ucunda guaninden zengin tek zincirli uç, kendi üzerine katlanarak kement bezeri t-loop yapısını oluşturur⁹. T-loop yapısıyla birlikte telomerik uçlara bağlanan proteinler de kromozomal uçları koruyarak, bu uçların DNA hasarı olarak algılanmasını engeller¹⁰. T-loop yapısının oluşturulmasında ve stabilitesinde rol alan 6 telomer spesifik protein 'sheltherin' kompleksini meydana getirir, bu proteinlerden TRF1 ve TRF2 direkt çift zincirli (double strand) TTAGGG ve POT1 tek zincirli TTAGGG tekrarlarına tutunur. TIN1 ve TIN2 ise telomerazın tutunmasını bloke ederek telomerik kısalmaya neden olduklarından, telomerin negatif regülatörleri olarak kabul edilmektedirler. TRF2, POT1 ve TPP1 telomerlerin pozitif regülatörleridir¹³ (Şekil 1. 2)¹⁵.

Belirli bir kısalığın altındaki telomerlerde T-loop konformasyonu değişir. Telomer bozukluğu sonucunda da kromozomal uçlarda füzyonlar oluşabilir ve/veya bu uçlar çift zincir kırıkları gibi algılanabilir ve DNA tamir mekanizmaları devreye girer. DNA hasarını gösteren 53BP1, γ H2AX, BRCA1 ve Mre11 komplekslerinin de telomerik uçlara lokalize olması bu görüşü desteklemektedir¹⁴.



Şekil 1.2 Telomerin T-loop Yapısı⁽¹⁴⁾.

Shelterin alt ünitesi olan TRF1 ve ona eşlik eden TIN2 telomerazın telomere girişini önleyerek telomer uzunluğu üzerinde negatif yönde bir düzenleme yapar. TRF1 ve TIN2 her ikisi de kohesine STAG 1 ile bağlanmıştır. Bu da Stag 1 'in telomerlerde yegane bir rolünün olduğunu göstermektedir. Stag 1 hasara uğramış ya da zayıf kalmış hücrelerde, kardeş telomerlerde mitozun sentez fazında kohesyon sağlanamaz ve telomer kohesyonunun kaybı kromozom morfolojisi ve fonksiyonunda dramatik sonuçlara neden olur⁷.

2.2.1 Telomer Disfonksiyonu :

Telomer disfonksiyonu, telomer homeostazının bozulmasıdır. Replikatif yaşlanmaya bağlı izlenen telomerik kısalma, T-loop yapısı ve/veya telomerik

proteinlerin harabiyeti veya regülasyonundaki bozukluk telomerik disfonksiyona yol açmaktadır. Yaşlanmanın, genetik ve çevresel faktörlerin de telomer disfonksiyona neden olduğu yeni yeni anlaşılmaktadır. Hücreler disfonksiyonel telomere cevap olarak yaşlanmaya veya apoptozise gidebilir ya da genomik instabilite gelişir¹⁶.

Genomik instabilite, kanser gelişiminde en erken izlenen neoplastik değişimlerden birisidir¹⁴. Telomerik disfonksiyon hipotezi, kromozomal uçlar telomerik yapılar ile korunmadığında telomerlerin kısaldığını, telomerik füzyonların oluştuğunu ve bunun da genomik instabiliteye neden olduğunu ileri sürmektedir. Sonuç olarak genomik bütünlük kaybı, hücre büyümesini kontrol altında tutan hTERT gibi bir takım genlerin regülasyonunda bozukluğa yol açmakta ve sonuçta tümör oluşumuna neden olmaktadır^{16,17}. Ancak genomik instabilitenin tek nedeni telomer disfonksiyonu değildir; DNA tamir mekanizmasındaki hatalar, kontrol noktalarındaki defektler, kromozomal segresyon defektleri ve viral enfeksiyonlar genomik instabiliteye yol açan diğer faktörlerdir²⁰.

STAG 1 geninin protein kodlayıcı bu özelliklerinden başka, tümör baskılayıcı fonksiyonun iyi anlaşılabilmesi için, öncelikle hücrede gerçekleşen bir takım temel olayların detaylı bir şekilde irdelenmesinde fayda vardır. Bu temel olayları sırasıyla hücre döngüsü, kanserin moleküler temeli, tümör baskılayıcı genler, apoptozis, p53 ve p53- Stag1 ilişkisi olarak ele alacağız.

2.3. Hücre Döngüsü:

Hücre döngüsü proliferasyon olmak üzere ayrılmış bir hücrede gerçekleşen bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Hücre döngüsü, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku yenilenmeleri ile yakın ilişki içerisinde bulunmaktadır. İşte tüm bu düzenleme fonksiyonlarının hücre döngüsü içerisinde yer alışı organizmadaki hemen her tür fizyolojik veya patolojik durumda hücre döngüsünün ne kadar kritik bir öneme sahip olduğunu gösterir²¹.

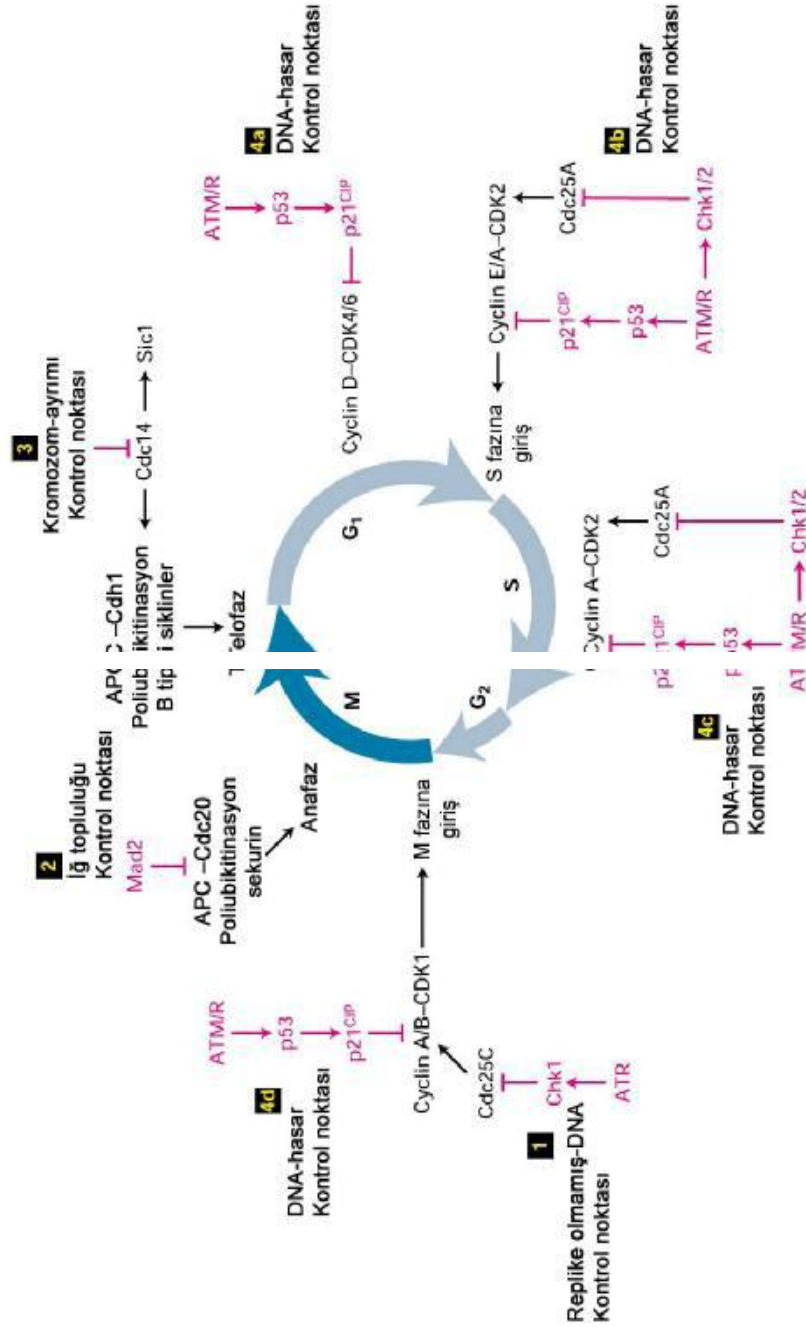
Hücre döngüsünün tümü belirgin bir evreler dizisi olmaktan çok bir süreklilik durumundadır fakat kolaylık açısından döngünün alt kategorizasyonun yapılması bir nevi adet haline gelmiştir. Kısaca hücre döngüsü interfaz, sırasıyla G0,G1,S ve G2 evresine

ayrılabilir gibi mitoz da profaz, metafaz, anafaz ve telofaz şeklinde alt kategorize edilebilir²¹.

2.3.1 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları:

Oluşan herhangi bir kusur halinde hücre döngüsünü dolayısıyla bölünmeyi durduran noktalardır. G1 fazındaki hücre, bulunduğu çevre ile ilgili verileri değiştirerek siklusun başka evresine girileceğine karar verir. İşte bu noktaya restriksiyon noktası veya 'R' noktası denir. Hücre döngüsünün R noktası gibi parçaları kontrol noktaları (check points) olarak adlandırılır. Kontrol noktaları şekil 1.3'te açıkça gösterilmiştir²²:

1. Replik olmamış – DNA Kontrol Noktası
 2. İğ Topluluğu Kontrol Noktası
 3. Kromozom ayrımı Kontrol noktası
 4. DNA hasarı Kontrol Noktası
-
- a) G1 Kontrol Noktası (Siklin D- CDK4/6)
 - b) S Fazına Giriş Kontrol Noktası (Siklin E/A – CDK2)
 - c) S Fazı Kontrol Noktası (Siklin A – CDK2)
 - d) Mitoz Giriş Kontrol Noktası (Siklin A/B – CDK1)



Şekil 1. 3 Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü ve kontrol noktaları replike olmamış DNA kontrol noktasında Siklin A – CDK1 ve Siklin B – CDK1 aktivasyonunu sağlayan Cdc25C proteini fosforile ederek inaktif hale getiren ATR – Chk1 protein kinaz kaskadı sayesinde

engellenme gerçekleştirilir. Böylece mitoz girişin inhibe edilir. İğ topluluğu içindeki kontrol noktası, Mad 2 ve diğer proteinler sekürinin poliübikütasyonu için gerekli APC spesifik faktörün aktivasyonunu inhibe eder. Böylece anafaza giriş engellenir. Kromozom ayrımı kontrol noktasında, nükleotidden serbest kalan Cdc14 fosfataz, APC spesifik faktörün (Cdh1) aktivasyonunu engelleyerek döngüyü durdurur. APC spesifik faktör (Chd1) hem B tipi siklinlerin poliübikütasyonu için hem de Sic1'in indüksiyonu için gereklidir. DNA hasarı kontrol noktasında, ATM veya ATR protein kinazlar aktive edilir. Aktif kinazlar iki yolağı tetikler. Bunlar Chk – Cdc25A yolağı (4b ve 4c) S fazı girişinde ya da geçişinde engellenir ve p53 – p21^{CIP} yolağı G1, S ve G2'nin (4a ve 4b) durdurulmasında öncü rol oynar²³.

2.4. Kanserin Moleküler Temeli

Ölümcül olmayan genetik hasarlar karsinogenezin temelini oluştururlar. Bu genetik hasarlar kimyasallar radyasyon ya da virüsler gibi çevresel faktörlerle ya da kalımsal olarak kazanılabilir²⁴.

Kanserin oluşumunun genetik hipotezine göre tümör kitlesi aslında bu genetik hataya sahip olan tek bir hücreden oluşur²⁵.

Kanser işte böyle mutasyona uğramış birey hücrelerin, etraflarındaki hücrelerin hayatları pahasına kontrolsüz bir şekilde çoğaldıkları, ama sonunda bir parçası oldukları organizmanın ölümüne neden olarak onunla birlikte öldükleri bir hastalıktır.

Kanser hücreleri ve onların bölünerek oluşturdukları yeni hücreler normalde bulunan kontrol mekanizmasını aşarak ürerler ve normalde diğer hücreler için ayrılmış olan bölgeleri işgal edip buralara yerleşirler. Kanser hücrelerinin hızlı bölünmesinin yanı sıra bu hücrelerin vücutta düzenli olarak meydana gelen hücre özelleşmesi ve hücre ölümünü de kendi çıkarlarına uygun şekilde kullanacak özellikler edinmeleri gerekir. Kanselerin çoğu tek bir anormal hücrenin çoğalmasından ortaya çıkar. Bu tek hücrenin anormal ve kontrolsüz çoğalacak olan hücre haline gelmesi muhtemelen hücrenin DNA dizisinde oluşan bir değişiklikten kaynaklanır. Bunu düşünmeye yol açacak en önemli sebeplerden biri kanserojen maddelerin büyük çoğunluğunun DNA'ya verdikleri ve mutasyona yol açtığı bilindiği gibi bir hücrenin kanserleşmesi için birden fazla birbirinden bağımsız mutasyonlar taşınması gerektiği de bilinmektedir.

Şimdiye kadar yapılmış birçok çalışma ve gözlem tümör gelişiminin şu şekilde meydana geldiğini göstermektedir: Görünüşe göre kanserler başlangıçta mutasyona uğramış tek bir hücreden oluşmuş bir grubun arka arkaya mutasyon ve doğal seleksiyona uğramaları sonucunda gerçekleşir. Kanser bu şekilde evrimi büyük oranda şans faktörü içerir ve çok uzun zaman alır. Kanser evrim hızını belirleyen ana faktörler şunlardır:

1. Mutasyon hızı
2. Vücuttaki hücre sayısı
3. Hücrelerin bölünme hızı
4. Hücrelerin sahip oldukları mutasyon sayesinde daha çok sayıda üreyerek diğer normal hücreler üzerinde kazandıkları avantaj.

İşte tüm bu faktörlerin etkisini artırıp hızlandıracak her türlü olay kanser olasılığını artırır²⁵.

Kanser hücreleri kanser gelişiminin her aşamasında edindikleri mutasyonlarla yeni özellikler kazanır. Çevreye, etrafındaki damarlanmayı arttıracak maddeler salgılamak, ya da metastaz yapabilmek için onları buldukları dokulara bağlı tutan molekülleri üretmeyerek hareket etmek için serbest hale gelmek ve sonra da doku içerisinde hareket edebilmek için bağ dokuyu parçalayabilecek enzimler üretebilmeleri gerekir. Bunun yanı sıra bu hücrelerin geliştirebildikleri ve olayları hızlandırabilecek mutasyonlardan biri de hücrenin mutasyon oranını arttıracak mutasyonlardır. Bu mutasyonlar genelde hücrede DNA tamiri mekanizmasında meydana gelir ve tahmin edileceği üzere normal bir hücrede meydana gelen mutasyonların çoğu tamir edilirken, kanser oluşturacak hücrede artan bir hızla mutasyonlar birikir ve bir sonraki jenerasyona aktarılır²⁶.

Buna bağlı olarak kanser hücrelerinde sıklıkla sayı, şekil ve yapısal anormallikler gözlenir⁽²⁵⁾. Hücre bölünmesinde önemli iki zaman vardır: Siklus başlangıcı ve R-kontrol noktası. ('Git' yönündekiler devam edilmesini, 'Dur' yönündekiler durmasını sağlayan sinyaller). R noktası ise bölünme sırasında her şeyin yolunda olup olmadığının kontrol edildiği noktadır ki bir sorun olması durumunda bölünme durdurulur ve sorun düzeltilirse devam edilir, kalıcı sorunlar durumunda ise apoptoz başlatılabilir^{26,27}.

Bu olaylarda gerekli olan genleri başlıca 2'ye ayırabiliriz:

- 1- Hücre Bölünmesini arttırıcı olanlar
- 2- Hücre bölünmesini inhibe edenler

Bununla bağlantılı olarak kontrolsüz hücre bölünmesi ve yayılmasına neden olan iki genel mekanizma vardır. Birincisi hücre çoğalmasını arttıran genleri hiperaktif yapan mutasyonlardır. Bu tür mutasyonların dominant etkisi vardır. Yani bir hücredeki iki kopyadan yalnız birinin bile bu tür bir mutasyona uğraması bu etkiyi yapmak için yeterlidir. Bu şekilde aktive edilen genlere onkogen denir. İkinci mekanizma ise, hücre bölünmesini inhibe eden bir geni inaktive etmektir. Bu tür mutasyonlar genelde resesiftirler, yani etkinin gerçekleşmesi için hücrede bulunan iki kopyanın da bu tür mutasyona uğraması gerekir. Tek mutasyon durumunda bir tanesi inhibe etme görevini yapamasa da diğeri yapacak olduğundan ikisinin birden fonksiyonunu yitirmesi gerekir. Bu tür genlere tümör baskılayıcı genler denir.

Tümör baskılayıcı genlerin bir kopyasının inhibe edici bir mutasyona uğramış halinin nesilden nesile taşınması bu genin ilgili olduğu kanser için yüksek riskin kalıtımsal olarak taşınmasına yol açar²⁸.

Araştırmacılar uzun yıllardır onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri ortaya çıkartmaya çalışmaktadırlar. Bu genlerin bazıları sadece belirli doku çeşidine özel olup yalnız bu dokularda görülen kanserlerde rol oynarken bazıları ise daha temel bir göreve sahip olup vücuttaki hemen her hücrede bulunurlar. Böyle durumlarda bu tür genlerin mutasyonları birçok değişik kanserlerde sıklıkla rastlanır. P53 bu tür bir gen olup insanlarda ortaya çıkan kanserin % 50'sinden fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilmiştir^{28,29}.

2.4.1.Onkogenler Ve Kanser

Onkogenler, yani kansere neden olan genler protoonkogenlerden yani hücrelerde normal büyüme ve diferansiyasyonunu sağlayan genlerden oluşur. Bu onkogen genler ilk olarak virüslerde bulunmuştur. Ancak daha sonra bunların sekansına baktıklarında bunun hemen hemen aynısının insan hücrelerindeki DNA'larında da bulmuşlardır. Bundan da o virüslerin aslında konak hücrenin DNA'larından bir parçayı rekombinasyonla değiştirip aldıkları sonucu çıkarılmıştır. İlk önce virüslerde buldukları için bu onkogenler virüslerdeki ismiyle anılır. Örneğin kanserin bu virüsler

tarafından bulaştırıldığı sanılmıştı ancak çoğu kanserin virüslerden kaynaklanmadığı anlaşılmış daha sonra şu soru akla gelmiştir: Acaba virüslerden kaynaklanmayan tümörlerde onkogenik DNA sekansları var mı? Sonraları birkaç değişik insan tümöründen DNA izole edip bunu fare fibroblast hücrelerine transplant ettiklerinde bu hücrelerin neoplastik hücre özelliğini kazanmaya başladığını saptamışlardır. Buradan edinilen sonuca göre; spontan bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bu transforme eden aminoasit dizilerin birçoğunun ras protoonkogeninin homoloğu olduğu ortaya çıkmıştır²⁹.

2.4.2. Onkogenlerin Protein Ürünleri

Onkogenler, onkoprotein denilen proteinleri kodlarlar ve bu proteinler iki istisna dışında normal protoonkogen ürünlerine benzerler.

- 1- Onkogenlerin önemli düzenleyici elemanları yoktur.
- 2- Tranforme olmuş hücrelerde onkoproteinlerin üretimi için büyüme faktörü ya da diğer dış sinyallere ihtiyaç yoktur. Onlardan bağımsız olarak sürekli üretirler.

Bu onkogenleri anlamak için normal hücre çoğalması sırasıyla incelediğinde;

- 1- Hücre membranındaki spesifik reseptöre büyüme faktörünün bağlanması
- 2- Büyüme faktörü reseptörünün geçici ya da kısıtlı bir miktar aktivasyonu bu reseptörün sitoplazma iç kısmında bulunan sinyal iletilici proteinleri aktive etmesi
- 3- Bu sinyalin sitoplazma boyunca ikincil mesajcılar aracılığı ile iletimi
- 4- DNA'da transkripsiyonu başlatacak çekirdekteki düzenleyici faktörlerin indüksiyonu ve aktivasyonu
- 5- Hücre siklusuna giriş, ilerleyiş ve sonuç olarak bölünme gerçekleşir.

Bu temel bilgiye dayanarak onkogenlerin ve onkoproteinlerin normal hallerinden nasıl bu hale geldiklerini anlayıp, onların sinyal iletimi kaskadındaki rollerine dayanarak gruplanabilir²⁴.

2.4.3 Onkogenlerin Aktivasyonu:

Protoonkogenlerin onkogenlere şu iki geniş kategoride özetlenebilir:

- 1- Genin yapısında değişiklik oluşması ve bu şekilde anormal gen ürünü onkoprotein yani anormal fonksiyonu olan protein üretilmesi
- 2- Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde değişiklikler olması; artırılmış ya da uygunsuz miktarda yapısal olarak normal olan büyümeyi artırıcı proteinlerin üretilmesi

Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşmesine neden olan yapısal ve düzenleyici faktörlerdeki değişiklikler şu şekilde özetlenebilir;

- a. Nokta mutasyonu
- b. Kromozomların yeniden yapılanması; translokasyon ve inversiyon
- c. Gen amplifikasyonu^{24,29}.

2.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Protoonkogenler hücre büyümesini destekleyici proteinler üretirken tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını engelleyecek ürünler üretirler. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonu hücre büyümesini düzenlemektir, tümör oluşumunu engellemek değildir. Bu genlerin kaybı birçok insan tümöründe anahtar rolü oynadığı için tümör çalışmaları sonucunda ilk bulduklarında bu genlere tümör baskılayıcı gen ya da antionkogen denilmiştir.

İlk çalışılan tümör baskılayıcı gen retinoblastomadır. Bu çalışmalar sonucunda retinoblastomaların % 60'ı sporadik, % 40'ı kalıtsal olduğu ortaya çıkmıştır. Kalıtsal ve sporadik olarak iki değişik şekilde ortaya çıkışı açıklamak için iki vuruş (two-hit) hipotezi ortaya atılmıştır. Buna göre kalıtsal retinoblastomada; bir genetik değişiklik kalıtsal olarak anne-babadan birinden alınır ki bu ilk vuruştur (first hit). İkinci mutasyon sporadik olarak ortaya çıkar, bu da ikinci vuruştur (second hit). Sporadik retinoblastomada ise iki mutasyonda aynı hücrede tümör oluşturur^{24,27}.

2.5.1 Tümör baskılayıcı genlerin protein ürünleri

Büyümeyi inhibe eden faktörlerin de aynı büyüme faktörleri gibi bir sinyal ileti sistemleri olduğu düşünülmektedir. Mitojenik sinyallere benzer şekilde büyümeyi inhibe eden sinyallerin de hücre dışında başlayıp reseptörler, sinyal ileten proteinleri,

hücre siklusunu ve nükleer transkripsiyonu düzenleyen faktörleri kullanarak görevlerini yaptıkları düşünülmektedir.

En sonunda; bütün bu pozitif ve negatif sinyaller nükleusta toplanırlar ve burada bölünme ya da bölünmeme kararı verilir. Bununla bağlantılı olarak bazı tümör baskılayıcı genlerin ürünleri nükleusta bulunurlar. Başlıca tümör baskılayıcı genler şunlardır:

- Rb geni
- P53 geni
- BRCA-1 ve BRCA-2 genleri
- APC geni
- VHL geni
- PTEN geni
- WT-1 geni
- DCC geni²¹

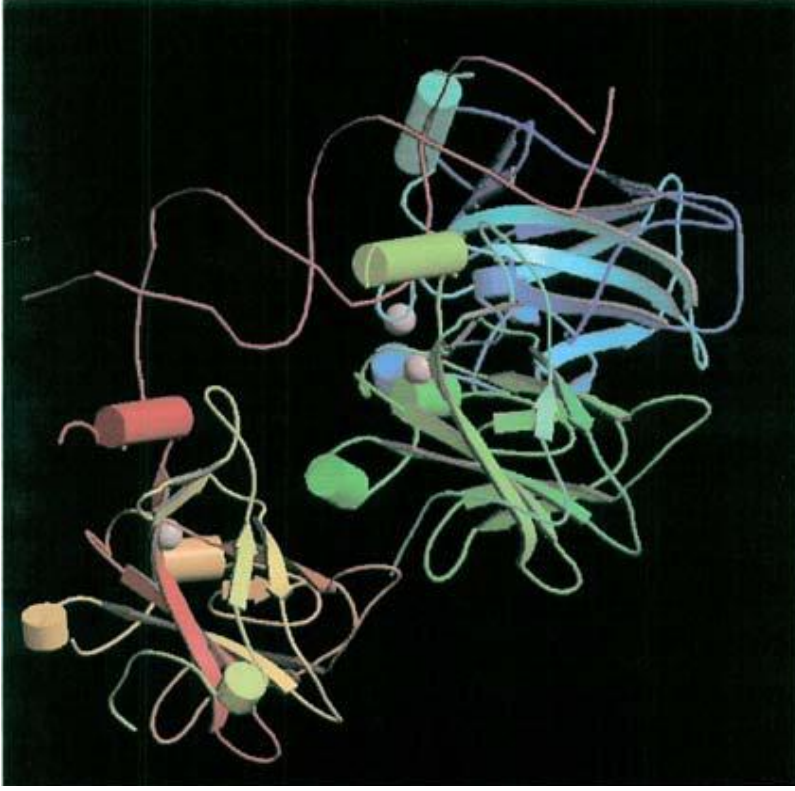
2.5.2 P53 Geni

P53 geni ilk defa 1979 yılında Lane ve Crawford, bunların hemen arkasından da Linzer ve Levine tarafından, nükleer fosfoprotein olarak tanımlanmıştır. David Lane ise immünohistokimyasal yöntemlerle insan tümörlerinde p53 genini göstermiştir^{24, 25, 29,30, 31, 32, 33, 34}. P53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13-1 pozisyonunda bulunan bir tümör baskılayıcı genidir. 16-20 kb uzunluğunda olan bu gen 11 eksondan oluşmaktadır. 2. ve 11. eksonda bulunan DNA kısmı 8-10 kb uzunluğunda olup kodlama yapamaz^{31, 32, 37}.

P53 geninin iki tipi vardır. Wild tip p53 normal fonksiyonel tiptir. Kısa ömürlü olup, 6-20 dakika kadardır^{32, 38, 39}. Dokularda saptanması zordur^{18, 21, 27, 28}. Diğer tip ise mutant tip olup ömrü 3-6 saat kadardır ve wild tipten daha uzun ömürlüdür. İmmünohistokimyasal olarak dokularda kolayca saptanır.

P53 genindeki değişiklikler insan tümörlerinde en çok rastlanan genetik değişiklikler olma özelliği taşır^{32, 29, 35, 38}. İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraları sadece mutant formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı, normal p53 geninin ise tümör oluşumunu baskıladığı anlaşılmıştır. Kolon, meme, akciğer, mesane, endometrium gibi birçok

organın epitelyal tümörleri yanı sıra mezenkimal, nöronal ve lenfoid kökenli çeşitli tümörlerde p53 geninin homozigot kaybı saptanmıştır^{32, 33, 34, 37, 38, 39}.



Şekil 1. 4 P53 proteininin DNA ile oluşturduğu kompleksin kristalografi ile bulunan üç boyutlu yapısı

Çeşitli mutasyonlar sonucu normal hücrelerde eksprese edilen p53 geninin iki allelden biri kaybolmaktadır^{31, 32, 33}.

P53 gen kaybı nokta mutasyon, delesyon, rearajman, insersiyon ile olmaktadır. P53 geninde görülen en büyük mutasyon şekli nokta mutasyondur. Gen mutasyonları özellikle DNA'ya spesifik bağlanma bölgeleri olan 100-300 aminoasit bölgeleri arasında gelişir³².

P53 genini diğer tümör baskılayıcı genlerden ayıran en önemli özellik, tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı için hücrede tek bir allelinin inaktivasyonunun yeterli olmasıdır. Bunun nedeni bazı mutant p53 proteinlerinin hücrede ısı şok protein 'hsc 70' ile bağlanması, bunlara normal p53 proteininin de bağlanıp uzun yarı ömürlü fonksiyon görmeyen kompleksler oluşturulmasıdır. Bunun sonucunda mutant p53 proteini normal

p53 proteinini inaktive etmiş olur. Bir mutant ve bir normal allel taşıyan hücre hiç fonksiyonel p53'ü yokmuş gibi davranır. Bu tip mutasyonlara 'dominant negatif' denir. Çünkü mutant allel dominant olarak davranır ve normal allelin fonksiyonunu engeller^(27, 28, 29). Nokta mutasyon sonucunda konformasyon değişikliği olan p53 proteininin yarı ömrü 3-6 saate kadar uzar ve bu nedenle normal p53'ten farklı olarak immunohistokimyasal olarak saptanır^{25, 30, 40, 42}.

P53 hücrede normal koşullarda bazal seviyede ve inaktif halde bulunur. Fizyolojik şartlar altında yaşam süresi 20 dakika gibi oldukça kısa bir süredir ve yübikütin aracılığı ile proteolize uğrar. Hücre bölünmesine ya da hücrenin hayatını sürdürmesine müdahale etmez. Normal bölünen hücrede p53'ün bazal seviyede bulunmasının sebebi hatayı fark edebilecek şekilde düşük fakat sabit bir seviyede tutulması p53'ün MDM2 adlı proteinle olan döngü halindeki ilişkisi sayesinde sağlanır. Yani p53'ü bazal seviyede tutan MDM2 proteindir^{25, 28, 32, 37, 38, 44}.

Çeşitli stres koşulları p53'ü hızla aktive eder. P53'ü aktive edici sinyallere örnek olarak hipoksi, DNA hasarı, düzensiz büyüme sinyalleri, onkogenler, ısı şoku, nitrik okside maruz kalma gibi örnekler verilebilir. P53 özellikle DNA hasarına hızla tepki verip DNA'nın ve genel anlamda genomun içerdiği bilginin olduğu gibi korunmasını sağlaması nedeniyle 'genomun gardiyanı' adını alır.

Stres koşullarında p53 miktarı hızla artar ve p53 aktif hale gelir. P53'ün miktarının hızla artması hem yarı ömrün arttırılması ile hem de yüksek oranda p53 mRNA'sından protein translasyonu yapılması sayesinde sağlanır.

P53'ün aktivitesinin 2 temel etkisi:

- 1- Hücre siklusunun bloke edilerek durdurulması
- 2- Apoptozis (şekil 1. 5)^{28, 30, 33, 38}

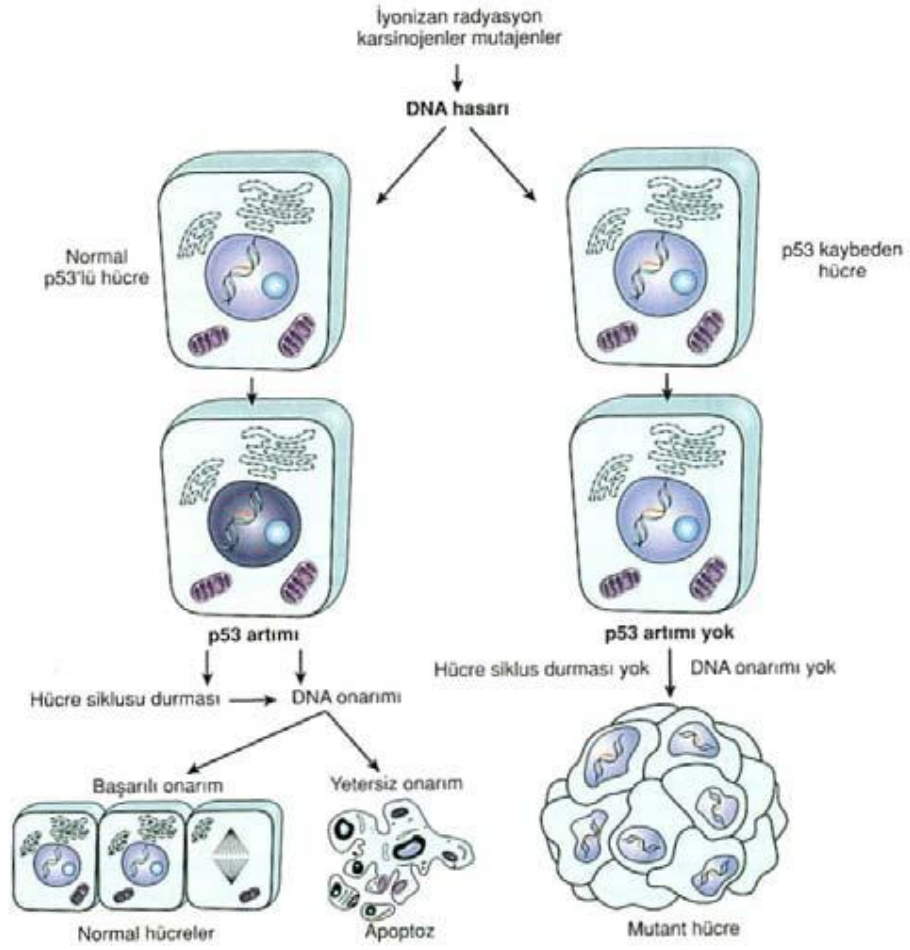
P53 üzerine etki ettiği ana mekanizma p16, Siklin D, cdk 4 ve Rb'den oluşan, hücre bölünmesi sırasında G1'den S fazına geçişi kontrol eden mekanizmadır. Kanserlerin % 25'inde bu asit proteinden birinde mutasyon görülmektedir. Rb proteini E2F proteinine bağlanarak E2F'nin asıl görevi olan DNA'ya bağlanmasını engeller. E2F DNA'ya bağlanarak, hücre siklusunu devam ettirmek için gerekli olan siklin ve cdklerin mRNA'larının üretimini sağlar. Dolayısıyla Rb hücre bölünmesini engelleyici

bir proteindir. Cdk 4'ün görevi ise Rb'yi inhibe etmektir. Cdk 4, Rb'ye bağlanarak Rb'nin E2F'ye bağlanmasını engeller böylece hücre bölünmesi için gerekli siklin ve cdk'ler mRNA üretilmesini sağlaması sayesinde gerçekleşir. Cdk 4'e etki eden 3 değişik protein vardır: Siklin D, p16, p21.

P21, p53 tarafından aktive edilmiş olup cdk 4'ü inhibe eden bir proteindir. P53 stres anında p21'in üretimini artırır ve bu şekilde hücre siklusunu durdurur. Bu da hücrenin G1 fazında tutuklanmasını sağlar.

P21 yüksek oranlarda üretildiğinde PCNA adlı proteine de bağlanmak suretiyle, PCNA'nın DNA'nın polimerizasyonundaki görevini inhibe eder. PCNA'nın başka bir görevi ise DNA'nın tamirinde aldığı roldür, fakat bu p21 tarafından inhibe edilmez.

P53'ün G2 fazında hücrenin tutuklanmasında da rol oynayabileceğine dair bir takım bilgiler mevcuttur. Hücredeki kromozomların yavru hücrelere eşit bir şekilde dağıtılmasından sorumlu mekanizmada aksaklık olması durumunda p53 aktive edilir ve hücre bölünmesi bu aşamada durdurulur. Bu da p53'e genomun gardiyanı denilmesini destekleyen başka bir koruma mekanizmasıdır, eksik ya da ekstra kromozomlu hücrelerin üretilmesi bu şekilde önlenmiş olur^{24, 28, 30, 32, 38}.



Şekil 1.5 Genom bütünlüğünün devamında P53 geninin rolü

Sonuçta; p53 DNA'sındaki hasarı bilinmeyen mekanizmalarla hisseder ve DNA'nın tamirinin hücre siklusunun G1 aşamasında bloke edilmesi ve DNA tamir genlerini aktive ederek gerçekleştirilir. Yani hücre siklusunu G1 aşamasında durdurur. DNA tamir genlerini aktive eder, böylece yaratılan zamanda meydana gelen hasarın tamirini sağlar ve siklusu kaldığı aşamadan devam ettirir. Zarar görmüş DNA'sı olan ve bunu tamir edemeyen hücre p53 tarafından apoptoza gönderilir. Bu aktivitesinden dolayı p53'e 'Genomun Gardiyanı' denir^{24, 30, 32, 33, 38}.

P53'ün homozigotik kaybı durumunda hasar görmüş DNA tamir edilemez ve hücre içerisinde mutasyonlar sabitlenir. Sonuçta hücre malign transformasyona doğru giden tek yönlü bir yola girmiş olur.

P53'ün tümör oluşumunu engelleyici bir görevi daha yakın zamanda bulunmuştur. DNA hasarının yanı sıra, hipoksi de p53'ü aktive edebilir. Tümör anjiyogenezi tümör hücrelerinin büyümesi için kritik önem taşır. Hipoksiye giren tümör hücrelerinin eğer normal p53 genleri varsa apoptoza gidebilir. Fakat p53 genleri mutasyona uğramışsa o zaman hipoksik tümör hücreleri apoptoza dirençli hale gelir.

Somatik ve kalıtsal mutasyonların yanı sıra p53 geninin fonksiyonu başka mekanizmalarla da inaktif hale getirilir. Rb proteininde olduğu gibi, bazı DNA virüslerini transforme eden proteinlerin, p53'e bağlanıp p53'ün parçalanmasına sebep olabilirler. Normalde p53'ün aktivitesini azaltan p53'e bağlanan MDM2 proteini bir takım yumuşak doku sarkomalardan gen amplifikasyonu sonucu çok miktarda üretilir. MDM2, p53'ün hızla parçalanmasını sağlayarak bir onkogen gibi davranır^{24, 28, 25, 26, 30, 33, 413 44}.

P53'ün DNA hasarına cevap olarak apoptozisi kontrol etmesinin bir takım teorik ve pratik uygulamaları vardır. Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon ve kemoterapi etkilerini tümör hücrelerinin DNA'sında hasar yapacak apoptozise neden olmak suretiyle gerçekleştirirler. Ancak bunun gerçekleşmesi için o hücrelerde normal p53 geninin bulunması lazımdır. Buradan da anlaşıldığı gibi, normal p53 geni taşıyan tümörler radyoterapiye mutant p53 geni taşıyan tümörlerden daha hasastır. Örneğin; testis teratokarsinomu ve çocukluk çağı akut lenfomatik lösemisi normal p53 geni taşır. Oysa akciğer ve kolon kansinimleri sıklıkla p53 mutasyonu taşır, bu nedenle kemoterapi ve radyoterapiye dirençlidir^{32,39,48}.

P53'ün bulunuşundan bu yana 20 yıl geçmesine rağmen p53 yakın zamana kadar hem yapısal hem fonksiyonel olarak biliniyordu. 1997'nin sonlarına doğru p53'ün kardeşi sanılan p73 geninin bulunuşuyla bu durum değişti. P73 kromozomunun 1p36'da lokalizedir ve p53'e birçok yönden benzeyen bir DNA bağlanma bölgesi vardır. P53'e benzer şekilde uygun koşullar altında hücre siklusunun durdurulması ve apoptozise neden olabilir. 1p36 lokalizasyonunun delesyonu; nöroblastoma, hepatoselüler, kolon, meme, renal pelvis, üreter ve over tümörlerinde bulunmuştur^{24,30,34,39}.

Apoptozis, hücrenin programlı ölümü, genetik bir programın hücreyi ölüme götürmesidir. Apoptozis, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri programlı aktif RNA/Protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren fizyolojik bir mekanizma olarak kabul edilir^{37, 39, 40}.

Apoptozis, normal gelişim için esas olup bu işlemdeki bir bozukluk embriyonik ölümden, kanser gelişim riskine kadar değişen bir spektrumda sorunlara neden olur³⁹.

Cohen ve Duke 1984'te protein ve RNA sentezinin kimyasal inhibisyonunun apoptozisin engellediğini göstererek, apoptozisin aktif bir işlem olduğunu ispatlamışlardır. 1992'de Williams ve arkadaşları bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ta yapılan çalışmalarla apoptozun aktif ve genetik kontrol altında olduğu kesinleşmiş ve memeli hücrelerinde de genetik kontrolün önemini göstermişlerdir³⁹.

2.5.3. Apoptozisin Morfolojisi

Işık mikroskobu ile geç dönem değişiklikler tanımlanabilmekte ise de en iyi elektron mikroskobu ile görüntülenir. Buna göre:

- 1- Yüzey organellerinin kaybı: Mikrovillustan bağlantı noktaları ortadan kalkar, hücrenin komşularıyla bağlantısı kesilir.
- 2- Hücre büzülmesi: Apoptozis sırasında hücre büzülmeye, sitoplazma yoğunlaşmaya başlar ve organeller sıkışık bir hal alır.
- 3- Kromatin yoğunlaşması: Apoptozis ışık mikroskobunda da seçilen en belirgin bulgudur. Nükleus endojen endonükleazların etkisi ile membran çevresinde yoğunlaşır, yuvarlağımsı kütleler haline gelir ve nükleus parçalanarak ayrılır.
- 4- Sitoplazmik vakuolizasyon ve apoptotik cisimciklerin oluşması: Hücrede membran dışına doğru vakuolizasyonu olur ve takiben vakuol hücreden ayrılırken birçoğunda organel parçaları vardır ve apoptotik parça denilen cisimcikler halindedirler^{22, 44, 45}.

Apoptozisin kontrolü, hücrede çevresel, gelişimsel, yaşamsal genetik sinyaller ile olur.

2.5.4. Apoptozisi Uyarılar

Yaşamsal faktörlerin ortadan çekilmesi, potent apoptotik sinyallerin oluşmasına neden olur. Çevresel apoptotik sinyallerden olan sitotoksik T lenfositleri apoptozise neden olur⁽³⁶⁾. Isı şoku, radyasyon, viral enfeksiyonlar, serbest oksijen radikalleri, sitotoksik ilaçların varlığı gibi durumlarda hücre hasar oluşumu, hücre hücre veya hücre substrat ilişkisinin bozulması halinde apoptozis organizmanın bir savunma mekanizması olarak devreye girer^{24, 28, 46}.

2.5.5 Apoptozisi Baskılayıcılar:

Koloni sitümüle edici faktörler ve interlökinler, eritropoetin apoptozisin hücre bazındaki en önemli inhibitörleridir. EBV, Herpes virüs, E179 Adenovirüs özellikle Bcl-2 gen ailesi üzerinde apoptozisi engeller⁴⁴

Apoptozis yapan genler proapoptotik genler olarak tanımlanır. Bunlar bak, bax, bcl-xl, bcl-w, mcl-1 genleridir^{45, 41, 49}.

P53 gen ürünleri apoptozisin kontrolünde rol alan multipl genlerin indükleyicisi olarak bilinir³⁵. P53'ün apoptoza yol açabilmesi için çeşitli faktörlerin bir araya gelmesi gerekir. Örneğin DNA'nın hasar gördüğü durumlarda ve hücreye yaşaması yönünde az, hatta hiç sinyal gelmediği durumlarda ya da bir onkogenin hücreyi bölünme siklusuna girmeye zorlanması durumunda, p53 aracılığı ile apoptoz başlatılabilir.

P53'ün apoptozu başlatılabildiği uzun süredir bilindiği halde, bunu hangi mekanizma ile yaptığı yakın zamanda bulunmuştur^{45, 48, 49}. P53 aktive olur, hücre siklusunu G1 fazında durdurur, DNA tamiri için gereken emirleri verir. Eğer DNA başarılı bir şekilde tamir olursa cmyc aktif hale gelir ve p53 miktarını azaltarak hücre siklusunun kaldığı yerden devamını sağlar. Ancak hücre büyümesinde ters yönde dışarıdan sinyaller almaya devam ederse yani hücreye çelişkili sinyaller gelirse hücre apoptozisi başlatır²⁴. P53'teki değişiklikler kanserin direk etkisi değildir. Ancak P53'e bağlı hücrelerin DNA hasarında kontrol cevabında defekt olduğunda bu hücreler malign transformasyon için yüksek risk oluştururlar⁴⁷.

P53 geni; birçok gen ile ilişkili içinde genom bütünlüğünü kontrol eden, bu bütünlükte bir sorun olduğu zaman hücreyi mitoz girmekten alıkoyarak diğer sinyal ve genlerin yardımı ile gen onarımı veya hücre diferansiyasyonunu

sağlamakla veya hücreleri apoptozise sürüklemektedir^{24, 50, 45, 48}. P53 gen ürünleri transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozisi indükleyebilmektedir³⁹. P53'ün transkripsiyona bağımlı ve bağımsız apoptozis fonksiyonları hücre tipine göre değişebilmektedir^{45,48}. Büyümenin durması veya apoptoz etyolojisindeki faktörlerden hücre tipindeki farklılıklar DNA hasarı sonrası apoptoza giden hücreler ve normal diploid fibroblast hücreleri, hücre siklusunun durmasında önemli rol oynarlar. Bazı onkogenlerin ekspresyonu büyüme durmasından daha çok etkilemektedir.

2.6. P53 Ve Stag 1 Arasındaki İlişki

P53'e bağılı hedef genlerin fonksiyonlarını analiz etmek üzere çalışmalar yapılmış ve çeşitli genler tespit edilmiştir. Bu genler DNA onarımında rol oynayan genler, Apoptozis ilişkili genler, anjiyogenezi inhibe eden genler, oksidatif strese rol alan genler, ye- beni (eat me) sinyalinde rol oynayan genler, hücre döngüsü kontrolündeki genler, hücre ölümü ya da yaşamını kontrol eden mekanizmada görevli genler, p53'ün pozitif regülasyonunda görevli genlerdir². P53'ün apoptozisle ilişkili genlerini tespit etmek amacıyla çeşitli deneyler yapılmıştır. 121. aminoasit serinin fenilalanin ile yer değiştirmesiyle oluşturulmuş mutant p53'ün (p53-121F), wild tip p53'ten (wtp53) daha etkin olarak apoptozisi indüklediği gözlenmiştir. Bu gözlemden sonra bir ya da daha fazla apoptozis ilişkili p53 hedef genlerinin de bu duruma bağılı olarak mutant p53 ile teşvik edilmiş olması gerektiği düşünülmüştür. Bunu açığa çıkartmak için, p53-121F ya da wtp53 içeren adenovirus vektörleri ile enfekte edilmiş LS174T kolon kanseri hücrelerinin mRNA'ları kullanılarak, cDNA mikroarray tekniği uygulamasıyla p53' bağılı apoptozis ilişkili genler belirlenmiştir. Bu deneyler sonucunda STAG1 geni adp53-121F ile enfekte edilen hücrelerde ad-wtp53 ile enfekte edilen hücrelerin tersine yüksek ekspresyon göstererek transkribe olmuştur. Diğer kanser hücre hatlarında p53'e bağılı olarak STAG 1 mRNA'sı çeşitli genotoksik streslere yanıt olarak indüklenmiştir. Bunun daha da ötesinde STAG 1 ekspresyonu, birçok kanser hücre hatlarında apoptozise neden olmuştur. Endogenous STAG 1'in, RNA-interferens metodu kullanılarak baskılanmasıyla ister Ad-p53-121F ile ister Ad-p53 ile olsun apoptotik yanıt indirgenmiştir. Bu sonuçlarda STAG 1'in p53 için yeni bir transkripsiyonel hedef olduğunu, apoptozisle

p53 bağımlı ilişkide olduğunu ve gelecek nesil gen tedavilerinde iyi bir aday olabileceğini de öne sürmektedir³.

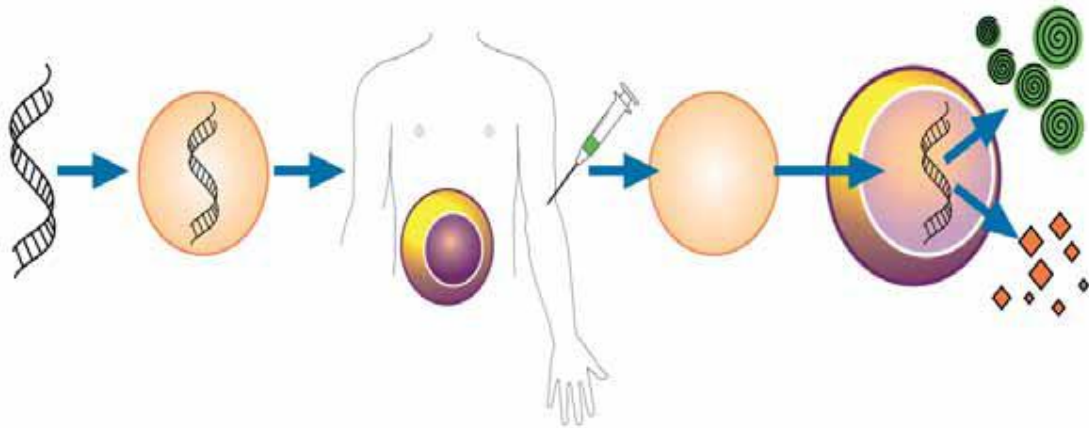
2.7. Gen Tedavisi

Gen tedavisi hızla gelişen ve gelecek için umut veren bir tedavi yöntemidir. 1960'larda moleküler biyoteknolojideki gelişmelerle başlayan çalışmalar, 1990'larda klinik gen tedavisinin gerçekleştirilmesi ile başlamıştır. Günümüzde 4000'den fazla sayıda hasta üzerinde 400'ü geçkin klinik çalışma yürütülmektedir^{53,54}.

2.7.1. Gen Tedavisinin Tanımı

Gen tedavisi, terapötik etki elde etmek amacıyla, konak hücrede gen ekspresyonunu değiştirmek için konak hücreye rekombinant genetik materyal (DNA veya RNA) sunulmasıdır (Şekil 1. 6)⁵⁵. Gen tedavisi stratejilerinin uygulama alanının büyük bir kısmını kanserler oluşturmakla birlikte, monogenetik kalıtsal hastalıklar, enfeksiyöz hastalıklar ve vasküler hastalıklar gibi geniş bir hastalık grubunda da kullanımı söz konusudur⁵⁴. Genetik materyaller, doğrudan ya da dolaylı yolla hedef alana ulaştırılabilir.

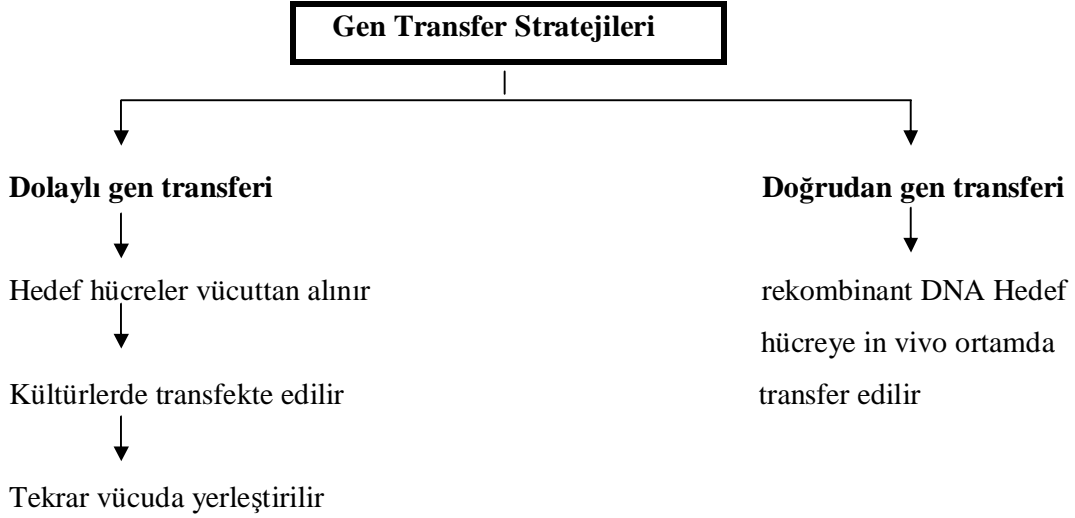
Doğrudan gen transferinde, genetik materyal in vivo olarak hedef hücreye (örneğin, endotel hücresine) transfer edilir. Dolaylı gen tedavisinde ise hedef hücreler hastadan alınır, gen transferi vücut dışında gerçekleştirilir (ex vivo) ve hücreler vücuda transplantasyon ya da transfüzyon yolu ile geri verilir⁵⁵.



Şekil 1.6 a-d. Gen tedavisi Uygulaması. **A.** DNA (genetik materyal). **B.** Genin virüs içerisine entegrasyonu. **C.** Virüsün, geni hedef hücre içerisine bırakması ve genin protein ekspresyonunu başlatması. **D.** Üretilen proteinin ilgili hücre üzerinde ve salgılandığında parakrin veya sistemik bir etki

göstermesi (<http://mededucation.bjmu.edu.cn/PPT/gene%20therapy.ppt> adlı siteden değiştirilerek alınmıştır.)

Çizelge 1.1 Gen transfer stratejileri



2.7.2 Malignitelerde Gen Tedavisi

Moleküler onkoloji ve tümör immünolojisinde gelişmeler kanserin tedavisinde gelişmeler kanserin tedavisinde de genetik tedavinin geliştirilmesinde yol açmıştır. Mevcut tedavi stratejileri, tümöre karşı oluşan immün cevabın stimülizasyonu (tümör aşılari, sitokin, gen tedavisi), onkojenik ekspresyonu azaltmayı, tümör supresör gen fonksiyonlarındaki bozuklukları düzeltmeyi, bölünen tümör hücrelerinin içine genin verilmesi yolu ile kemoterapik ajanlara karşı duyarlılığın artırılmasını ve anjiyogenezin modülasyonunu hedeflemesidir^{56, 57, 58, 59}.

Çoğu kanserde p53 mutasyonları mevcuttur ve bu mutasyonlar tümör oluşumuna neden olan kompleks moleküler olaylar dizisini tetiklemektedir. Bu sebeple tümörlerin gen tedavisinde bir yöntem de mutasyona uğramış ya da kayıp olan p53 geninin yeni bir kopyası ile değiştirilmesidir. P53 tümör supresör geni kodlayan adenoviral vektörün biyopsi iğnesi kullanılarak akciğer kanseri nidusuna enjekte edilmesi ile tümör hücresi gelişiminin inhibisyonu engellenmiştir^{53,57}. Antitümöral etki bu yolla sağlanmakla birlikte intratümöral enjeksiyonla az sayıda tümör hücresi transdükte edilmektedir ve kalan hücreler hızla çoğalıp antitümöral etkinin sınırlanmasına neden olmaktadır⁵⁷.

Bu sorunu çözebilmek amacı ile seyirci etkisine sahip yani gen tedavisi vektörü ile doğrudan etkileşmesi olmayan tümör çevresinde ya da uzak bölgelerde mevcut olan tümör hücrelerinin öldürülmesini amaçlayan tedaviler geliştirilmelidir. Bunun en sık kullanılan örneği HSVtk geni ile gansiklovirin kullanımınıdır. Vasküler hastalıklarda kullanılan mekanizma ile HSVtk/gansiklovir birlikte malign mezotelyoma, beyin ve karaciğer tümörleri gibi bazı maligniteler de denenmektedir^{56, 57, 59, 60}.

Anjiyogenez ile karakterize patolojik durumlarda ise proliferen olan endotel hücreli retrovirüs tarafından hedeflenebilir. Bu strateji malign gliom modelinde denemiş ve malign gliomda tümör endoteli ilaca duyarlı genlerde transfekte edilmiştir. Bunun da gliomda geniş hemorajik nekroza neden olduğu saptanmıştır⁶¹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, materyal olarak Ulm Üniversitesi, Moleküler Tıp Enstitüsü, Max Plack Araştırma Departmanı, Yetişkin Kök Hücreleri Yaşlanma Birimi'ndeki insan fibroblast hücreleri, lenti viral vektörler, hastalardan alınan parafine yatırılmış HCC'li ve sağlıklı karaciğer doku parçaları kullanılmıştır.

Ayrıca bu çalışmada, thermal döngü cihazı, soğutmalı santrifüj, mikrosantrifüj, yatay elektroforez sistemi, elektroforez güç kaynağı, elektronik hassas terazi, hız ayarlı vorteks, otomatik pipetler, pH metre, enjektörler, UV transillumunator, UV görüntü analiz sistemi, Steril 1,5 ml, 2ml ependorf tüpleri, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ve inkübasyon cihazı gibi birçok deney ekipmanı kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir:

Akrilamid (Roth), APS (Merck), Ampisilin (Sigma), Beta aktin (Sigma), Borik asit (Sigma), Dapi (Vectashield), DMEM (PAA), ECL deteksiyon kiti (Millipore), GAPDH (Bethy Labs), Glisin (Applichem), HRP Conjugate Rabbit Anti-Goat Ig G (H+L) (invitrogen), HRP Goat Anti-Mouse Ig G (H+L) (invitrogen), HRP Goat Anti-Rabbit Ig G (invitrogen), milkpowder (Roth), PBS (Gibco), p21 (Santa Cruz), SDS (Sigma), STAG 1 (Abnova), TEMED (Sigma), Tris (Sigma), Tween (Sigma).

Yapılan çalışmalar şu ana başlıklar altında gerçekleşmiştir.

- Stag 1 proteininin fibroblast hücrelerindeki salınımı
- shRNA ve cDNA oligonükleotidlerinin lenti viral vektörlere klonlanması
- Klonlanmış vektörlerin lenti X 293 T hücre hattına verilerek transfekte edilmesi ve ardından PD: 40,5 genç fibroblast hücreleri ile PD: 57 yaşlı fibroblast hücrelerinin transdüksiyonu
- Transdükte olmuş hücrelerin kültüre alınması
- Kültüre alınmış hücrelerin toplanması ve STAG 1 protein ekspresyonunun incelenmesi
- Hastalardan alınan HCC'li (Hepatoselüler Karsinomalı) ve sağlıklı karaciğer dokularından alınan doku kesitlerinin immunofloresan antibadi boyama metodu ile boyanması ve STAG 1 protein ekspresyonunun incelenmesi

3.1 STAG 1 Proteininin Salınımının İncelenmesi

STAG 1 proteininin salınımı yaşlı ve genç olmak üzere PD: 37 ve PD: 53,5 insan fibroblast hücreleri üzerinde incelendi. Bu hücreler 3 ve 6 saat, 10 Grey şiddetinde gama irradyasyonuna maruz bırakılmış ve bırakılmamış hücreler olarak kategorize edildi ve Western blot tekniği kullanılarak p53, p21 ve STAG 1 protein ekspresyonları incelendi.

Kullanılan Malzemeler:

% 8 lik yükleme jeli için aşağıdaki çizelgede gösterilen maddeler kullanılmıştır.

Çizelge 2. 1 Akrilamid jel elektroforezi için hazırlanan ayırıcı ve paketleyici jeller içerisindeki maddeler ve miktarları

	Ayırıcı jel solüsyonu hazırlanması	Paketleyici jel solüsyonu hazırlanması
Su	4.6 ml	3.4 ml
%30'luk akrilamid karışımı	2.7 ml	0.83 ml
1.5 M Tris (ph:8.8)	2.5 ml	0.63 ml
%10 SDS	0.1 ml	0.5 ml
%10'luk APS	0.1 ml	0.5 ml
TEMED	0.006 ml	0.005 ml

Akrilamid Jel Elektorforezi İçin:

1 litre 1X SDS tamponu kullanıldı.

Bunun için 10X lik SDS tampon stokları hazırlandı. Bir litre 10Xlik SDS tamponu için 30.3 g tris, 144 g glisin ve 10 g SDS kullanıldı.

Örnekler, kuyulara yerleştirildikten sonra; 70 voltta 2 saat kadar yürütüldü ve ardından transfer aşamasına geçildi. Transfer işlemi, proteinin ağırlığı büyük olduğundan daha iyi sonuç elde etmek için gece boyu wet blot işlemi uygulandı. Wet blot için hazırlanan 1X'lik 1 litre transfer tamponu için 5.8 g tris, 2.9 g glisin, 0.37 g SDS, 200 ml (%20'lik) methanol kullanıldı ve su ile 1 litreye tamamlandı.

Kullanılan antibadiler ise aşağıda verilmiştir. Primer antibadiler 1/1000 oranında sekonder antibadiler ise 1/ 10,000 oranında kullanıldı.

Çizelge 2. 2 Western blot yönteminde kullanılan primer ve sekonder antitadiler

Primer Antitadiler	Sekonder Antitadiler
STAG 1 H00010274-M01 (1112-1221) Mab Abnova	HRP-Goat Anti Mouse Ig G (H +L) Invitrogen
GAPDH Bethy Labs	HRP Conjugate Rabbit anti-Goat Ig G (H+L) Invitrogen
P53 (S-15) Rabbit Ab Cell Sinalling	HRP – Goat Anti Rabbit IgG Invitrogen
P21 (F-5) sc-6246 mouse monoclonal Ig G ₂ b Santa Cruz	

Wet Blot için:

- Dört parça jel büyüklüğünde Wattman filtre kağıdı ve 1 parça da membran kesildi. Wattman filtre kağıtları transfer tamponun içinde iyice ıslatıldı ve membranda 10 dakika kadar metanol içerisinde yıkandı.
- Transfer aparatı üzerine 1 wattman filtre kağıdı, jel, membran ve diğer 2 watmann filtre kağıdı gelmek üzere sandiviç yapıldı ve bir plastik çubuk üzerinde yuvarlanarak oluşacak hava baloncukları engellenmeye çalışıldı.
- Her bir jele 60 mA olacak şekilde 13 voltta gece boyu transfer yapıldı.

Ertesi Gün:

- Filtre kağıtları ortadan kaldırıldı, membran üzerinde markırın yeri tükenmez kalemle işaretlendi ve bloklama solüsyonunda 1 saat mikser üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Bloklama solüsyonu döküldü ve primer antitadi bloklama solüsyonuyla uygun oranda karıştırılarak eklendi ve 2 saat kadar tekrar oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İki saat sonra, 15 dakika da bir olmak üzere 4 defa TBS-Tween Ph 7,6 ile membran yıkandı.

- Uygun miktarda sekonder antibadi bloklama solüsyonuyla karıştırılarak, yıkanmış membran üzerine eklendi. Bir saat oda sıcaklığında mikser üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Ardından tekrar 15 dakikalık 4 defa TBS-Tween pH 7,6 ile membran yıkandı.

Kullanılan Bloklama Solüsyonu:

50 ml PBS ile 2,5 g süt tozu karıştırılarak % 5'lik bir bloklama solüsyonu kullanılmıştır.

Tespit :

ECL deteksiyon kit reaktifleri 1'e 1 oranında alıp (500 ml + 500 ml yeterli) membran üzerine yayıp 90 dakika bekledikten sonra karanlık odada sonuçlar analiz edildi.

3.2. shRNA Klonlama Sırasında Uygulanan İşlemler

shRNA klonlamada uygulanan işlemler sırasıyla SFFV pGIPZ vektörünün restrüksiyon enzimleri ile kesilmesi, kesilen vektöre CIP uygulaması, shRNA oligonükleotidlerine PCR uygulaması, PCR sonrası shRNA oligonükleotidlerine restrüksiyon enzimlerin uygulanması, ligasyon ve transformasyondur.

3.2.1. SFFV pGIPZ Vektörünün Restrüksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

Plazmid DNA'sı: 1µg

Enzim(ler) : 0,5 µl ECORI, 2 µl XhoI (New English Biolabs)

Tampon: 2 µl NEB Buffer ECORI

BSA: 2 µl BSA

Su: Su ile karışım 20 µl'ye tamamlandı.

37° C'de gece boyu inkübasyona bırakılır. Ertesi gün işlemlere sırasıyla devam edildi.

Ertesi gün:

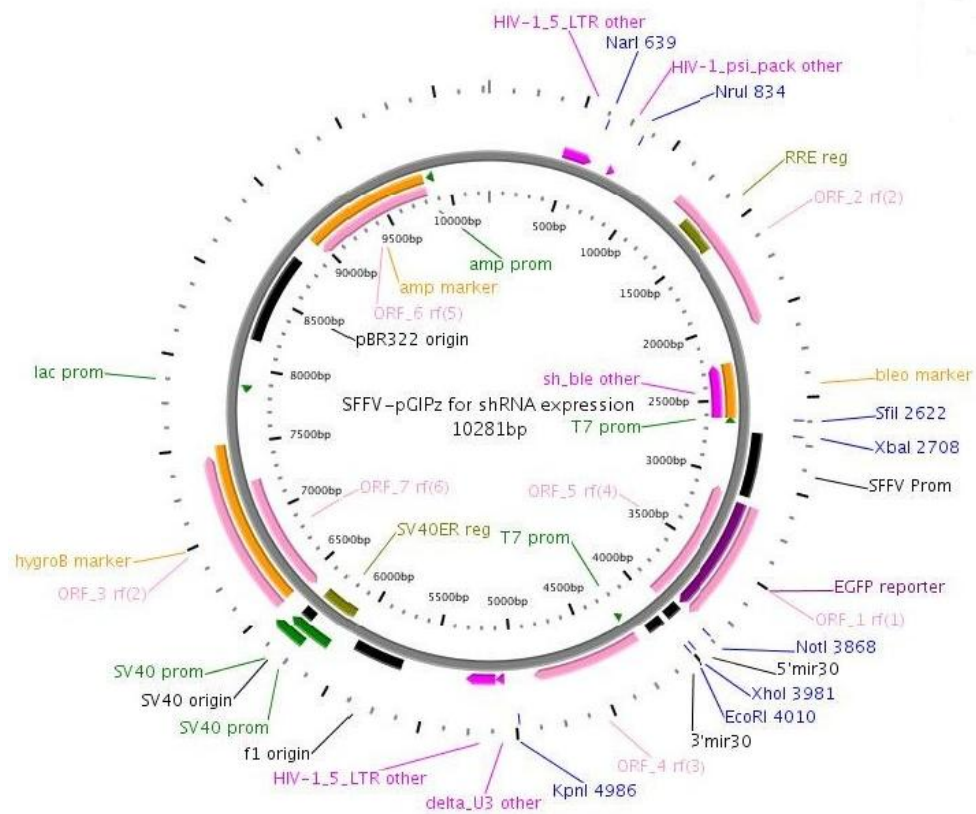
Kullanılan CIP (Alkalin fosfataz) :

1/40 'lik CIP hazırlandı.

Bunun için:

1 µl CIP
4 µl NEB Buffer 3
35 µl Su karışımı yapıldı.

CIP karışımından her bir vektöre 2 µl olmak üzere, restriksiyon enzimleri ile kesim gerçekleştikten sonra vektörler jele yüklenilmeden 15 dakika önce vektör karışımına eklenmiştir. Alkalın fosfataz kullanılması nedeniyle, DNA ya da RNA'nın 5 fosfat grubunun kaldırılmasını katalizleyerek vektörün kendi kendine lige olmasını engellemektedir.



Şekil 2.1:SFFV pGIPZ vektörü

3.2.2. shRNA Oligonükleotidlerine Uygulanan PCR Metodu

PfuTaq PCR :

Pfu Taq polimeraz: 1 µl

HF-Buffer (5x) : 20 µl

10 mM dNTPs: 2 µl

Primer 1(forward) : 10 mM

Primer 2 (reverse) : 10 mM

DMSO: 5 µl

Template: 1/ 50,000 oranında alındı.

dH₂O: karışım 100 µl'ye tamamlandı.

PCR Programı :

94 derece 5 dakika

94 derece 30 saniye

54 derece 30 saniye X 25

75 derece 30 saniye

75 derece 10 dakika

4 derece ∞

Pfu Taq PCR işleminden sonra % 2'lik agaroz jel üzerinde DNA elektroforezi ve ardından da promega kitleri kullanılarak DNA ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

% 2'lik jel elektroforezi :

200 ml TAE

4 gr agaroz

40 µl EtBr

Her bir PCR karışımına 30 µl yükleme tamponu eklendi.

3.2.3. PCR Sonrası Jelden DNA Ekstraksiyonu

Promega kataloğunda yazan protokol dahilinde PCR sonrası jelden DNA ekstraksiyonu yapıldı.

3.2.4. shRNA'ların Restriksiyon Enzimler ile Kesilmesi

shRNA A için:

Kullanılan enzim(ler) : 1 µl ECORI ve 1 µl XhoI

Plazmid DNAsı: 1 µg shRNA A

Tampon: 4 µl NEB Buffer ECORI

BSA: 4 µl BSA

Su: 3 µl

Toplam: 40 µl'ye tamamlandı.

Elektroforez aşamasında karışıma 12 µl yükleme tamponu eklendi.

shRNA B için:

Kullanılan enzim(ler): 0,5 µl ECORI ve 0,5 µl XhoI

Plazmid DNAsı: 1 µg shRNA B

Tampon: 2 µl NEB Buffer ECORI

BSA: 2 µl BSA

Su: 45 µl

Toplam: 100 µl'ye tamamlandı.

shRNA C için:

Kullanılan enzim(ler) : 0,5 µl ECORI ve 0,5 µl XhoI

Plazmid DNAsı: 1 µg shRNA C

Tampon: 2 µl NEB Buffer ECORI

BSA: 2 µl BSA

Su: 64,3 µl

Toplam: 100 µl'ye tamamlandı.

shRNA A, shRNA B ve shRNA C karışımları 37 ° C'de iki saat inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra elektroforez aşamasına geçildi. Elektroforez aşamasında karışıma 30 µl yükleme tamponu eklendi. Yüzde 2'lik jel elektroforezi gerçekleştirildi. Bunun için, 200 ml TAE, 4 g agaroz, ve 40 µl EtBr kullanıldı.

3.2.5. Ligasyon

Ligasyonda kullanılacak shRNA miktarı için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

[Vektör miktarı (ng) x shRNA büyüklüğü (kb)] / vektör büyüklüğü (kb) X [shRNA / vektör]

= shRNA (insert) miktarı

[shRNA (insert) / vektör] oranı 1:1, 1:3, 1:6 olarak tavsiye edilmiştir. cDNA ligasyonunda, vektör ve shRNA'ların (insertin) büyüklüklerini düşünülerek, 1:6 oranı kullanıldı.

Ligasyon İçin Kullanılan Malzemeler ve Miktarları:

Vektör DNA'sı (SFFV pGIPZ) : 100 ng

İnsert DNA'sı: 6 ng (formülden elde edilen değer)

T4 ligaz: 1µl

Ligaz tamponu (10X) : 1 µl

Nükleazdan arındırılmış (Nükleaz-free) su ile karışım 10 µl'ye tamamlandı.

Ligasyon karışımı 4 derecede gece boyu bekletildi. Ertesi gün, transformasyon, minikültür inokülasyonu, minikültür plazmid DNA purifikasyonu ve ligasyonu sağlanmış vektör aynı restriksiyon enzimleri (ECORI ve XhoI) ile aynı protokol çerçevesinde kesilerek test edildi ve klonlama işlemi sona erdirildi. Ardından da maxi kültür inokülasyonu ve maxi prep DNA purifikasyonu ile elde edilen klonlar çoğaltıldı. Transformasyonda elektroporasyon metodu, takip eden işlemlerde gene script mini prep kitleri ve protokolleri, New English Biolabs restriksiyon enzimleri ECORI ve XhoI ile, maxi prep DNA purifikasyonu için de Qiagen kitleri ve protokolleri kullanıldı.

3.2.6. Elektroporasyon Metodu

- Steril elektroporasyon küvetleri (1mm boşluk içeren) buz üzerinde soğumaya bırakıldı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplerine de 950 µl LB ortamı eklendi.
- Elektropotent hücreler -80 dereceden çıkarıldığı için önce sıvı hale gelmesi beklendi ve nazikçe karıştırıldı (optimal olması için 1 µl plazmid DNA'sına 40 µl hücre gereklidir).

- Hücreler DNA karışımına transfer edilir ve elde edilen son karışım da soğumaya bırakılmış elektroporasyon küvetleri içerisine aktarıldı.
- Elektroporasyon küveti dikkatlice yerleştirilir ve 1700 Volt akım verilir hemen küvet sistemden alınır ve içerisine 950 ml öncede hazırladığımız LB ortamı ilave edilerek hücreler tekrar sulandırıldı.
- Hücreler steril bir başka 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve 1 saat 37 derecede 250 rpm'de mikserde inkübe edildi.
- Daha sonra, 5 - 100 µl kadar karışımdan alınarak transformasyon için LB + Ampisilin platelerine aktarılır ve 37° C derecede plateler gece boyu inkübe edildi.

3.3. Mini Kültür İnokülasyonu

Kullanılan Malzemeler: LB ortamı, Ampisilin, Plazmid DNA'sı.

1. Ayrı olacak her bir mini kültür için 4 ml LB ortamı kullanıldı.
2. Kullanılacak toplam LB medyumuna 1/1000 oranında ampisilin eklendi (ampisilin: 20 µg/ml).
3. Platelerde meydana gelmiş olan bakteri kolonilerinden seçim yapılarak her tüpe bir koloni gelmek üzere kültür ortamına ilave edildi.
4. Tüpler 37° C derecede 12-16 saat mikser üzerinde inkübasyona bırakıldı.

3.3.1 Mini Prep Plazmid DNA Purifikasyonu

Gene Script kit katoloğunda yazan protokol dahilinde DNA saflaştırıldı.

3.4. Maksi İnokülasyonu :

1. Bir litrelik deney tüplerine 200 ml LB ortamı ve 1/1000 oranında ampisilin (20 µg/ml) eklendi.
2. Maksi kültür ortamına daha önce elde edilen mini kültürden 2 ml eklendi.
3. 37° C derecede mikser üzerinde 12-16 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.1 Maksi Prep Plazmid DNA Saflaştırılması:

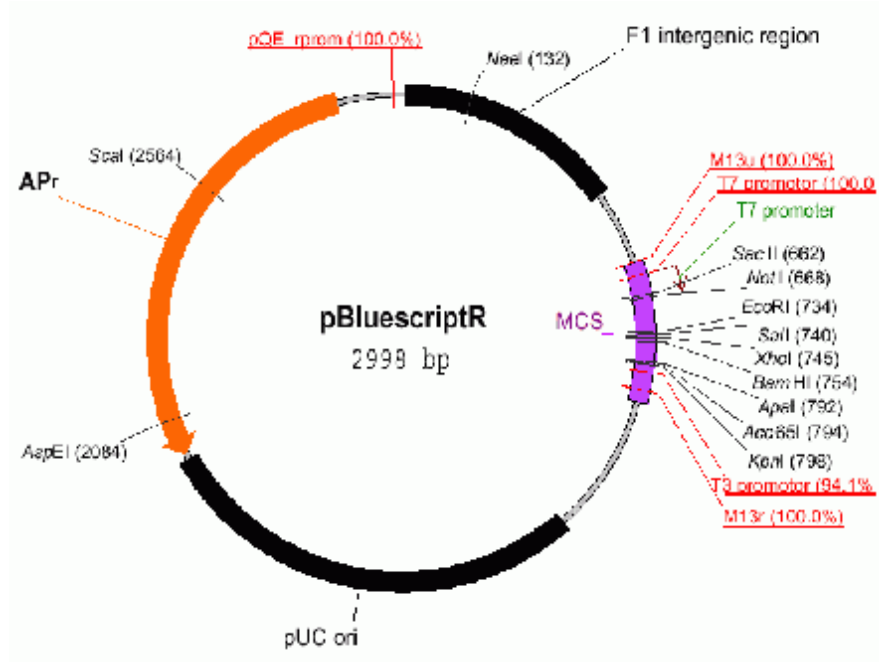
Qiagen maxi kit katoloğunda yazan protokol izlenerek DNA purifikasyonu gerçekleştirilir.

3.5. cDNA'nın Vektöre Klonlanması

cDNA'ya uygulanan işlemler aşağıdaki gibidir:

3.5.1. cDNA'nın Stoktan Alınıp Platenmesi

1. Satın alınan şirket tarafından (Imagenes) E.coli içerisine transforme edilmiş olan PBluescript STAG 1'dan DNA'yı elde edebilmek için LB + ampisilin platein arka yüzü 4 kısma bölündü.
2. Stoktan alınan parça zik zak çizilerek bölünmüş 4 kısma da sürülerek kolonilerin büyümesi için ortam oluşturulmaya çalışıldı.
3. 37 derecede 12-16 saat bekletilerek kolonilerin oluşması sağlandı. Daha sonra, yukarıdaki maksı kültür inokülasyonu ve maksı prep plazmid DNA purifikasyonu protokolü izlendi.



Şekil 2. 2 cDNA Vektörü pBluescript Stag 1

3.5.2. Tam Boy (Full Length) Pbluescript STAG 1'dan cDNA'nın PCR Yöntemi ile Amplifikasyonu Kullanılan primerler

Primer 3 programı ile uygun forward ve reverse primerler oluşturuldu.

STAG 1 Forward :

OLIGO	Start	Length	tm	gc%	any	3' seq
Sol Primer	35	26	59.84	38.46	5.00	3.00

tcagaattaccagtgttacaggattc

1 gcattgtgaaaggacctctccagcaatgattacttcagaattaccagtgttacaggattc
61 aactaatgaaactactgccattccgatgctggcagcgagctt

STAG 1 Reverse :

OLIGO	Start	Length	tm	gc%	any	3' seq
Sağ Primer	45	25	69.19	40.00	6.00	1.00

cttcagacttcagaacataggcatt

1 gaagatgattcaggatttggaaatgcctatgttctgaagtctgaagaaaatttacaattct
61 ggaactctattatt

Herkülaz PCR Metodu:

Herkülaz : 0,5 µl

Herkülaz tamponu (5X) : 10 µl

Primer 1 (10 pmol) : 1 µl

Primer 2 (10 pmol) : 1 µl

DNA (100 ng) : 1 µl

dNTP (2,5 mM for each) : 2 µl

Su : Su ile karışım 50 µl'ye tamamlandı.

Herkülaz PCR siklusları

95 derecede 30 saniye

35 derecede 30 saniye X 35

72 derecede 4 dakika

95 derece 30 saniye

72 derece 10 dakika

4 derece ∞

Herkülaz PCR işleminden sonra % 1'lik agaroz jel üzerinde DNA elektrtorforezi ve ardından da promega kitleri kullanılarak DNA ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Yüzde 1'lik Jel elektroforezinde, 200 ml TAE tamponu, 2 gr agaroz, 40 µl EtBr kullanıldı.

3.5.3. PCR Sonrası DNA Extraksiyonu

Promega kit katoloğunda yazan protokol dahilinde DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

3.5.4. PCR işleminden sonra STAG 1 cDNA'sının XhoI ve NotI Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

Plazmid DNA'sı : 1µg

Enzim(ler) : 1 µl XhoI, 2 µl NotI (New English Biolabs)

Tampon : 2 µl NEB Buffer 3

BSA : 2 µl BSA

Su : Su ile karışım 20 µl'ye tamamlandı.

37° C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

7 µl yükleme tamponu eklenerek elektroforez aşamasına geçildi.

%1'lik elektroforez jeli için:

200 ml TAE

2ml agaroz

40 µl EtBr kullanıldı.

3.5.5. STAG 1 cDNA'sı İçin Kullanılan Vektörlerin (PLVX IRES Mruby, SFLV cDNA EGFP) Restrüksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

PLVX IRES Mruby için Kullanılan Malzemeler:

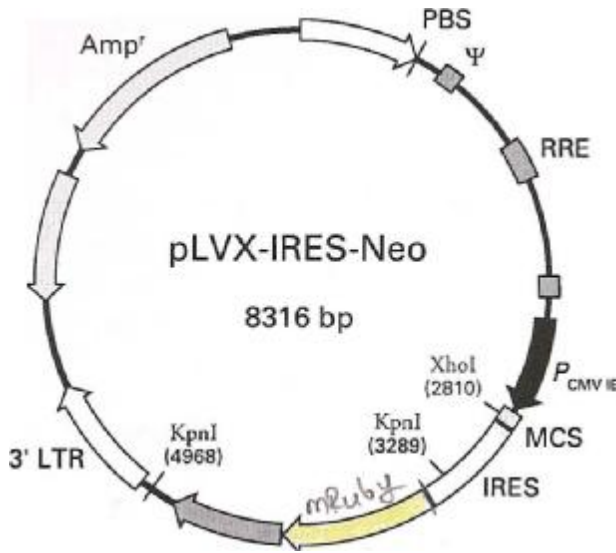
Plazmid DNA'sı : 500 ng

Enzim(ler) : 0,5 µl XhoI, 0,5 µl NotI (New English Biolabs)

Tampon : 2 µl NEB Buffer 3

BSA : 2 µl BSA

Su : Su ile karışım 20 µl'ye tamamlandı. 37° C'de 3 saat inkübasyona bırakılır ve işlemleri sırasıyla devam edilir.



Şekil 2.3 cDNA vektörü PLVX –IRES-mRuby

SFLV cDNA EGFP için Kullanılan Malzemeler:

Plazmid DNA'sı: 1µg

Enzim(ler): 1 µl XhoI, 2 µl NotI (New English Biolabs)

Tampon: 2 µl NEB Buffer 3

BSA: 2 µl BSA

Su: Su ile karışım 20 µl'ye tamamlandı. 37° C'de 3 saat inkübasyona bırakılır ve işlemlere sırasıyla devam edilir.

Kullanılan CIP :

1/40 'lik CIP hazırlandı.

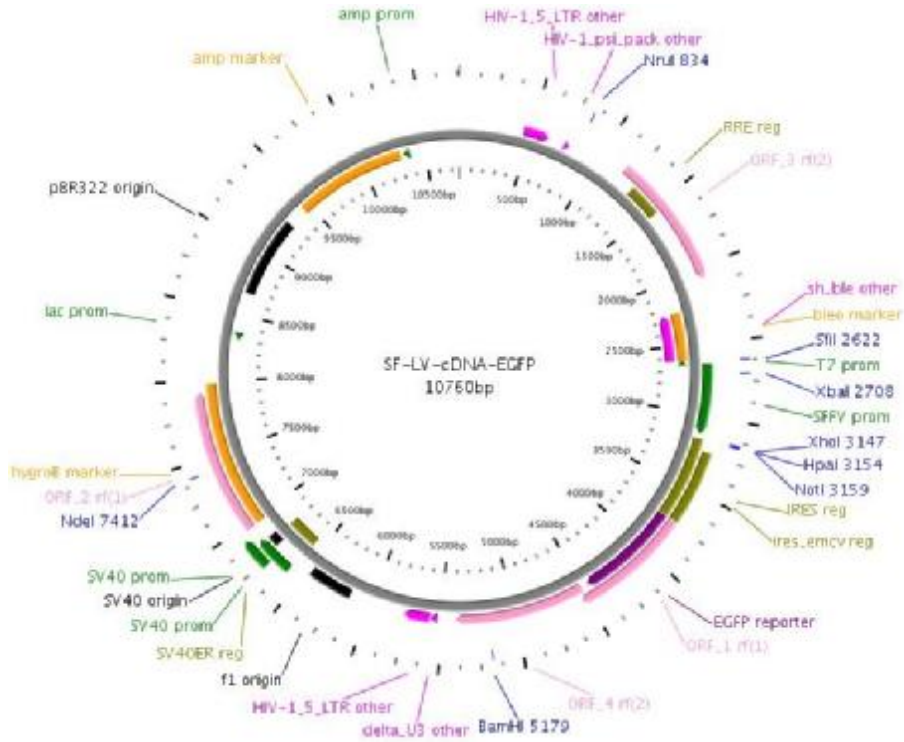
Bunun için:

1 µl CIP

4 µl NEB Buffer 3

35 µl Su karışımı yapıldı.

CIP karışımından her bir vektöre 2 µl olmak üzere, restriksiyon enzimleri ile kesim gerçekleştirildikten sonra vektörler jele yüklenilmeden 15 dakika önce vektör karışımına eklendi. Yüklenecek her 20 µl'lik karışıma 7 µl yükleme tamponu eklendi. Yüzde 0.8 'lik Jel elektroforezinde, 300 µl TAE tamponu, 2.4 g Agaroz, 60 µl EtBr kullanılmıştır.



Şekil 2.4. cDNA Vektörü SFLV cDNA EGFP

Ardından promega PCR Clean Up Kiti ile DNA saflaştırılması gerçekleştirildi. Bunun için kitte yer alan protokol izlendi.

3.5.6.PCR Sonrası DNA Extraksiyonu

Promega kit katoloğundaki protokol izlenerek DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5.7. PLVX IRES mRuby, SFLV cDNA EGFP ile STAG 1 cDNA'sının ligasyonu

Ligasyonda promega kitleri ve protokolü izlendi.

Ligasyonda kullanılacak cDNA (insert) miktarı için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$[\text{Vektör miktarı (ng)} \times \text{cDNA (insert) büyüklüğü(kb)}] / \text{vektör büyüklüğü (kb)} \times [\text{cDNA (insert) / vektör}] = \text{cDNA (insert) miktarı}$$

[cDNA (insert) / vektör] oranı 1:1, 1:3 ve 1:6 olarak tavsiye edilmiştir. cDNA ligasyonunda, vektör ve cDNA'nın (insert)in büyüklükleri düşünülerek, 1:3 oranını kullanıldı.

Ligasyon İçin Kullanılan Malzemeler ve Miktarları:

Vektör DNA'sı (PLVX IRES mRuby) : 100 ng

İnsert DNA'sı: 130.12 ng (formülden elde edilen değer)

T4 ligaz: 1µl

Ligaz tamponu (10X): 1 µl

Nükleazdan arındırılmış su (Nükleaz-free su) : karışım 10 µl'ye tamamlandı.

Vektör DNA'sı (SFLV cDNA EGFP) : 100 ng

İnsert DNA'sı: 100.37 ng (formülden elde edilen değer)

T4 ligaz: 1µl

Ligaz tamponu (10X) : 1 µl

Nükleazdan arındırılmış su (Nükleaz-free su) : Karışım 10 µl'ye tamamlandı.

Ligasyon karışımı 4 derecede gece boyu bekletildi. Ertesi gün, transformasyon, minikültür inokülasyonu, minikültür plazmid DNA purifikasyonu ve restriksiyon enzimleri ile tekrar test deneyi yapılarak klonlama işlemi sona erdirildi. Transformasyonda elektroporasyon metodu, takip eden işlemlerde gene script mini prep kitleri ve New English Biolabs restriksiyon enzimleri kullanıldı.

3.6. Klonlanmış Vektörlerin Lenti X 293 T Hücrelerine Verilerek Transfekte Edilmesi ve Ardından PD:40,5 Genç Fibroblast Hücreleri ile PD:57 yaşlı Fibroblast Hücrelerinin Transdüksiyonu

Tüm klonlamalar bittikten sonra, transfeksiyon ve transdüksiyon aşamalarına geçildi. Transfeksiyon için Lenti X 293 T hücreleri kullanıldı ve insan fibroblast hücreleri transdükte edildi. Transfeksiyon ve bunu takip eden transdüksiyon aşaması kalsiyum fosfat (CaCl₂) kullanılarak aşağıda verilen protokol uygulandı.

Kullanılan vektör karışımı konsantrasyonları:

Çizelge 2. 3 Transfeksiyonda Kullanılan Malzemeler ve Konsantrasyonları

İsim	Konsantrasyonlar
Vektör	10 µg
Gag/pol PCMVΔR89.1	9 µg
VSVG PMD.G	2,3280 µg
2,5 M CaCl ₂	50 µl
Su	Up to 700 µl

3.6.1. Transfeksiyon ve Transdüksiyon Protokolü

1. gün (Transfeksiyon)

Transfekte edilecek Lenti X 293 T hücreleri yeterli yoğunlukta ise (%50-60) ;

- Ortam değişimi yapıldı.
- Vektör karışımı hazırlandı.
- 15 ml'lik falkon tüplerinin içerisine 700 µl HBS eklenir. HBS köpürtülürken damla damla vektör karışımı eklendi. (HBS köpürtülürken 2 ml'lik pipetler kullanılır.)

- 15 dakika beklendi.
- Hazırlanmış olan bu karışım Lenti X 293 T hücrelerinin üzerine damlalar şeklinde gezdirilerek eklendi.
- 10 µl (100X) klorokin eklendi.
- 12-16 saat kadar inkübasyona bırakıldı.

2. gün (Transdüksiyon)

İşlemlere başlamadan önce transfeksiyon verimliliği kontrol edildi (% 90-100).

- 12-16 saat sonrasında ortam değişimi yapıldı.
- 24 saat sonrasında virüs içeren supernatant Lenti X 293 T hücrelerinin ortamından alınır ve hücre artık ve parçalarının neden olabileceği kontaminasyonu önlemek için 0,45 µm'lik filtre ile filtre edildi.
- Hedef hücrelerin (insan fibroblast hücreleri) ortamı boşaltıldı ve ardından filtre edilmiş supernatant hedef hücrelere aktarıldı.
- 8 µg/ml konsantrasyonunda polibren eklendi.
- 12 saat inkübasyona bırakıldı.

3. gün

- 36 saat sonrasında ortam değişimi yapıldı (rejenerasyon).
- 48 saat sonrasında tekrar transdüksiyon tekrarlandı.

4. gün

- Ortam değişimi yapıldı.
- Hücre kültüre alındı.

Transdükte olmuş hücrelerin kültüre alınması için kullanılan malzemeler:

1 plate için:

4ml PBS

2 ml 10X tripsin

18 ml DMEM ortamı

Medyumunda içerisine % 10 FBS ve %1 PS olacak şekilde ilave yapıldı.

3.6.2 Hücre Kültürü Metodu

İnsan fibroblast hücreleri yeterli yoğunlukta ise (%90-100),

- Plaketeki hücrelerin öncelikle ortamı atıldı, sonra 4 ml PBS ile yıkandı.
- PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml 10X tripsin eklendi ve en fazla 5 dakika beklendi.
- 5 dakikanın ardından hücreler mikroskop altında kontrol edildi.
- Eğer hücreler platein tabanından ayrılmışlarsa hemen üzerine 8 ml yeni ortam eklendi.
- Karışım pipet yardımı ile falkon tüplerine alındı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Hücreler pellet halinde görüldükten sonra tripsinli ortam uzaklaştırıldı ve 10 ml yeni ortam eklendi.
- 15 defa pipetleme yaparak hücrelerin ortamda, plate içerisinde düzenli dağılması sağlandı.

3.6.3. Kültüre Alınmış Hücrelerin Toplanması ve STAG 1 Protein

Ekspresyonunun incelenmesi

Transdükte olduktan sonra kültüre alınan hücrelerden yeteri kadar elde edildikten sonra yoğunluğa ulaşmış hücreler (%100), protein analizi için toplandı.

Platelerden hücreleri toplayabilmek için;

Öncelikle hücreler 4 ml MiliQ su ile yıkandı. Daha sonra 500 µl Laumini tamponu ve 1 M DDT eklenerek hücreler toplanır ve eşit miktarda ependorf tüplerine kondu, protein analizi için hazır hale getirildi. Hücrelerden protein analizi için Western blot tekniğine başvurulur. Bu, çok aşamalı bir teknik olup aşağıdaki sıra takip edilerek yapıldı.

Akrilamid Jel Elektroforezi İçin Jel Hazırlanışı:

Jel yoğunluğu analiz edilmek istenen proteinin ağırlığına göre değişiklik göstermektedir.

Yüzde 8 lik yükleme jeli için :

Çizelge 2.4 Ayırıcı ve Paketleyici Jel Solüsyonu İçin Kullanılan Malzemeler ve Miktarları

	Ayırıcı jel solüsyonu hazırlanması	Paketleyici jel solüsyonunun hazırlanması
Su	4.6 ml	3.4 ml
%30'luk akrilamit karşıtı	2.7 ml	0.83 ml
1.5 M Tris (ph:8.8)	2.5 ml	0.63 ml
%10 SDS	0.1 ml	0.5 ml
%10'luk APS	0.1 ml	0.5 ml
TEMED	0.006 ml	0.005 ml

Elektroforez çemberi için (Running Buffer) :

Bir litre 1X SDS Tamponu kullanıldı.

Bunun için, 10X lik SDS tampon stokları hazırlandı.

Bir litre 10X'lik SDS tamponu için 30.3 g Tris, 144 g Glisin, 10 g SDS kullanıldı.

Örnekler kuyulara yerleştirildikten sonra, 70 voltta 2 saat kadar yürütüldü ve ardından transfer aşamasına geçildi. Transfer işleminde proteinimizin ağırlığı büyük olduğundan daha iyi sonuç elde etmek için Wet blot işlemi gece boyu uygulandı.

Wet Blotta Kullanılan Transfer Tamponun Hazırlanışı:

1X'lik 1 litre transfer tamponu için 5.8g tris, 2.9 glisin, 0.37g SDS, 200ml %20'lik metanol kullanıldı ve su ile de 1 litreye tamamlandı.

Wet blot için:

- Dört parça jel büyüklüğünde wattman filtre kağıdı ve 1 parça da membran kesildi. Wattman filtre kağıtları transfer tamponun içinde iyice ıslatıldı ve membranda 10 dakika kadar methanol içerisinde yıkandı.
- Transfer aparatı üzerine 1 wattman filtre kağıdı, jel, membran ve diğer 2 wattman filtre kağıdı gelmek üzere sandiviç yapıldı ve oluşacak hava baloncuklarını engellemek için silindirik bir çubuk ile üzerinden geçildi.
- Her bir jele 60 mA olacak şekilde 13 voltta gece boyu transfer yapıldı.

Ertesi gün:

- Filtre kağıtları ortadan kaldırıldı, membran üzerinde markırın yeri tükenmez kalemle işaretlendi ve bloklama solüsyonunda 1 saat mikser üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Bloklama solüsyonu döküldü ve primer antibadi bloklama solüsyonuyla uygun oranda karıştırılarak eklendi ve 2 saat kadar tekrar oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Saat sonrasında 15 dk da bir olmak üzere 4 defa TBS-Tween Ph 7,6 ile membran yıkandı.
- Uygun miktarda sekonder antibadi bloklama solüsyonuyla karıştırılarak, yıkanmış membran üzerine eklendi. Bir saat oda sıcaklığında mikser üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Ardından tekrar 15 dakika 4 defa TBS-Tween pH 7,6 ile membran yıkandı.

Kullanılan Bloklama Solüsyonu :

50 ml PBS ile 2,5 g süt tozu karıştırılarak % 5'lik bir bloklama solüsyonu kullanıldı.

Kullanılan Primer ve Sekonder Antibadi Konsantrasyonu :

%1000'lik primer antibadi ve 1/10,000'lik sekonder antibadi, sekonder antibadiler HRP'li olup detectionı için ECL tespit kiti kullanıldı.

TESPİT:

ECL tespit kiti reaktiflerinden 1'e 1 oranında alıp (500ml + 500ml yeterli) membran üzerine yayıp 90 dakika bekledikten sonra karanlık odada sonuçlar analiz edildi.

3.7. Hastalardan Alınan HCC'li ve Sağlıklı Karaciğer Dokularından Alınan Doku Kesitlerinin İmmunofloresan Metodu ile Boyanması ve STAG 1 Protein Expresyonunun İncelenmesi

Hastalardan alınmış HCC'li ve sağlıklı karaciğerler dokuları üzerinde de antifloresan tekniği ile boyama yapılarak STAG 1 proteininin ekspresyonu incelendi.

3.7.1. İmmunofloresan Boyama Protokolü

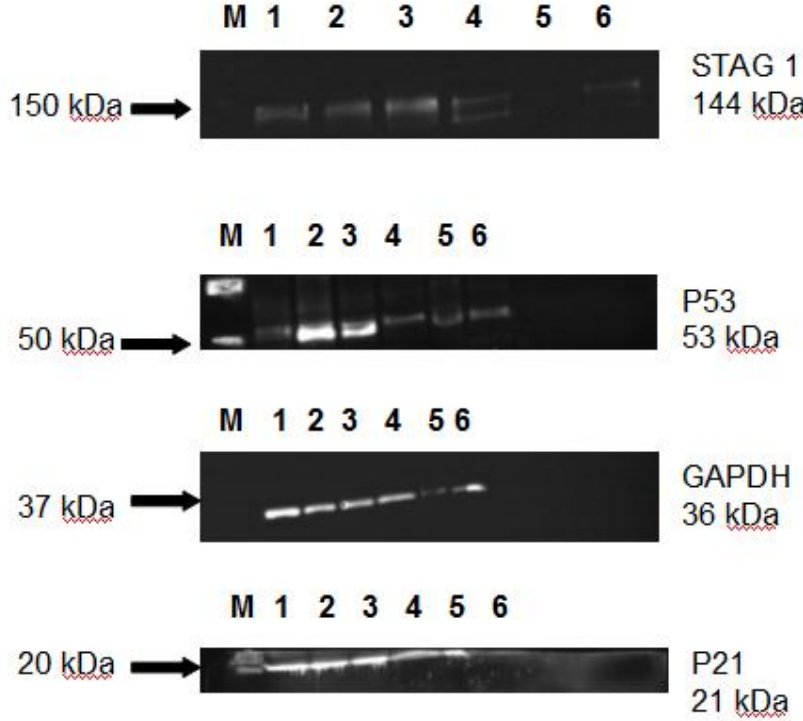
Parafin dokudan alınmış kesitler :

1. Xylen'de 3X5 dakika
2. %100'lük etanolde 5 dakika
3. %90'lık etanolde 5 dakika
4. %70'lik etanolde 5 dakika bekletildi.
5. Daha sonra 2X5 dakika PBS banyosuna alındı.
6. PBS banyosundan sonra Düdüklü tencere içerisine 1,6 litre su ve 15ml Vektor Unmasking Solüsyonu eklendi ve örnekler bu karışımın içerisine konuldu. Solüsyon kaynayana kadar düdüklünün ağzı kapanmaz. Kaynama başladığı andan itibaren düdüklünün ağzı sıkıca kapatılır ve 5 dakika beklendi.
7. 5 Dakikalık bekleme süresi sonunda düdüklünün önce havası alınır ve ardından yavaşça kapağı açıldı.
8. Kapak açıldıktan sonra hemen kesit örnekleri musluk suyunda yıkanır ve 2X5 PBS banyosu yaptırıldı.
9. Birincil antikor (STAG 1) 1/1000 oranında PBS ile hazırlandı ve örnekler üzerine 100 µl kadar uygulandı. Örnekler, nemli çember içerisinde bir sonraki güne kadar 4 derecede ertesi güne kadar bekletildi.
10. Ertesi gün örnekler en az 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. 3X5 PBS banyosu yaptırıldı.
12. İkincil antikor 1/2000 oranında (anti Mouse cy3) PBS içerisinde hazırlandı. Cy3 olduğu için ışığa karşı duyarlıdır ve ependorf tüpünün dış kısmı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kapatıldı. Örnekler üzerine uygulandı ve 2 saat nemli çember içerisinde oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
13. İnkübasyon sonrasında 2X5 PBS banyosu yaptırıldı.
14. Yüzde 100'lük, %90'lık, %70'lik etanolde sırasıyla 3'er dakika örnekler bekletildi ve ardından ortamdaki hava ile kuruması sağlandı.
15. Kurumuş örneklerin üzeri DAPI medyumunu ile kapatılır.

4. BULGULAR

4.1. Stag 1 Proteininin Fibroblast Hücrelerindeki Salınımı

STAG 1'in fonksiyonunun öğrenileceği çalışmalardan önce STAG 1'in normal ve gamma irradyasyonuna maruz kalmış hücrelerde olan ifadesini incelemek için, genç ve yaşlı fibroblast hücrelerden gamma irradyasyonuna maruz bırakılmış ve bırakılmamış olmak üzere iki grup oluşturuldu. Ardından bu hücreler toplanarak p53, p21, STAG 1 protein salınımı western blot yöntemi ile incelendi. İncelemelerde, Stag1 ve p21 salınımında radyasyona maruz bırakılmış yaşlı ve genç hücreler arasında değişiklik görülmedi. P53 ise irradyasyona uğramış hücreler arasında bir karşılaştırma yapıldığında genç hücrelerde p53 salınımının yaşlı hücelere göre çok daha fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.1: İnsan fibroblast hücrelerindeki STAG1, P53, GAPDH ve P21 ekspresyonları. Gamma irradyasyonuna maruz bırakılmış pd:37 genç ve pd:53,5 yaşlı fibroblast hücrelerine uygulanan western blott tekniği sonrasında STAG 1, p53, p21 salınımları incelendi. Bu incelemelerde housekeeping gen olarak gapdh tercih edildi. Örnek sıralaması: M: Markır, 1) PD:37 gamma irradyasyonuna maruz bırakılmamış, 2) PD:37 üç saat gamma irradyasyonuna maruz bırakılmış, 3) PD:37 altı saat gamma irradyasyonuna maruz bırakılmış, 4) PD:53,5 gamma irradyasyonuna maruz bırakılmamış, 5) PD:53,5 üç saat gamma irradyasyonuna maruz bırakılmış, 6) PD:53,5 altı saat gamma irradyasyonuna maruz bırakılmıştır.

Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi genç PD: 37 ve yaşlı PD: 53,5 fibroblast hücrelerinde kontrol ile bir karşılaştıma yapıldığında temel düzeyde STAG 1 salınımında önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi. Ancak genç ve yaşlı hücrelerdeki P53 salınımına bakıldığında genç hücrelerdeki p53 salınımının yaşlı hücrelerdekine oranla çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. GAPDH ise protein seviyelerinin eşit olup olmadığını kontrol edip doğru kıyaslama yapabilmek için yükleme kontrolü olarak alındı.

4.2. shRNA ve cDNA Oligonükleotidlerinin Lenti Viral Vektörlere Klonlanması

Sonuçları

Genin fonksiyonunu belirlemek için çalışmalarda öncelikle shRNA oligonükleotidleri lenti viral vektörlere klonlanarak genin baskılanması sağlandı. Bilindiği gibi bir genin baskılanması, gene ya da onun mRNA transkriptine komplementer dizi olan kısa bir DNA ya da RNA (oligonükleotid) gibi bir reaktif kullanılarak genin ekspresyonunun susturulması anlamına gelir. Bu çalışmada 3 farklı shRNA oligonükleotidi kullanılarak baskılama deneyleri yapıldı. Bu sayede STAG 1'in baskılandığı durumlarda hücrelerde ne gibi değişimlerin söz konusu olduğu incelenmek istendi.

Aşırı ifade deneylerinde pBluescript vektörüne klonlanmış olan cDNA, satın alınan şirketten tam boy DNA olarak alındığı için ve dizisinde dur kodonu taşıdığından dolayı önce cDNA'nın transkripsiyonu sağlanamadı ve başarılı klonlama gerçekleştirilemedi. Bu problemi çözmek için, tam boy DNA'nın cDNA dizisi PCR yöntemi ile çoğaltıldı ve yalnızca bu kısmın vektöre klonlanması gerçekleştirildi.

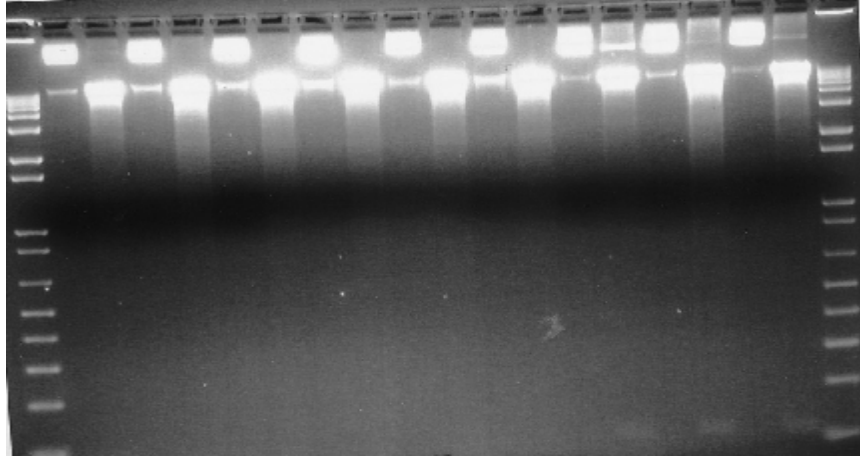


Şekil 3.2. PCR metoduyla pBluescript vektöründen izole edilmiş STAG 1 cDNA (3.6 kb)



Sonuç 3.3 Sırasıyla 1.,2, ve 3. örnekler shRNA A, 4.,5.,6. örnekler shRNA B, 7., 8., 9. örnekler shRNA C oligonükleotidlerinin PCR amplifikasyonu sonrası görüntüsü (110 bp)

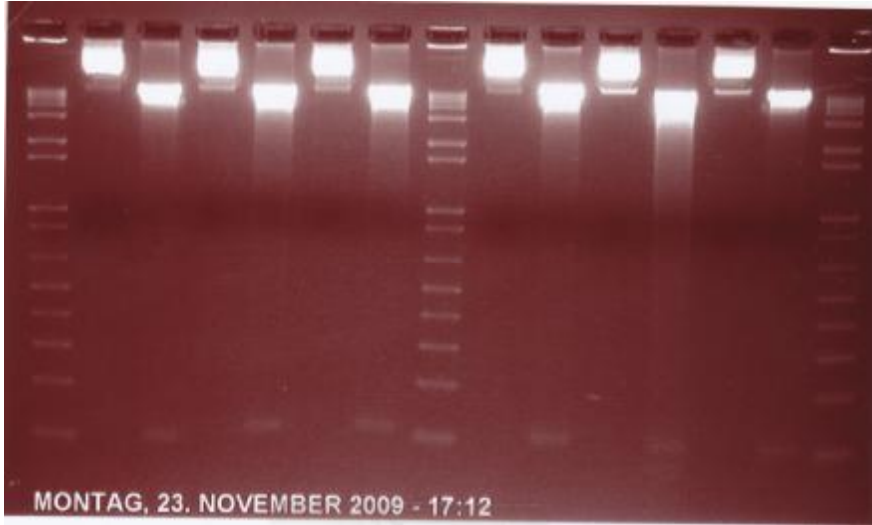
M K1 k1 K2 k2 K3 k3 K4 k4 K5 k5 K6 k6 K7k7 K8 k8 K9 k9 M



Şekil 3.4 SFFV pGIPZ shRNA A klonları. Deneyde bir başta markır (M), kontrol grubu (K1,K2,K3,K4,K5,K6,K7,K8,K9), örnekler (k1,k2,k3,k4,k5,k6,k7,k8,k9) ve son kuyucuğa yine markır (M) olmak üzere jele yükleme yapılmıştır.

Elde edilen sonuçta shRNA A'nın klonlandığı vektör SFFV pGIPZ 10 kb civarında, shRNA ise 100 bp büyüklüğünde gözlenmiştir ve başarılı klonlara k7, k8 ve k9 örneklerinde ulaşılmıştır.

M K1 k1 K2 k2 K3 k3 M K1 k1 K2 k2 K3 k3 M

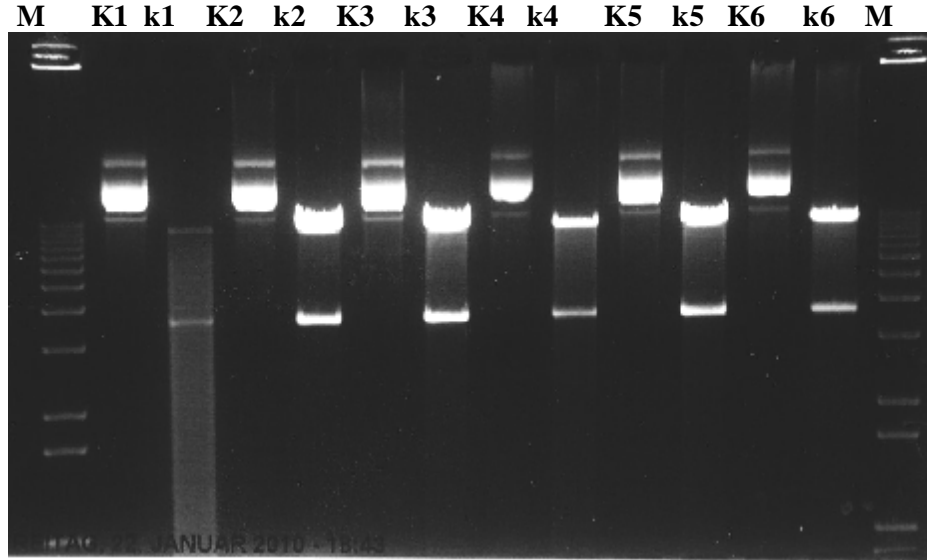


Şekil 3.5 SFFV pGIPZ shRNA B ve SFFV pGIPZ shRNA C klonları. Burada da sırasıyla markır (M), kontrol grubu (K1,K2,K3), SFFV pGIPZ shRNA B örnekleri (k1, k2, k3), 3. örnekten sonra tekrar markır (M), kontrol grubu (K1,K2,K3), SFFV pGIPZ shRNA C örnekleri (k1,k2,k3), son kuyucuğa markır (M) olmak üzere jele yükleme yapılmış ve başarılı klonlarda 10 kb üzeride SFFV pGIPZ vektörü (10281 bp) ve 100 bp üzerinde de shRNA B (110 bp) ve shRNA C (110 bp) gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçta shRNA A'nın klonlandığı vektör SFFV pGIPZ 10 kb civarında, shRNA ise 100 bp büyüklüğünde gözlenmiştir.

Genin baskılandığı durumların yanı sıra genin çok fazla durumlar da hücrede hangi sinyallere daha fazla yanıt verileceği incelenmek istenmiş ve bunun için de cDNA oligonükleotidi lenti viral vektörlere klonlanmak üzere kullanılmıştır.

cDNA klonlama deneylerinde yalnızca klonlanacak bölüm (insert) ile değil vektörle de problem yaşanmıştır. cDNA'nın ilk klonlanmak istendiği vektör PLVX IRES mRuby vektörünün IRES kısmında olan bir problemden dolayı vektör değiştirilmiştir. Bilindiği gibi IRES (Internal Ribosomal Entry Site), translasyonun başlamasına izin veren ve protein sentezinin olmasını sağlayan bölgedir. PLVX IRES mRuby yerine SFLV cDNA EGFP lenti viral vektörü ile çalışmalara devam edilmiştir.



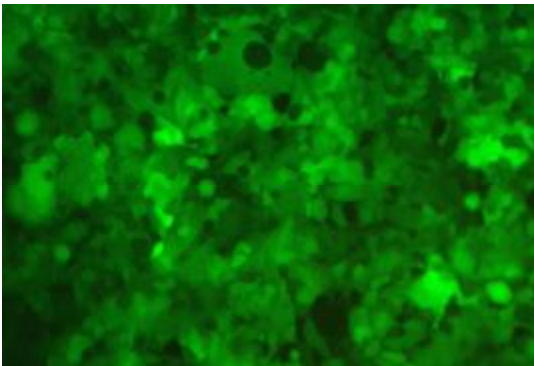
Şekil 3.6 SFLV cDNA EGFP STAG 1 klonları. Jel üzerine de başta ve sonda markır (M) olmak üzere, sırasıyla kontrol grubu (K1, K2, K3, K4, K5, K6) ve ardından örnekler (k1, k2, k3, k4, k5, k6) olmak üzere yükleme yapılmış ve tüm örneklerde başarılı sonuç alınmıştır. Görüldüğü üzere SFLV cDNA EGFP STAG 1 vektörü (1076 bp) 10 kb'nin üzerinde, insert cDNA STAG 1 (3,6 KB) ise 3-4 kb arasında, 4 kb'ye biraz daha yakın olarak gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçta shRNA A'nın klonlandığı vektör SFFV pGIPZ 10 kb civarında, cDNA ise 3.6 kb büyüklüğünde gözlenmiştir

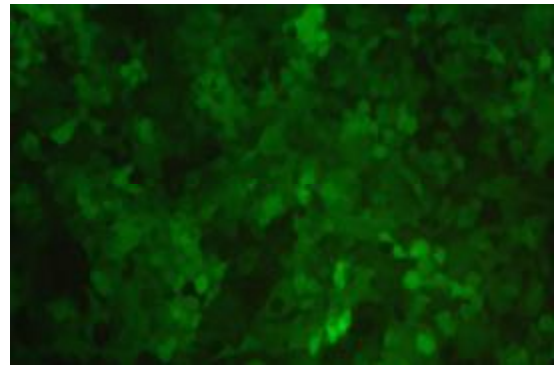
4.3. Klonlanmış Vektörlerin Lenti X 293 T Hücrelerine Verilerek Transfekte Edilmesi ve Ardından PD: 40,5 Genç Fibroblast Hücreleri ile PD: 57 Yaşlı Fibroblast Hücrelerinin Transdüksiyonu

Başarılı shRNA ve cDNA klonlama çalışmalarından sonra boş vektör kontrol grubu olarak alınarak, klonlanmış vektörler ile Lenti X 293 T hücreleri transfekte edilmiştir. Lenti X 293 T hücre hattı yüksek transfekte olma yeteneğine sahip ve viral proteinlerin ekspresyonunu destekleyen bir hücre hattı tipidir. Lenti X 293 T hücrelerinin klonlanmış vektörlerle transfekte olabilmeleri için de virüs üretimini sağlamak amacıyla, Gag / Pol PCMVΔR89.1 ve VSVG PMD.G proteinleri kullanılmıştır. Gag/pol virüs DNA ya da RNA'sının ekspresyonunu düzenleyici bir element olup, VSVG'de virüse ev sahipliği yapan Lenti X 293 T hücrelerine tutunmasında aracılık eden ve viral girişi sağlayan bir proteindir.

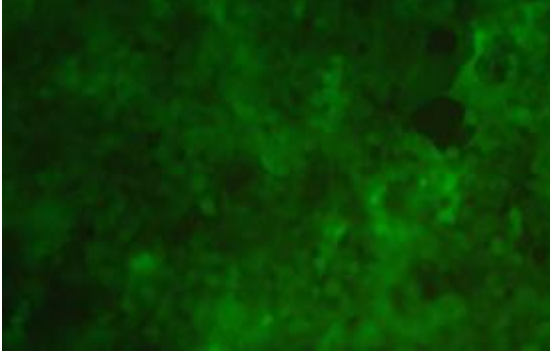
Lenti X 293 T hücrelerinde yüksek transfeksiyon verimliliği GFP (green fluorescent protein) sayesinde belirlenebilmiştir. GFP transfeksiyonun bir göstergesidir. Transfekte edilmiş hücreler mavi ışığa maruz bırakıldığında yeşil floresan ışığı saçan bir proteindir. Transfeksiyon verimliliği de GFP ekspresyonu ile kontrol edildi.



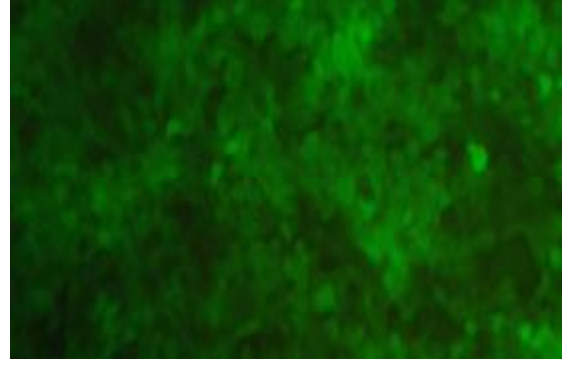
Lenti X SFFV pGipz Empty shRNA A



Lenti X SFFV Pgipz shRNA A



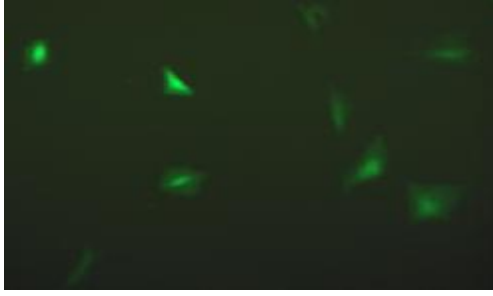
Lenti X SFFV Pgipz shRNA B



Lenti X SFFV Pgipz shRNA C

Şekil 3.7 Yüzde 100 Transfeksiyona Uğramış Lenti X 293 T Hücreleri

Transfeksiyonda; %100 GFP ekspresyonu görülen Lenti X 293 T hücrelerinden supernatant alınarak yaşlı PD: 57 ve genç PD: 40,5 fibroblast hücreleri transdükte edildi. Ancak, transdükte olduktan sonra kültüre alınan hücrelerin 2 gün sonra ölmeye başladığı gözlemlendi. Deney, transfekte edilmiş hücrelerden alınan supernatantın virüs konsantrasyonu azaltılarak fibroblast hücreleri üzerinde tekrarlandı. Supernatantın konsantrasyonu yarıya indirildiği halde fibroblast hücreleri halen öldüğü için bu olayın teknik bir sorun olup olmadığını araştırmak üzere p53'ü olmayan Large T hücreleri üzerinde transdüksiyon denemesi yapıldı. Bu hücrelerde deney sonucunda hücrelerde ölüm gözlemlenmedi. Buradan deneylerde teknik bir sorun olmadığı üretilen virüsün çok etkin olduğu anlaşıldı



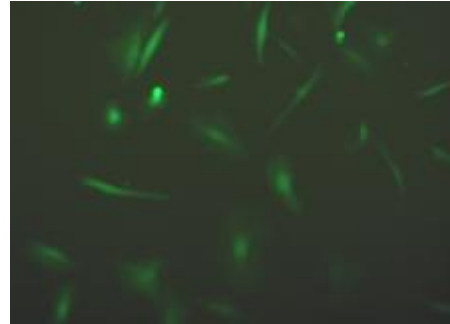
SFFV pGIPZ EMPTY (BJ pd:72,5)



SFFV pGIPZ shRNA A (BJ pd:72,5)



SFFV pGIPZ shRNA B (BJ pd:72,5)



SFFV pGIPZ shRNA C (BJ pd:72,5)



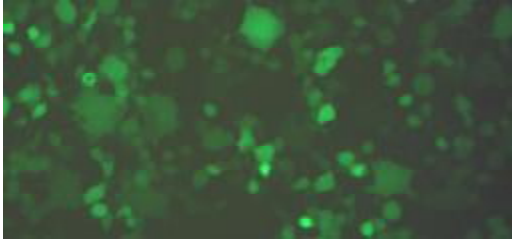
SFLV Cdna EGFP STAG1 (BJ pd:74,5)

Şekil 3.8 Transdükte Edilmiş Fibroblast Large T Hücreleri

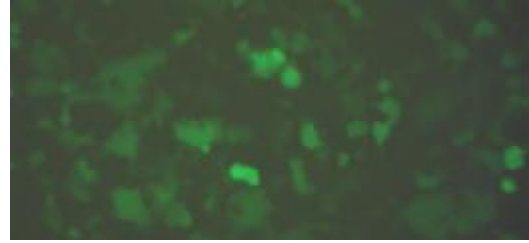
Transdükte olmuş hücreler kültüre alındı. Ancak kültürdeki SFLV cDNA EGFP ile transdükte olmuş hücrelerin GFP ekspresyonunu mikroskop altında gözlenemedi. Klonlanan cDNA 3,6 kb olduğundan ekspresyonunu mikroskop altında gözlemeleyebilmek için zamana ihtiyaç olduğu anlaşıldı. P53'süz hücreler üzerinde yapılan transdüksiyon çalışmaların ardından kültüre alınan bu hücrelerde SFLV cDNA EGFP ile transdükte edilmiş hücrelerde ancak 2 ay sonunda GFP ekspresyonu

gözlemlendi. Ancak, daha sonra yapılan western blot deneylerinde GFP ekspresyonu gözlemlenilmese de başarılı transdüksiyonun gerçekleştiği anlaşılmıştır.

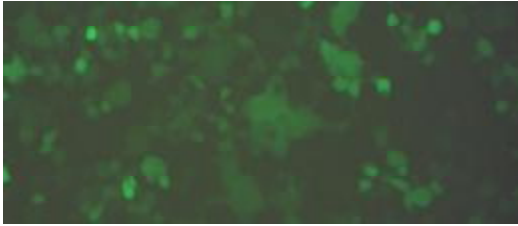
Bu kez yarıya indirilmiş virüs konsantrasyonunun yanı sıra transfeksiyonun inkübasyon süresi de azaltılarak çalışmalar yapıldı. Önce transfeksiyon süresi 6 saate indirildi yine hücrelerde ölüm gözlemlendi, süre 4 saate kadar indirildi ve 4 saatlik inkübasyon ile başarılı sonuca ulaşıldı.



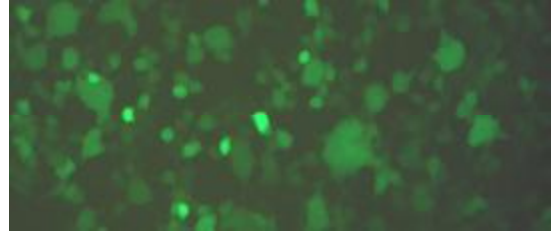
LENTİ X SFFV pGIPZ EMPTY



LENTİ X SFFV pGIPZ shRNA A



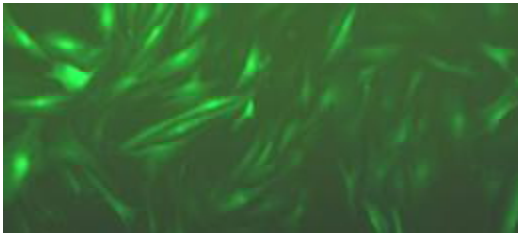
LENTİ X SFFV pGIPZ shRNA B



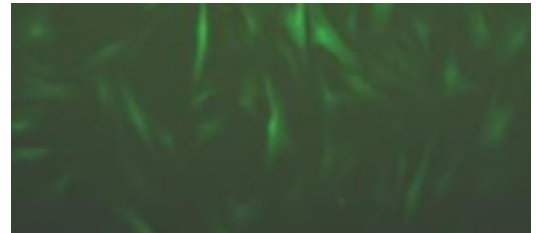
LENTİ X SFFV pGIPZ shRNA C

Şekil 3.9 Tekrar Transfekte Edilmiş Lenti X 293 T Hücreleri

Lenti X 293 hücrelerinde % 100 GFP ekspresyonu gözlenmemiştir ancak elde edilen süpernatant fibroblast hücrelerini transdükte etmekte başarılı olmuş ve fibroblast hücreleri yaşamaya devam etmişlerdir.



BJ pd: 40,5 SFFV pGIPZ EMPTY



BJ pd: 40,5 SFFV PGIPZ shRNA A

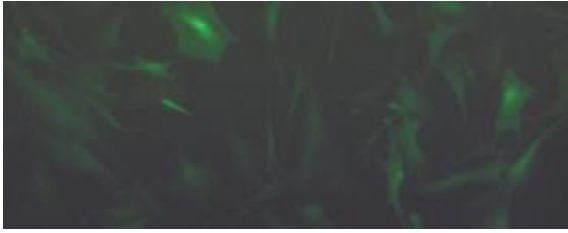


BJ pd: 40.5 SFFV pGIPZ shRNA B

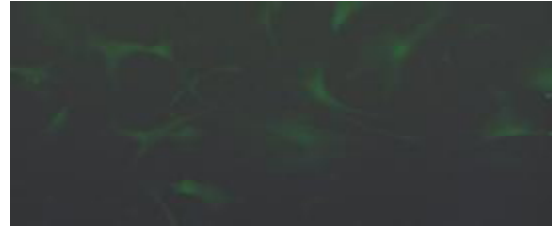


BJ pd: 40,5 SFFV pGIPZ shRNA C

Şekil 3.10 Transdükte Olmuş Genç İnsan Fibroblast Hücreleri PD: 40,5



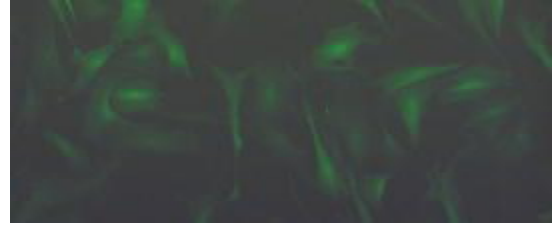
BJ pd: 57 SFFV Pgipz EMPTY



BJ pd: 57 SFFV Pgipz shRNA A



BJ pd: 57 SFFV pGIPZ shRNA B



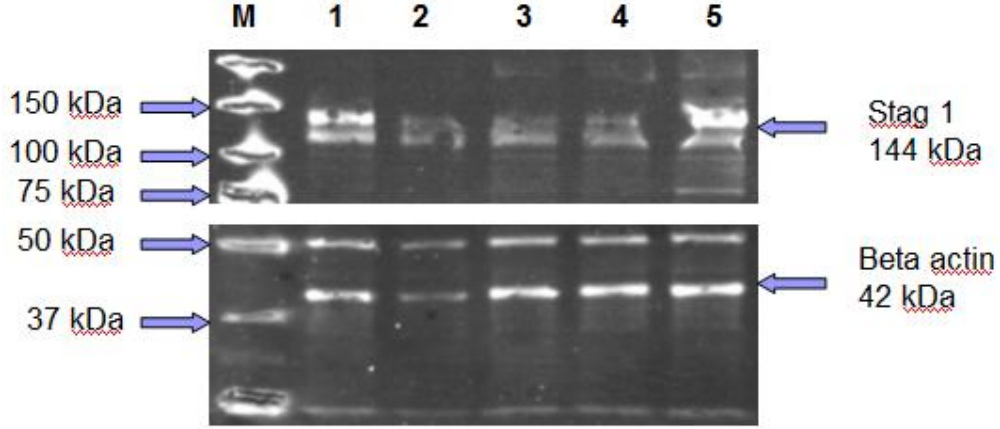
BJ pd: 57 SFFV pGIPZ shRNA C

Şekil 3.11 Transdükte Olmuş Yaşlı İnsan Fibroblast Hücreleri PD:57

4.4. Kültüre alınmış hücrelerin toplanması ve STAG 1 protein ekspresyonunun incelenmesi

Kültürdeki bu hücreler platerlerde belirli bir sayıya ulaştıktan sonra %100 yoğun olan platerler alındı ve hücreler toplanarak STAG1'in protein ekspresyonu incelenerek baskılama ve aşırı ifadede başarıya ulaşıp ulaşılmadığı incelendi. Yaşlı hücrelerde başarılı sonuç elde edildi. Genç hücrelerde ise teknik problemlerden dolayı

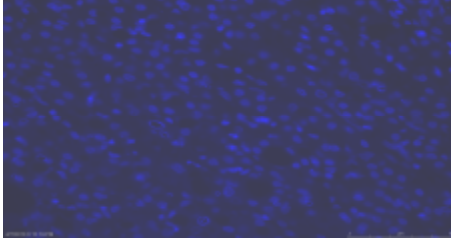
karşılaştırmada güçlük çekildiğinden objektif bir sonuç elde edilmesi için deneyin tekrarlanmasına karar verildi ve hücrelerin kültürüne devam edildi.



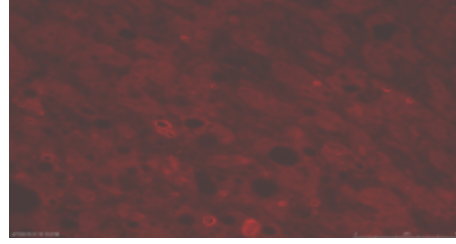
Şekil 3.12 Fibroblast PD: 57 STAG 1 ve beta aktin ekspresyonları. Western blott sonucunda, üstteki membranda sırasıyla: M: markır, 1) kontrol grubu boş vektör, 2) SFFV pGIPZ shRNA A, 3) SFFV pGIPZ shRNA B, 4) SFFV pGIPZ shRNA C, 5) SFVLV cDNA EGFP STAG 1 örneklerinde STAG 1 ekspresyonları, alttaki membranda ise house keeping gen olarak kullanılan beta aktinin ekspresyonları gözlenmektedir.

Şekil 3.12’de kontrol örneği diğer örneklerle mukayese edildiğinde 3. ve 4. örneklerde hücrelerdeki STAG 1 ekspresyonları daha düşük seviye de 5. örnekte ise daha fazla ifade edilmiş olarak gözlendi. Beta aktin bu deneyde yükleme kontrolü olarak alınmıştır.

4.5. HCC'li Hastalar ve Sağlıklı İnsanların Karaciğer Dokularından Alman Kesitlerinin İmmüno Floresan Antibadi Boyama Metodu ile Boyanması ve STAG 1 Protein Salımının İncelenmesi Sonuçları



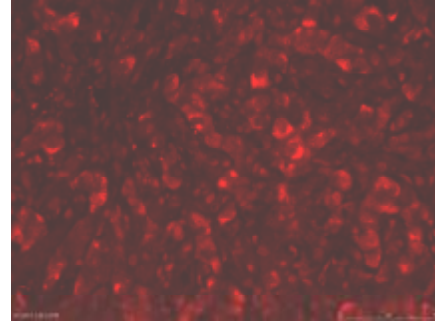
Nr. 15 HCC Dapi



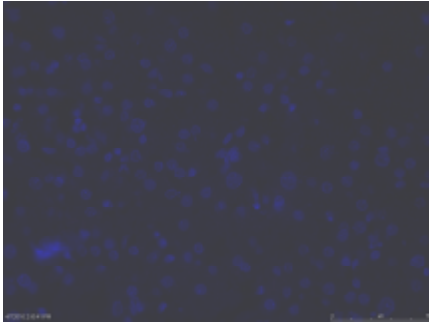
Nr.15 HCC Stag 1



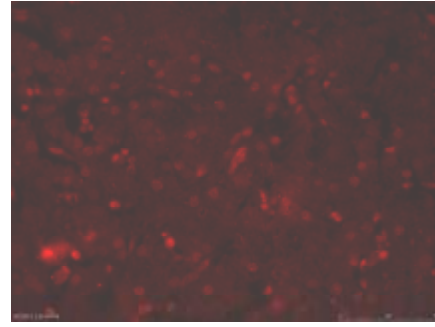
Nr. 25 HCC Dapi



Nr. 25 HCC STAG 1



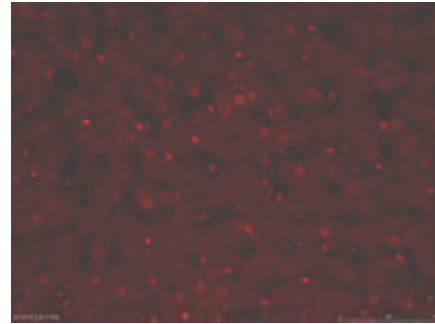
Nr. 26 HCC Dapi



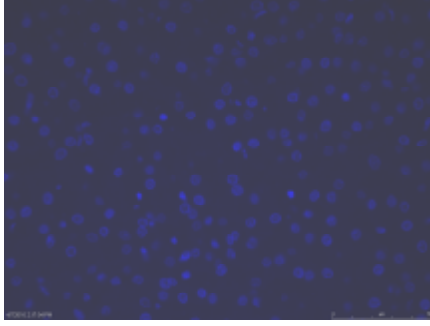
Nr. 26 HCC STAG 1



Nr. 2 Karaciğer Dapi



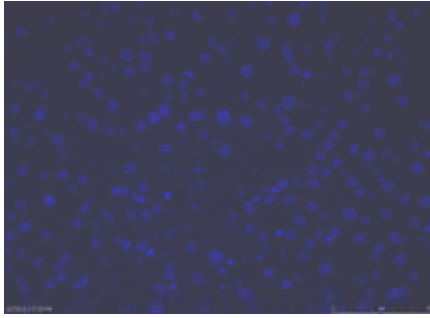
Nr. 2 Karaciğer STAG 1



Nr. 14 Karaciğer Dapi



Nr. 14 Karaciğer STAG 1



Nr. 16 Karaciğer Dapi



Nr. 16 Karaciğer STAG 1

Şekil 3.13 HCC'li ve Sağlıklı Karaciğer Doku Örnekleri Üzerine Yapılan İmmüno Floresan Boyama Sonucunda DAPI ve STAG 1 Salınımı

Şekil 3.13'te sağlıklı insanlar ve HCC'li hastalardan alınan parafine yatırılmış dokular üzerinde yapılan immüno floresan deneyi sonucunu STAG 1 salınımını göstermektedir. Dapi boyaması bir çekirdek boyaması olup hücrelerdeki çekirdeği göstermektedir. Stag 1 boyaması ise STAG 1 salınımını göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre kimi sağlıklı ve HCC'li hastalardan alınan doku örneklerinde STAG 1 salınımı gözlenirken kimisinde gözlenmedi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, STAG 1 geninin hücre proliferasyonu, transformasyon ve DNA hasar yanıtlarındaki fonksiyonu belirlenmek istenmiştir.

STAG 1'in fonksiyonunu öğreneceğimiz çalışmalardan önce STAG 1'in normal ve gamma irradyasyona maruz kalmış hücrelerdeki salınımı incelendiğinde yaşlı hücrelerin p53 fonksiyonunun, genç hücelere göre daha kolay kaybedebileceği ve kanserleşmeye daha yatkın oldukları gözlemlendi.

Yang ve ark.⁶² yaptığı bir çalışmada; oral mukozada yaşla ilişkili p53 proteininin ekspresyonundaki değişimler incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, ileriki yaşlarda p53 proteininin fonksiyon dışı kaldığı ve DNA onarımına karşı mükemmel bir savunma sağlayamadığı, DNA hasar birikiminin fazla olduğu ve kansere dönüşüne yardımcı olduğu gösterilmiştir. Wilson ve ark.⁶³ yaptığı bir çalışmada; kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin yaşla ilişkili moleküler genetik değişimleri incelenmek istenmiş ve bunun için 2, 8, 26 aylık fareler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu farelerden toplanmış olan mezenkimal kök hücrelerdeki gen ekspresyonu değişimleri incelenmiş ve sonuç olarak 26 aylık farelerde hücre döngüsü düzenleyicisi p53'ün ekspresyonunda bir azalma gözlemlenmiştir.

Hem baskılama hem de aşırı ifade deneyleri için kullanılan vektörler önce de belirttiğimiz gibi Lenti viral vektörlerdir. Lenti viral vektörler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte edebildikleri için bu gibi çalışmalarda çok kullanışlı araçlardır ve tercih sebebidir.

Lundberg ve ark.⁶⁴ yaptığı bir çalışmada nörolojik bozukluklarda uygulanan gen terapilerinde lentiviral vektörlerin kullanımı konusunda, baskılama ve aşırı ifade çalışmaları için çok uygun vektörler olduğu belirtilmiştir. Bunun da lenti viral vektörlerin geniş klonlama kapasitesinin olması ve bölünmeyen hücreleri de transdükte edebilme özelliklerinden kaynaklı olduğunu anlatmıştır. Parkinson ve Huntington's hastalıkları üzerinde yapılan çalışmalarda genetik model oluşturmada çok faydalı olduğu böylece karışık olan genetik etkileşim inceleme çalışmalarında; Alzheimer

hastalığı çalışmalarında da lentiviral vektörlerin siRNA (small interfering RNA)'yı eksprese etmek için uygun olduğu konularına değinilmiştir.

Bensadoun ve ark.⁶⁵ bir Parkinson hastalığı modeli olan 6-OHDA (6-hidroksidopamin) fare modelleri üzerinde yaptığı çalışmada gen transfer sistemi olarak lenti viral vektörler kullanılmış ve bunların çok fazla sayıda hücreyi enfekte edebilme ve uzun mesafelere kadar yayılmaları sayesinde başarılı sonuca ulaşılmıştır. Park'nin⁶³ de lentiviral vektörler kullanılmış, aktif olarak bölünmeyen hücrelerin de genomik DNA'larıyla birleşebilmesi sayesinde standart transgenezis teknikleri yerine lentiviral transgenezisin çok daha verimli olduğunu göstermiştir. Bu avantajından dolayı da transgenezis ve knockdown çalışmalarının yanı sıra yapılacak ek gen terapilerinde faydalı olacağına değinmiştir.

Araştırmamızda; hastalardan alınıp parafine yatırılmış HCC'li ve sağlıklı karaciğer dokuları ile STAG 1 antibadi boyama deneyi yapıldı. HCC, genelde sirotik karaciğer zemininde gelişen, nodüler lezyonlarla karakterize, karaciğerin malign neoplazisidir. HCC, dünyada en çok görülen kanser türleri arasında 5. sıklıkta, mortalitesi ise 3. sıklıkta yer almaktadır. Patogenezine de bakıldığında diğer kanser çeşitlerinde olduğu gibi hücresel mekanizmada meydana gelen bir mutasyon sonucunda hücrenin aşırı derecede çoğalması ve apoptozisin engellenmesi ile meydana gelmektedir. STAG 1'de apoptozis ile ilişkili tümör baskılayıcı bir gen olduğu için HCC'li örneklerle sağlıklı örnekler arasında ekspresyon karşılaştırılması yapıldı.

Çeşitli optimizasyon denemeleri sonunda kullanılacak antibadi konsantrasyonu saptanmış ve antifloresan boyama tekniği kullanılmıştır. STAG 1 nukleusta eksprese edildiğinden dolayı bu boyama tekniği ile STAG 1 ekspresyonunun sadece nukleusta olacağı düşünülüyordu ancak, HCC'li olan bir örnekte nukleusun yanı sıra sitoplazmada da ekspresyonla karşılaşılması önemli bir sonuç olarak gözlemlenmiştir. Bunun spesifik bir boyama olup olmadığına karar verilebilmesi için deneyin tekrar uygulanmasına karar verildi. Boyama sonucunda kimi HCC'li ve sağlıklı karaciğer dokusunda salınım gözlenirken kimisinde salınım olmadığı gözlenmesi sonucunda ise kesin bir sonuca ulaşabilmek için örnek sayısının artırılmasına, sağlıklı insanların ve HCC'li hastalardan alınan örnekleri yaşlarına göre gruplandırılarak immünofloresan boyama tekniğinin tekrar uygulanmasına karar verildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma süresi içerisinde; STAG 1 geninin genç ve yaşlı hücrelerdeki baskılama ve aşırı ifade sağlandı. İleride yapılacak olan çalışmalar için protein seviyesinde baskılama ve aşırı ifade incelendiği gibi mRNA düzeyinde de inceleme yapılarak bu sonuç desteklenebilir.

Kültüre alınmış olan bu knock downlu ve overeksprese hücrelerin çoğalma günlüğü tutularak büyüme eğrisi hazırlanabilir ve proliferasyondaki farklılıklar analiz edilebilir. Kültürdeki bu hücreler üzerinde γ H2AX boyaması yapılarak yaşlanmaya giden hücreler ve oranları tespit edilebilir.

Baskılama ve aşırı ifade çalışmalarında başarılı olan hücreler gamma irradyasyonuna maruz bırakılarak DNA hasarına ne gibi yanıtlarının olduğu incelenebilir.

Myc onkojeni ile transformasyon çalışmaları yapılarak transformasyon sonrası hücre proliferasyonundaki değişimler ve tümör hücresi oluşumu olup olmadığı tespit edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Pearson H.** Genetics: what is a gene? *Nature* **2006**; 441 (7092): 398-401.
2. **Lechel A, Satyanaraya A, Ju Z, Platz R R , Schaetztein S, Rudolph C, Wilkens Z, Wiemann S U, Saretzki G, Malek N P, Manns M P, Buer J, Rudolph K L.** The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO reports*, **2005**; 6(3): 275-281
3. **Nakamura Y.** Isolation of p53-target genes and their functional analysis, *Cancer Sci*, **2004**; 95:7-11.
4. **Kanazawa Y., Arakawa H., Nakagawa H., Nakamura Y.** Identification of STAG 1 gene as a key modulator of p53 dependent apoptotic pathway *.Oncogene*, **2004**; 23:7621-7627.
5. **Pennisi E.** DNA Study Forces Rethink of What It Means to Be a Gene. *Science*, **2007**; 316 (5831): 1556-1557.
6. **Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng D, Du J, Korbelt JO, Emanuelsson O, Zhang ZD, Weissman S, Snyder M.** What is a gene, post-ENCODE? *Genome Research*, **2007**; 17 (6): 669-681.
7. **Canudas S, Smith S.** Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and Sa2, respectively, in human cells. *The Journal of Cell Biology*, **2009**; 175 (2): 165-173.
8. **Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH., Peters J-M.** Characterization of Vertebrate Cohesin Complexes and Their Regulation in Prophase. *The Journal of Cell Biology*, **2000**; 151 (4): 749-761.
9. **Kitagawa R.** Key players in chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience*, **2009**; 14: 1529-1557.
10. **Weissleder R, Mahmood U.** Molecular imaging. *Radiology*. **2001**; 219:316-333.
11. **Yang X.** Imaging of vascular gene therapy. *Radiology*, **2003**; 228:36-49.

12. **Voss S, Kruskal J.** Gene therapy: a primer for radiologists. *Radiographics*, **1998**; 18:1343-1372.
13. **Albelda SM, Wiewrodt R, Sterman DH.** Gene therapy for lung neoplasms. *Clin Chest Med*, **2002**; 23:265-277.
14. **Amar A, Zlokovic BV, Apuzzo ML.** Endovascular restorative neurosurgery: a novel concept for molecular and cellular therapy of the nervous system. *Neurosurgery*, **2003**; 52: 402-412.
15. **AA. Neumann, RR. Reddel.** Telomere maintenance and cancer? Look , no telomerase, *Nature Reviews Cancer*, **2002**; 2: 879-884.
16. **Gilley D, Tanaka H, Herbert BS.** Telomere dysfunction in aging and cancer. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2005**; 37:1000-13.
17. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*, **2000**; 100(1):57-70.
18. **DePinho RA.** The age of cancer. *Nature*, **2000**; 408:248-54.
19. **Artandi SE, DePinho RA.** Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature Medicine*, **2000**; 6:852-5.
20. **Gilley D, Herbert BS, Huda N, Tanaka H, Reed T.** Factors impacting human telomere homeostasis and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, **2008**; 129:27-34.
21. **El-Deiry, Ws., Tokino, T., Velculescu, Pe., Levy, Db., Parsons, R.,Trent, Jm., Lin, D., Mercewr ,We., Kinzler, Kw.,Vogelstein, B.** Wafi, A Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. *Cell*, **1993**; 75:817.
22. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** *Molecular biology of the cell*, Gerlande science, Newyork, **2002**.
23. **Lodish, H., Berk A., Kaiser, A., Krieger, M., Scott, P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P.** *Molecular Cell Biology*,6th Ed., WH.Freeman, **2002**.
24. **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th Ed., Philadelphia, **1999**.

25. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** *Molecular Biology of the cell*, 3th Ed., Garland Publishing, New York, 1255-1295, **1994**.
26. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD** *Molecular Biology of the cell*, 3th Ed., Garland Publishing, New York, 865-901, **1994**.
27. **Tsakonas A, Matthiew D.** Notch signaling: cell fate control and signal development. *Science*, 1999; 284:770-777.
28. **Oren M.** Regulation of The p53 Tumor Suppressor Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **1999**; 274 (51): 36031-36034.
29. **Finch CE, Tanzi RE.** Genetics of aging. *Science*, **1997**; 278: 407-412.
30. **Levine JA, Momand J, Finlay CA.** The p53 Suppressor gene. *Nature*, **1991**; 351: 435-455.
31. **Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin.** Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **1989**; 340: 705-707.
32. **Levine JA.** P53, The Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, **1997**; 88:323-331.
33. **Dowel PS, Hall AP.** The p53 tumour suppressor gene and tumour Prognosis: is there a relationship? *Journal of Pathology*, **1995**; 177:221-224.
34. **Greenbatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.** Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, **1994**; 54:4855-4877.
35. **Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Whal GM.** Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell*, **1992**; 70:923-935.
36. **Gartner LP, Hiatt JL.** *Color Atlas of Histology*, Baltimore; Williams & Wilkins, **226, 1990**.
37. **Harris CC.** Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of The National Cancer Institute*, **1996**; 88: 1442-1546.

38. **Prives C, Hall PA.** An overview of p53 structure and function. *Journal of pathology*, **1999**; 187:112-126.
39. **Lane DP. P53.** A dieth in the life of p53. *Nature*, **1993**; 358: 15-16.
40. **Va Den Berg M, Tiggies AE, Schipper ME, Hartog-jager ECA, Kroes WGM, Walboomers JMM.** Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *Journal of Pathology*, **1989**; 157:1 93-199.
41. **Baker S, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger C, Jessup JM, Van Tumen P, Ledbetter DH, Barker D, Nakamura Y, Vogelstein B.** Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **1989**; 244:217-220.
42. **Hall PA, Lane DP.** P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *Journal of Pathology*, **1994**; 172:1-4.
43. **Haupt Y, Maya R, Kazas A, Oren.** Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Letters to Nature*, **1997**; 387:295-298.
44. **Michael H.G, Kubbutat G, Jones S, Karen H.** Regulation of p53 stability by Mdm2. *Letters to nature*, **1997**; 387:299-303.
45. **Saeed M, J Albert, Jr Fornace.** Role of p53 family members in apoptozis. *Journal of cellular physiology*, **2000**; 182:171-181.
46. **Ovalı E.** *Apoptozis*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara; Güneş ktb, 1998.
47. **Augustu L, Dennis A.** Cancer progression and p53. **1995**; 346;1009-112.
48. **Timoty F, Burns S, Wafik S.** The p53 pathway and apoptozis. *Journal of cellular physiology*, **1999**; 181:231-239.
49. **Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G.** Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, **1998**; 16:2265-2282.
50. **Kaelin WG, The Emerging p53 Gene Family.** *Journal of The National Cancer Institute*, **1999**; 91: (7) 594-598.
51. **Weissleder R, Mahmood U.** Molecular imaging. *Radiology*, **2001**; 219:316-333.

52. **Romano G, Pacilio C, Giordano A.** Gene transfer technology in therapy: Current, applications and future goals. *Oncologist*, **1998**; 3(4):225-236.
53. **Nabel EG, Dzau VJ.** Cardiovascular tissue modification by genetic approaches. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, eds. 10th ed. , McGraw-Hill; Hurst's The Heart, 2002; **157-166**.
54. **Voss S, Kruskal J.** Gene therapy: a primer for radiologists. *Radiographics*, **1998**; 18:1343-1372.
55. **Albelda SM, Wiewrodt R, Sterman DH.** Gene therapy for lung neoplasms. *Clin Chest Med*, **2002**; 23:265-277.
56. **Amar A, Zlokovic BV, Apuzzo ML.** Endovascular restorative neurosurgery: a novel concept for molecular and cellular therapy of the nervous system. *Neurosurgery*, **2003**; 52:402-412.
57. **Jiao LR, Havlik R, Nicholls J, Jensen SL, Habib NA.** Suicide gene therapy in liver tumors. *Methods Mol Med*, **2004**; 90:433-450.
58. **LeMay DR, Kittaka M, Gordon EM.** Intravenous RMP-7 increases delivery of ganciclovir into rat brain tumors and enhances the effects of herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy. *Hum Gene Ther*, **1998**; 9:989-995.
59. **Cohen ZR, Duvdevani R, Nass D, Hadani M, Ram Z.** Intraarterial delivery of genetic vectors for the treatment of malignant brain tumors. *Isr Med Assoc J*, **2001**; 3:117-120.
60. **Yang Y, Zhou H, Liu Z, Li B.** The age related changes of p53 protein expression in oral mucosa and their effects on oral leukopenia. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **2003**;34(3): 513-564.
61. **Wilson A, Shehadeh LA, Yu H, Webster KA.** Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*, **2010**; 11: 229.
62. **Lundberg C, Bjorklund T, Carlsson T, Jakobsson J, Hantraye P, Deglon N, Kirik D.** Applications of lentiviral vectors for biology and gene therapy of neurological disorders. *Curr Gene Ther*, **2008**; 8(6): 461-473.

63. **Bensadoun JC, Deglon N, Tseng JL, Ridet JL, Zurn AD, Aebischer P.** Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse midbrain: Cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF, *Exp Neurol*, **2000**; 164 (1): 15-24.
64. **Park F.** Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis. *Physiol Genomics*, **2007**; 31(2): 159-173.
65. **Lechel A, Satyanaraya A, Ju Z, Platz R R, Schatzlein S, Rudolph C, Wilkens Z, Wiemann S U, Saretzki G, Malek N P, Manns M P, Buer J, Rudolph K L.** The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO reports*; **2005**; 6(3): 275-281.

ÖZGEÇMİŞ

14.09.1986 yılında Çorum'da doğdu. 2004 yılında Ankara Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi'nden mezun oldu, devamında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde öğrenime başladı. 2006-2007 eğitim öğretim döneminde Norveç, Tromso Üniversitesi'nde erasmus öğrenim öğrencisi olarak bir yıl öğrenim gördü. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Eebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2008 yılı Güz Dönemi ile birlikte Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı Temel Onkoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2009 yaz döneminde Almanya, Ulm Üniversitesi, Moleküler Tıp Enstitüsü, Max Planck Araştırma Departmanı, Kök Hücre Yaşlanma Birimi'nde üç ay staj eğitimi aldı hemen ardından aynı birimde altı ay boyunca tez çalışmalarını devam ettirdi.