

**MUZAFFER ARIKAN**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2012**

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

**( YÜKSEK LİSANS )**

**HÜCRE SOYLARINI OLUŞTURMADA KULLANILAN  
PLAZMİD PROFİLİNİN BELİRLENMESİ**

**MUZAFFER ARIKAN**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. DURAN USTEK**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2012**

## TEZ ONAYI

Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Programında Muzaffer Arıkan tarafından hazırlanan Hücre Soylarını Oluşturmada Kullanılan Plazmid Profilinin Belirlenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

23 / 07 / 2012

### Tez Sınav Jürisi

- | Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)                                 | İmzası  |
|--|---|
| 1.Doç. Dr. Duran Ustek (Danışman) (İ.Ü., DETAE, Genetik Anabilim Dalı)                     |    |
| 2.Prof. Dr. Ahmet Gül (İ.Ü., İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı)        |    |
| 3.Prof. Dr. Zehra Oya Uyguner (İ.Ü., İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)  |   |
| 4.Yrd. Doç. Dr. Olcay Kurşun (İ.Ü., Mühendislik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü) |   |
| 5.Yrd. Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir (İ.Ü. DETAE, Genetik Anabilim Dalı)                  |  |

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Muzaffer ARIKAN

## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde büyük emeği olan değerli hocam Doç Dr. Duran Üstek'e,

Yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Neslihan Abacı ve Dr. Sema Sırma'ya,

Tezimin her aşamasında yardımcı olan değerli arkadaşlarım Biyolog Atilla Çakar, Uzman Biyolog Zeliha Emrence, Uzman Biyolog Hülya Azaklı, Dr. Aris Çakiris, Biyolog Fırat Çaralan, Moleküler Biyolog Nilgün Genç, Dr. Ferda Paçal'a,

Tez çalışmama katkıda bulunan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Tezime katkıda bulunan tüm meslektaşlarıma ve arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22819

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. İmmortalizasyon Teknikleri.....	2
2.1.1. Kimyasal Maddeler .....	2
2.1.2. Fiziksel Teknikler.....	2
2.1.3. DNA Tümör Virüsleri .....	3
2.1.3.1. Epstein-Barr .....	3
2.1.3.2. İnsan Papilloma Virüsleri (HPV).....	4
2.1.3.3. Adenovirüsler.....	4
2.1.3.4. Simian virüs 40 (SV40) .....	6
2.2. Lentiviral Vektörler.....	8
2.2.1. Lentivektör Tasarımı .....	9
2.3. 293T ve K562 Hücre Soyları .....	11
2.4. Hedefli dizi yakalama yöntemi .....	12
2.5. Yeni Nesil Dizileme .....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
3.1. Materyal .....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. K562 Hücre Soyu .....	15
3.2.2. 293T Hücre Soyu.....	15

3.2.3. Donmuş Hücre Soyunun Çözülmesi .....	15
3.2.4 K562 ve 293T Hücrelerinin Pasajlanması .....	16
3.2.5. Hücrelerin pLVTHM Lentiviral Vektörü ile Transdükte Edilmesi.....	16
3.2.6. Transdükte Edilen Hücrelerin Belirlenmesi ve Ayrılması (FACS).....	17
3.2.7. Genomik DNA İzolasyonu .....	17
3.2.8. Hedefli Dizi Yakalama .....	18
3.2.9. Yeni Nesil Dizileme .....	18
3.2.9.1. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması .....	18
3.2.9.1.1 DNA'nın Fragmanlara Ayrılması (Nebulizasyon).....	18
3.2.9.1.2. DNA Uçlarının Tamiri .....	19
3.2.9.1.3 Adaptör Bağlanması.....	19
3.2.9.1.4. AMPure Boncuklarının Hazırlanması ve Küçük Fragmanların Uzaklaştırılması.....	20
3.2.9.1.5 DNA Kütüphanesinin Sayısal Değerlendirilmesi .....	21
3.2.9.1.6. DNA Kütüphanesinin Kalite Değerlendirmesi .....	22
3.2.9.2. emPZR .....	23
3.2.9.2.1 emPZR Amplifikasyonu: .....	23
3.2.9.2.2. Amplifiye Olmuş Boncukların Geri Kazanılması.....	25
3.2.9.3. Dizileme.....	28
3.2.9.3.1. Paketleme Boncuklarının Hazırlanması .....	29
3.2.9.3.2. DNA Boncuklarının (Örnek ve Kontrol) Hazırlanması .....	29
3.2.9.3.3. Enzim ve PPIaz Boncuklarının Hazırlanması .....	29
3.2.9.3.4. DNA Boncukları ve Paketleme Boncuklarının Birleştirilmesi .....	30
3.2.9.3.5. Boncukların PTP'ye Yüklenmesi ve Dizileme .....	30
3.2.10.    Biyoinformatik Analiz .....	31
4.    BULGULAR .....	32
4.1.    Floresanla Aktive Hücre Ayırma (FACS).....	32
4.2.    Yeni nesil dizileme.....	34
4.3.    Biyoinformatik Analiz .....	35
5.    TARTIŞMA .....	40
KAYNAKLAR .....	43
ÖZGEÇMİŞ .....	50



**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 3-1: Uç tamiri karışımı .....	19
Tablo 3-2: Uç tamiri programı.....	19
Tablo 3-3: Adaptör sekanslarının baz dizilimi .....	20
Tablo 3-4: Live amplifikasyon karışımı içeriği .....	23
Tablo 3-5: emPZR reaksiyonu koşulları .....	25
Tablo 3-6: Katmanlara yüklenecek boncukların hazırlanması .....	30
Tablo 3-7: Boncukların katmanlara yüklenme sırası .....	31
Tablo 4-1: Yeni nesil dizileme sonuçları .....	34
Tablo 4-2: K562 hücre soyundan elde edilen fragmanların hücre soyu oluşturmada kullanılan vektörlere göre dağılımı.....	38
Tablo 4-3: 293T hücre soyundan elde edilen fragmanların hücre soyu oluşturmada kullanılan vektörlere göre dağılımı .....	38

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Konak DNA'sına integre halde bulunan HPV genomu .....	4
Şekil 2-2: İnsan adenovirüs serotip 2'nin E1 bölgesinin genomik organizasyonu (38) ...	5
Şekil 2-3: SV40 genomunun organizasyonu (41).....	6
Şekil 2-4: Lentivirüslerin genel yapısı ve genomu (47) .....	8
Şekil 2-5: Lentiviral plazmidler ve lentivektör tasarımı (51) .....	10
Şekil 2-6: Lentiviral vektör geliştirme yöntemleri, güvenlik ve verim karşılaştırması (47).....	11
Şekil 2-7: Hedefli dizi yakalama metodu (52).....	12
Şekil 3-1: pLVTHM vektörünün yapısı .....	17
Şekil 3-2: Sekanslama aşamasında iş akışı .....	18
Şekil 3-3: Fragmanlara Adaptör Dizilerin Bağlanması .....	20
Şekil 3-4: emPZR'da amplifiye olmamış ve amplifiye olmuş yakalama boncukları .....	23
Şekil 3-5: Her bir tüpte kullanılacak DNA Kütüphanesinin hesaplanması .....	24
Şekil 3-6: Zenginleştirme oranının hesaplanması.....	28
Şekil 3-7: Sekanslama aşamasındaki reaksiyonlar .....	28
Şekil 4-1: Transdükte edilmiş 293T hücrelerinin FACS sonuçları.....	32
Şekil 4-2: Transdükte edilmemiş K562 hücrelerinin FACS sonuçları .....	33
Şekil 4-3: Dizileme sonucu elde edilen DNA fragmanlarının uzunluk dağılımları .....	34
Şekil 4-4: İki hücre soyunda yeni nesil dizileme sonucu elde edilen fragmanların insan kromozomlarındaki vektöre homolog bölgelere göre dağılımı .....	36
Şekil 4-5: pLVTHM vektörünün plazmid kısmının genetik haritası (5885-11085).....	37
Şekil 4-6: pLVTHM vektörünün sadece klasik plazmid kısmı (5885-11085 bç arası) ile eşleşen fragmanların 293T (a), K562 (b) hücreleri için toplu görünümü.....	37
Şekil 4-7: SV40 için elde edilen kimerik fragmanların BLAT karşılaştırması sonuçları .....	39
Şekil 4-8: Kimerik fragmanların TBC1D5 geni üzerindeki görünümü .....	39

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

3'UTR	3' Untranslated region
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
BDD	Bead deposition device
CMV	Cytomegalovirus
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DBIM	DNA bead incubation mix
EBNA1	Epstein-Barr nuclear antigen 1
EBNA2	Epstein-Barr nuclear antigen 2
EBNA3	Epstein-Barr nuclear antigen 3
EBNALP	Epstein-Barr nuclear leader protein
emPZR	Emülsiyon bazlı polimeraz zincir reaksiyonu
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
GFP	Green fluorescent protein
HEK	Human embryonic kidney cells
HEL	Human embryonic lung cells
HER	Human embryonic retinoblasts
HIV	Human Immunodeficiency virus
HPV	Human papilloma virus
Hsc70	Heat shock cognate protein 70
LMP	Latent membrane protein
LTR	Long terminal repeats
MEM	Minimal essential medium
MPC	Magnetic particle concentrator
NCBI	National Center for Biotechnological Information
PPi	Polimeraz pirofosfat

pRb	Retinoblastoma protein
PTP	Picotiter plate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SV40	Simian virus 40
TBC1D5	TBC1 domain family, member 5
VSVG	Vesicular stomatitis virus glycoprotein

## ÖZET

Arıkan, M. Hücre Soylarını Oluşturmada Kullanılan Plazmid Profilinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2012.

**Amaç.** Kontrollü deneysel modellerin oluşturulmasında hücre soyları in vitro çalışmalar için önemli materyallerdir. Spesifik genotipik özelliklere sahip hücre soylarının oluşturulması için kullanılan en yaygın yol DNA virüsleri veya antijenleridir. İmmortalizasyon işleminde kullanılan vektör DNA dizileri, genomik DNA'ya entegre olur. Bu çalışmada, söz konusu vektörlere ait DNA parçalarının binlerce pasaj sonrası durumları, K562 ve 293T hücre soylarında sorgulanmıştır.

**Yöntem.** K562 ve 293T hücre soylarındaki entegre plazmid DNA dizileri, pLVTHM lentiviral vektörüne özgü örtüşen probler ile hedefli dizi yakalama yöntemi (sequence capture array) kullanılarak genomik DNA'dan ayrılmıştır. Daha sonra, alınan DNA parçaları yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizilenmiştir. Dizileme sonuçları biyoinformatik metotlarla analiz edilmiştir.

**Bulgular.** Dizileme sonucu immortalizasyonda kullanılan DNA vektör dizileri ile eşleşen 22980 DNA dizisi elde edilmiştir. Bu dizilerin iki hücre soyunda benzer şekilde neomisin direnç geni, SV40 T antijeni gibi temel DNA vektör bileşenleri ile eşleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, SV-40'ın iki hücre soyunda da 3p24.3 kromozomal bölgesindeki TBC1D5 genine entegre olduğu belirlenmiştir.

**Sonuç.** K562 ve 293T hücre soyları için immortalizasyonda kullanılan vektör dizileri belirlenmiş ve SV-40 T antijeninin bu hücrelerdeki integrasyon bölgesi tespit edilmiştir. Farklı hücre soylarında standart plazmidlerin kullanıldığı ve SV40 plazmidlerinin aynı bölgede istikrarlı hale geldiği tespit edilmiştir. Bu durumda plazmidlerin, genoma integrasyon tercihinin konak hücrenin karakteristik özellikleri ve genomun topografik yapısı da rol alabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Plazmid DNA, immortalizasyon, yeni nesil dizileme, integrasyon, hücre soyu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22819

## ABSTRACT

Arikan, M. Determination of plasmid profile used in cell line immortalization. Istanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. MSc. Thesis. Istanbul. 2006.

**Aim.** One of the ways to create cell lines is infecting the cells with DNA tumor viruses. The DNA vector sequences that used for immortalization process are found to be integrated in genomic DNA. At this study, the conditions of these DNA segments after thousands of passages in K562 and 293T cell lines were investigated.

**Methods.** The integrated plasmid DNA sequences in K562 and 293T cell lines were captured with overlapping probes covering pLVTHM lentiviral vector sequence using sequence capture array. Then, the captured fragments were sequenced using next generation sequencing technology and results were analyzed with bioinformatic methods.

**Results.** In the K562 and 293T cells, 22980 fragments matching viral DNA sequences used for immortalization of the cell line were obtained. It has been determined that these sequences similarly match with basic DNA vector elements, such as Neomycin resistance gene and SV40 Large T Antigen, in both two cell lines. Also, SV-40 was found to be integrated in TBC1D5 gene which is located at 3p24.3 chromosomal region in both cell lines.

**Conclusions.** Here, the profile of the vectors used in immortalization of the K562 and 293T cell lines and the integration site of the SV-40 at these cell lines were determined. It was found that certain plasmids are used for immortalization of different cell lines and SV40 has stabilized in the same genomic site. It can be said that genomic integration preferences of the plasmids depend on not only cell characteristics but also genomic structure of the host cells.

**Key Words:** Plasmid DNA, immortalization, next generation sequencing, integration, cell line

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 22819

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İmmortalizasyon; hücre soyu oluşturma çalışmalarında, hücrelerin çoğalma ve büyüme özelliklerinin dengeli hale getirilmesi açısından önemli bir basamaktır (1). Bu aşamada kimyasal maddeler, fiziksel teknikler, onkogenler veya DNA tümör virüsleri kullanılabilir (2). Epstein-Barr (3), Simian virüs (SV40) T antijeni (4), İnsan Papilloma Virüsleri (5) ve Adenovirüsler (6) immortalizasyon çalışmalarında en çok tercih edilen DNA virüsleri olarak bilinmektedirler.

Son yıllarda, viral entegrasyon bölgelerinin tayini üzerine yapılan gen terapisi çalışmaları ivme kazanarak artmıştır (8,9). Özellikle yeni nesil dizileme teknolojisi sayesinde insan DNA'sı ile bütünleşmiş viral dizilerin tüm genom düzeyinde belirlenebilmesi mümkün hale gelmiştir. Yeni nesil dizileme ile elde edilen büyük miktardaki bilgi hücre içindeki DNA kompozisyonunun tam anlaşılabilmesine de olanak sağlamıştır.

Hedefli dizi yakalama yöntemi pek çok yeni genomik uygulamaya uyarlanabilen bir metottur (10,11,12). Bu yöntem sayesinde bir DNA havuzu içinden istenen bölgeler uygun problarla hibridize edilerek alınabilmektedir. Viral DNA'ya uygun problemler yardımıyla genomik DNA'daki integrasyon bölgelerinin yakalanması, hem viral integrasyon bölgelerinin hem de vektör DNA'larına ait parçaların tayin edilmesinde kullanılabilir. Bu yöntem ile elde edilen DNA parçaları, yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak dizilendiğinde hedeflenen dizilere ait bilgiler büyük oranda elde edilmiş olacaktır.

Bu çalışmada, K562 ve 293T hücre soylarındaki immortalizasyonda kullanılan vektör DNA parçalarının varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. pLVTHM lentiviral vektörü ile transdükte edildikten sonra bu vektörün iskeletine uygun problemlerle hedeflenen bölgelerin yakalanması ve yeni nesil dizileme ile de bu DNA parçalarının dizilenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede elde edilen dizilerin analizinin yapılması ve bu iki hücre soyundaki vektör kompozisyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İmmortalizasyon Teknikleri

Hücre soyu oluşturma çalışmaları moleküler biyoloji alanında önemli bir yere sahiptir. Deneysel çalışmalar için oluşturulan hücre modelleri; pek çok mekanizmanın anlaşılabilmesi ve kontrol edilebilmesine olanak sağlamış, aynı zamanda insan sağlığı yararına yapılacak çalışmalara da kapı açmıştır. Üretilen hücre soylarının uzun yıllar boyunca kararlı bir şekilde kullanılabilmesi; bu soyların oluşturulması sırasında kullanılan teknikler ile dengeli bir yapıya ulaştırılması ve bu yapının iyi bir şekilde karakterizasyonu ile mümkün olmaktadır (13). Burada immortalizasyon çalışmaları ve bu çalışmalarda kullanılan teknikler önemli bir yere sahiptir. İmmortalizasyon; genel olarak bir hücre soyuna Hayflick limitini (sonsuz bölünme ve çoğalma yetisine ulaşma) aşmasını sağlayacak genetik yapıyı kazandırma amacıyla yapılan işlemler ve teknikler bütünü olarak tanımlanabilir (14). Bugüne kadar tanımlanmış ve optimize edilmiş pek çok immortalizasyon tekniği bulunmaktadır. Tez konusu kapsamında diğer tekniklerden de kısaca bahsedilecek ve esas olarak DNA tümör virüslerinin bu işlem için kullanılması üzerinde durulacaktır.

#### 2.1.1. Kimyasal Maddeler

Hücre soyu oluşturma çalışmalarında kimyasal karsinogenezisin kullanılabilmesi, ilk defa in vitro ortamda normal hamster embryo hücrelerinin beş halkalı polisiklik aromatik bir hidrokarbon olan Benzo(a)piren ( $C_{20}H_{12}$ ) ile transforme edilmesi ile anlaşılmıştır (15, 16). Bu çalışmadan sonra farklı laboratuvarlarda bu konuda değişik kimyasal karsinogenezis ajanlarıyla çalışmalar yürütülmüştür (17, 18). Bazı kimyasal ajanların karsinogenezde rol oynadığı, farklı gruplar tarafından ortaya konulmasına rağmen bu kimyasalların direkt hücre soyu oluşumuna neden olduğunu gösteren çok az rapor mevcuttur (19, 20, 21). Kimyasal maddelerin hücre immortalizasyonunda kullanımını geliştiren yeni teknikler sayesinde yerini başka ajanlara bırakmıştır.

#### 2.1.2. Fiziksel Teknikler

Ultraviyole ışınlarının, X ışınlarının veya gama ışınlarının hücre transformasyonunda kullanılmaya çalışılması bu ışınların immortalizasyonu sağlayabileceği fikrini de beraberinde getirmiştir. İmmortalizasyon işleminde fiziksel



tekniklerin kullanımı farklı şekillerde denenmiş olmasına rağmen pek olumlu sonuçlar doğurmamıştır. Bu teknikler ile de başarılı olmuş bazı immortalizasyon denemeleri olmasına rağmen, genel olarak bu yolla ancak çok uzun süreli maruziyetlerin transformasyonu tetikleyebileceği bildirilmiştir (22, 23).

### **2.1.3. DNA Tümör Virüsleri**

Normal hücreleri transforme edebilme ve yaşam sürelerini uzatabilme yetisine sahip farklı DNA tümör virüsü türleri, hücre soyu oluşturma çalışmalarında sıklıkla kullanılırlar. Bu viral ajanlar içerdikleri onkogenler sayesinde enfekte ettikleri hücrenin genetik yapısında değişime neden olarak hücrenin bölünme yetisinin sınırsız hale gelmesine neden olurlar. Bu amaçla en sık kullanılan DNA tümör virüsleri Epstein-Barr, Simian virüs (SV40), İnsan Papilloma Virüsleri ve Adenovirüslerdir.

#### **2.1.3.1. Epstein-Barr**

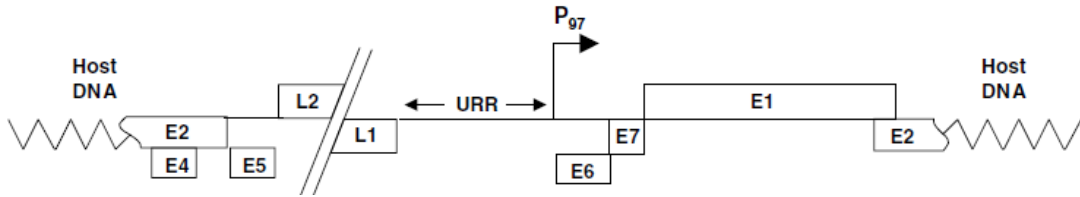
Epstein-Barr virüs bugüne kadar pek çok kanser çeşidiyle ilişkilendirilmiş herpes virüs ailesine üye bir DNA virüsü çeşididir. Bu virüsün özellikle lenfoid tümörlerin oluşumunda çok önemli role sahip olduğu bilinmektedir (24). Epstein-Barr virüsü enfekte ettiği hücrelerde latent bir döngü içerisinde epizom olarak varlığını sürdürür. Virüsün sahip olduğu genlerin bir kısmı hücrelerin ölümsüz hale gelmesinde önemli rol oynarken, geriye kalan genler ise latent evredeki dengenin korunmasını sağlayarak enfeksiyon sonrası virüs-konak birlikteliğinin devam etmesi görevini üstlenirler (25).

Epstein-Barr virüsünün içerdiği altı adet latent gen (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, ve EBNA3LP) ürününün hücre bölünmesi ve immortalizasyonunda görev aldıkları bilinmektedir. Bu latent genlere ek olarak epizom halinde bulunan Epstein-Barr genomundan LMP (Latent membran protein) kodlayan genin ekspresyonu gerçekleşir. EBNA1 geninin virüs genomunun replikasyonu ve latent evrenin devam etmesinde çok önemli rolü olduğu tespit edilmiştir. EBNA2 ve LMP genlerinin de konak hücrede DNA sentezi ve hücre büyümesinin kültür ortamında kontrolünde rol aldıkları yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca, EBNA2 geninin immortalizasyon özelliğinin kazanılmasında önemli bir faktör olduğu, immortalize hale gelmeyen P3HR1 hücre soyundan elde edilen virüs genomunda bu gen bölgesinin delesyona uğradığı tespit edilmiştir (26, 27). Buna ek olarak, EBNA3 ailesi genlerinin de hücre gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol aldıkları farklı gruplar tarafından rapor

edilmiştir (28, 29). Epstein-Barr virüsü hücre soyu oluşturma çalışmalarında en sık kullanılan virüslerden biridir. Bu virüs kullanılarak elde edilmiş pek çok farklı hücre soyu mevcut bulunmaktadır.

### 2.1.3.2. İnsan Papilloma Virüsleri (HPV)

İnsan papilloma virüsü bugüne kadar pek çok servikal kanser türü ile ilişkilendirilmiş papilloma virüs ailesinde yer alan bir DNA virüsüdür (30). Bu virüsün içerdiği genom yaklaşık 8 kb uzunluğundadır. İnsan Papilloma virüs genomunun içerdiği E6 ve E7 genleri enfekte edilen hücrelerin kanserleşmesi ve büyüme özelliklerinin devam ettirilmesi mekanizmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bu iki genden E6 p53 genini hedef alırken, E7 ise pRb ve pRb ile ilişkili proteinler üzerinde etkili olarak hücrenin transforme olmasını sağlamaktadır. Virüs konak hücreye girdikten sonra, viral genom ile konak DNA integrasyonu gerçekleşir ve enfekte olmuş konak DNA içerisinde genellikle viral parçalara rastlanır (Şekil 2.1.3.2) (31, 32).



**Şekil 2-1:** Konak hücre DNA'sına entegre halde bulunan HPV genomun haritası. E6 ve E7 genlerinin transformasyonu sağlarken, E1, E2, E3, E4 VE E5 genleri konak hücre ve viral gen ekspresyonunun düzenlenmesi üzerinde etkilidirler.

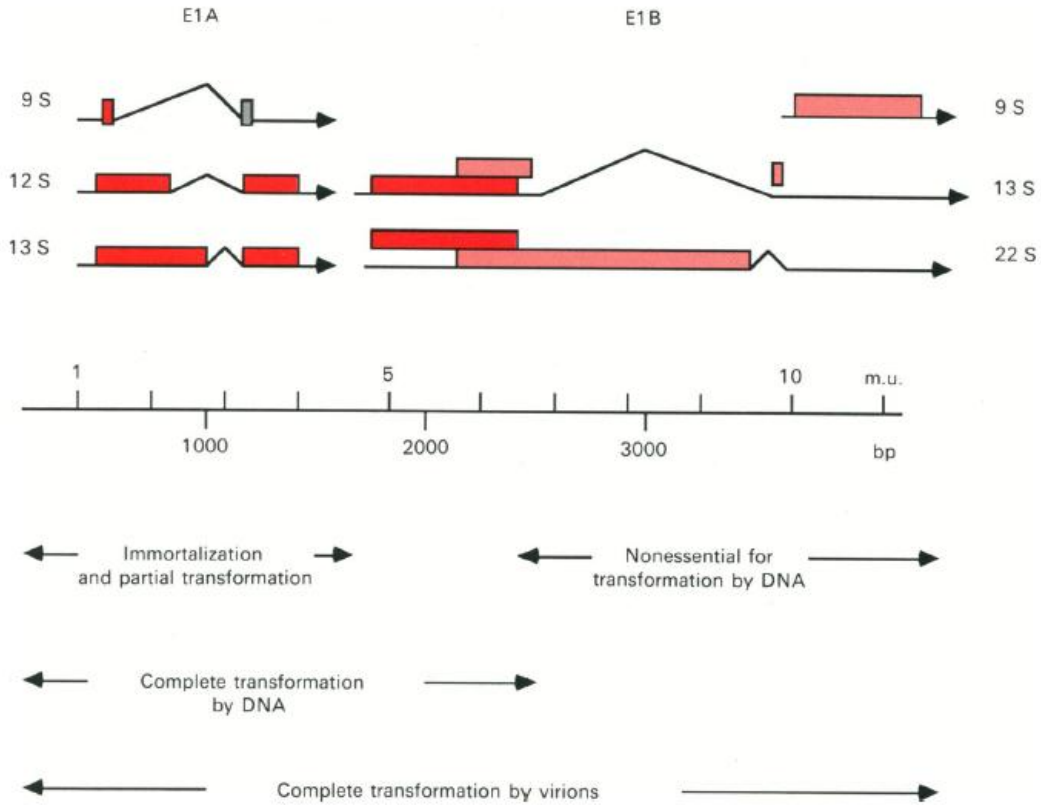
Farklı insan papilloma virüsü tipleri kullanılarak çok sayıda servikal karsinoma ve insan epitel hücresi kaynaklı hücre soyu üretilmiştir (33, 34). İnsan papilloma virüs genomu içeren plazmidlerle enfekte edilen hücrelerin immortalize hale geldiği görülmüş ve bu işlemler pek çok farklı hücre tipi üzerinde tekrarlanmıştır.

### 2.1.3.3. Adenovirüsler

Bugüne kadar 30'dan fazla Adenovirüs serotipi pek çok farklı hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Adenovirüs genomu 26-45 kb uzunluğunda çift iplikli lineer bir DNA dizisidir. 1977 yılında kırılmış Adenovirüs 5 DNA'sı kullanılarak insan embriyo böbrek hücrelerinin (293 hücreleri) transforme edilebildiği rapor edilmiştir (35). Ancak

bu rapordaki sonuçlar hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ile transformasyon verimliliği karşılaştırması üzerinden değerlendirilmiştir.

Adenovirüsler kullanılarak gerçekleştirilen hücresel transformasyon işlemi E1a ve E1b bölgelerinin sıralı olarak rol aldığı bir işlemler dizisidir. Adenovirüs genomu üzerinde bulunan E1a bölgesinin primer kültür hücrelerinde immortalizasyon için tek başına yeterli olduğu daha önce rapor edilmiştir (36, 37) (Şekil 2.1.3.3).



**Şekil 2-2:** İnsan adenovirüs serotip 2'nin E1 bölgesinin genomik organizasyonu gösterilmektedir. E1a bölgesinde 9S, 12S ve 13S mRNA varyantları bulunmaktadır. E1b bölgesinde ise 9S, 13S ve 22S mRNA varyantları bulunmaktadır. E1a bölgesi tek başına transformasyon ve immortalizasyon için yeterlidir (38).

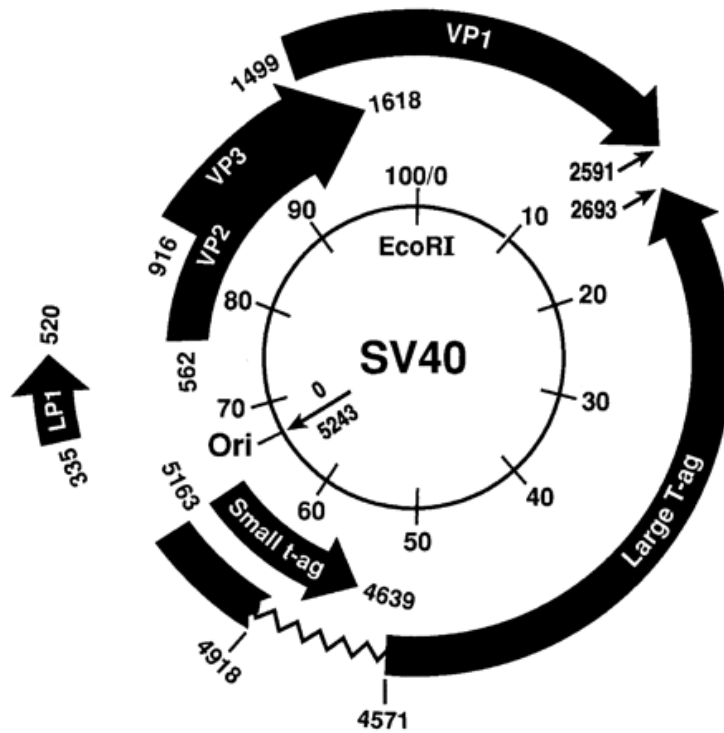
Bugüne kadar insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK), insan embriyonik akciğer hücreleri (HEL) ve insan embriyonik retinoblastlar (HER) hücre kültürü ortamında farklı adenovirüs parçaları ile transforme edilebilmiştir. Transforme edilen hücrelerin büyüme ve çoğalma verimleri değişkenlik göstermektedir. HEK ve HER hücrelerinin diğer hücre tiplerine göre transformasyon sonrası daha iyi çoğaldıkları görülmüştür. Yapılan çalışmalar enfeksiyon sonrası hücrelerin filament ekspresyon düzeylerinin erken dönem farklılaşan sinir hücrelerine benzer şekilde değiştiğini göstermiştir (38). Adenovirüslerin hücreler üzerindeki transforme edebilme yetisi, bu

virüs temelli vektörlerin hücre soyu oluşturma çalışmalarında en çok kullanılan virüslerden olmasını sağlamıştır.

#### 2.1.3.4. Simian virüs 40 (SV40)

Simian virüs 40, *Macaca mulatta* türünde bulunan ve tümör oluşturma potansiyeli olan bir polyomavirüstür. SV40 genomu çift iplikli yapıda 5 kb uzunluğunda bir DNA zincirinden oluşur. Polyomavirüsler yaklaşık 40-50 nm çapında lipoprotein zar içermeyen virionlar olarak bilinirler. Viral kapsid V1, V2 ve V3 proteinlerinden oluşurken, viral DNA ise bu kapsidin içinde konak hücre kaynaklı H2a, H2b, H3 ve H4 histon proteinleri ile birlikte kompleks halinde bulunur (39).

Polyomavirüslerin genomu genel olarak, yapısal V1, V2, V3 proteinlerinin yanında büyük T antijeni (Tag) ile küçük t antijenini (tag) kodlar. SV40 genomu bu proteinlere ek olarak angoprotein, 17K T ve küçük lider protein olmak üzere 3 protein daha kodlar (40) (Şekil 2.1.3.4).



Şekil 2-3: SV40 genomunun organizasyonu (41)

Virüs enfeksiyonunun erken aşamalarında V1 proteini hücre membranı almaçları ile virüs arasındaki etkileşimi sağlayarak virüsün konak hücreye girişini sağlar. Hücre membranından geçen virüs endoplazmik retikulum üzerinden sitozole

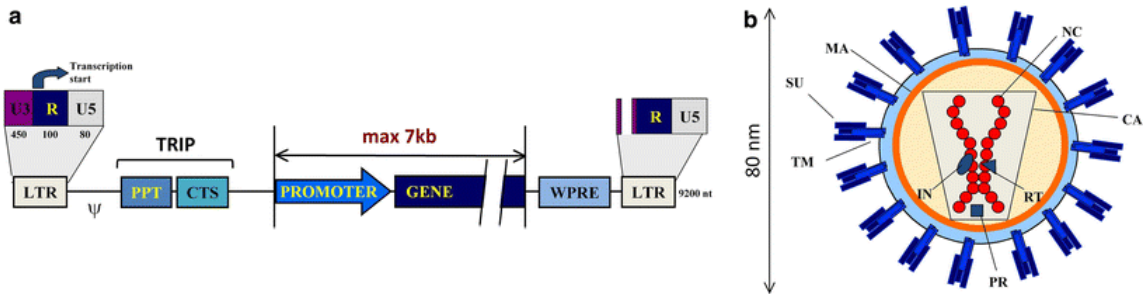
geçer (42). SV40 genomundaki erken ifade olunan bölgenin, konak hücrenin transkripsiyon mekanizması üzerinden ifadesi ile Tag, tag ve 17K antijenleri üretilir. Bu 3 protein de aynı transkriptin farklı kırılma varyantları olarak üretilirler. Tag enfeksiyon mekanizmasının temel bileşenidir. Bu antijen erken mRNA üretimi, viral replikasyonun başlatılması ve geç dönem transkripsiyonu gibi mekanizmaları yönetir. Tag'ın geç transkripsiyon bölgesini uyarmasıyla aynı mRNA öncülünden varyantlarla V1, V2 ve V3 ile agnoprotein üretilir. Litik özelliklere sahip V2 ve V3 proteinleri konak hücrenin geçirgenliğini değiştirerek virüsün konak hücreden çıkışını kolaylaştırırlar (43). Bu şekilde geçirgenliği değişen hücre zarından döngüsünü tamamlayan viral parçacıklar birleşerek hücreden yüzlerce virüs halinde çıkarlar. SV40 hint şebegi dışındaki türleri de enfekte edebilir ancak bu türlerdeki akıbeti değişkendir. İnsan fibroblast ve epitel hücrelerinin SV40'a geçirgen olduğu bilinirken, hamster türlerinde de hücreler SV40 tarafından enfekte edilebilseler de nedeni tam olarak bilinmeyen bir şekilde virüsün replikasyon veya transkripsiyon mekanizmalarının işlemesine engel olurlar. SV40 replike olamadığı için de bu hücreler birkaç bölünme sonra virüsü kaybederler.

SV40'ın tümör oluşumunu tetiklediği, keşfinden hemen sonra rapor edilmiştir (44). Virüs sayısı, enfeksiyonun rotası ve hayvanın immün durumuna bağlı olarak SV40'ın çok çeşitli tümörlerin oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Bu virüsün enfekte ettiği hücreleri transforme edebilme ve ölümsüzleştirme yeteneği pek çok farklı yoldan üzerinden işleyen mekanizmalara bağlıdır. Burada hem immortalizasyon hem de transformasyon aşamalarından sorumlu temel molekül Tag'dır. Küçük t antijeni (tag) ise sadece hücre soylarında hücrelerin transformasyonunda rol oynamaktadır. Tag hücre döngüsü ve apoptozda yer alan pek çok proteinle etkileşmektedir. Bunlardan p53, tümör baskılayıcı retinoblastoma ailesi proteinleri ile hsc70 mekanizmaları üzerine en çok çalışılan proteinlerdir (45).

SV40 etkileştiği hücre döngüsü proteinlerinin yardımıyla konak hücrede yaşam döngüsünü devam ettirir ve konak DNA'ya rastgele bölgelerden entegre olabilir (46). Bu entegrasyon bölgeleri arasından stabilizasyon ve immortalizasyon için en uygun bölge zamanla çoğalan hücreler içinde baskın hale gelerek, virüsün bu bölgede entegre halde kalması sağlanır.

## 2.2. Lentiviral Vektörler

Lentivirüsler retroviradea ailesine mensup tek iplikli RNA virüsleri olarak bilinirler. Lentivirüsler diğer retrovirüslerden farklı olarak bölünmeyen hücreleri de enfekte etme özelliğine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı lentiviral vektörler gen terapisi çalışmalarında en sık kullanılan vektörlerin arasında yer alırlar. Günümüzde klinik gen terapi denemelerinin yaklaşık %20'si lentivektörler kullanılarak oluşturulan tasarımlar üzerinden yürümektedir (47). Lentiviral vektörlerin genomu 3 temel gen içerir: gag, pol ve env. Gag geni yapısal proteinleri kodlarken, pol geni tek iplikli viral RNA'yı işleyen enzimleri kodlar. Bu enzimlerden reverse transkripaz RNA'nın (RT) DNA'ya dönüşmesini sağlarken, integraz ise oluşan DNA'nın konak genomuna entegrasyonunu katalizler. Aynı genden kodlanan protease enzimi ise gag-pol ayrılması ve virion olgunlaşması işlemlerinde görev alır. Env geni viral zarı oluşturan proteinleri kodlar. Bazı kompleks lentivirüsler bunlara ek olarak genomlarında başka genler de bulundurabilirler. Retrovirüslerin genomu ayrıca cis-acting elementleri ile birlikte gen ekspresyonu, entegrasyon ve reverse transkripsiyonda görev alan elementleri içerir (48).



**Şekil 2-4:** Lentivirüslerin genel yapısı ve genomu (47)

Lentivirüslerin yaşam döngüsü virüsün enfekte edeceği hücrenin reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Daha sonra hücre membranı ile virüsün füzyonu gerçekleşir ve virüsün içeriği sitoplâzmaya bırakılır. Sitoplâzmada tek iplikli viral RNA reverse transkripsiyon ile çift iplikli DNA'ya dönüşür. Oluşan çift iplikli DNA hücre bölünmesi sırasında veya aktif transport ile konak hücrenin çekirdeğine geçer. Burada viral DNA konak hücre DNA'sına entegre viral genlerin uzun süreli ifadelerini sağlamış olur. Enfekte olan hücrenin yaşam döngüsü boyunca bu genler ifade olurlar. Viral genlerin ifadesi ile oluşan RNA ve tüm viral genom sitoplâzmaya transfer olur ve translasyona uğrar. Uçbirleştirmeye (splicing) uğramamış viral genom ile viral parçalar paketlenirler. Virion olgunlaşması bu paketin hücreden tomurcuklanması ile tamamlanır (48).

Lentivivektörler bölünmeyen hücreleri de transdükte (transduced) edebilme yeteneğine sahiptirler. Human Immunodeficiency virus (HIV), integraz, matrix proteini, vpr ve Polypurine tract (PPT) proteinleri yardımıyla bölünmeyen hücreleri transdükte etmeyi başarır. Bu özelliklerinden dolayı lentivirüsler gen terapisi vektör tasarımlarında önemli avantajlara sahip bir virüs grubu haline gelirler (49).

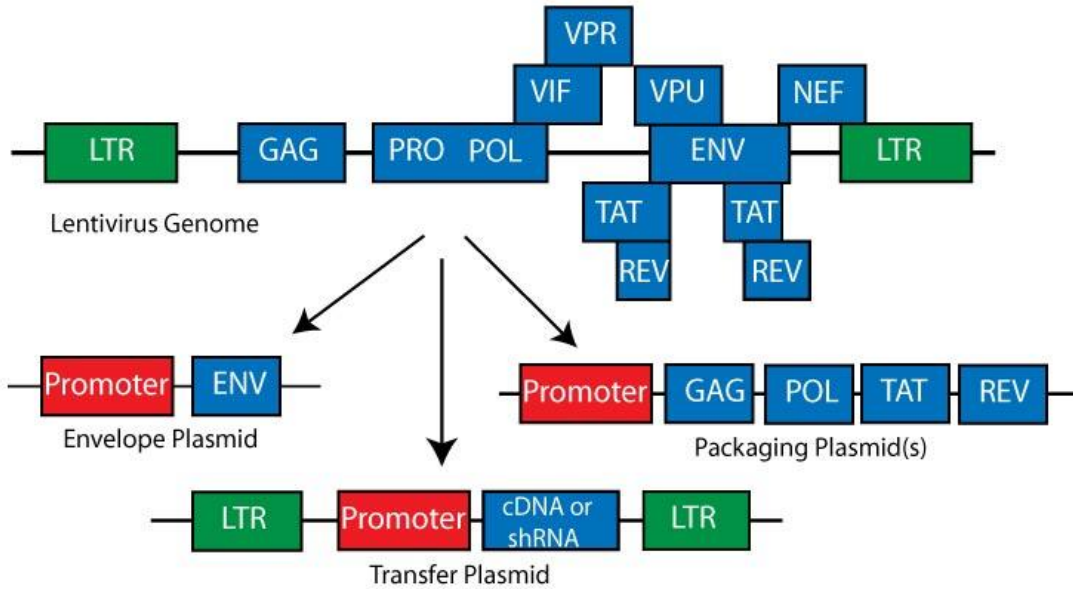
### 2.2.1. Lentivektör Tasarımı

HIV derive lentivektörler üretim, dönem ve gelişmişlik düzeylerine göre adlandırılırlar. Yabancıl virustan elde edilen birinci kuşak Lenti vektörlerin in vitro koşullarda kullanılabilirliği ve avantajları görüldükten sonra, bu vektörlerin genomları uygun şekilde disekte (3-LTR'daki self replikatif bölge çıkartılarak) edilerek ikinci ve üçüncü kuşak lenti vektörler geliştirilmiştir (49). Günümüzde ise gen terapi amaçlı kullanılmak üzere, LTR sekansları CMV gibi güçlü promoterlarla değiştirilerek lentivektörler gen tedavide kullanılmak üzere daha güvenli hale getirilmiştir. Lentivektör sistemi; içinde ilgili transgeni taşıyacak 1-Transfer vektör plasmidi, 2-Packaging plasmid, vektör paketleme işinde görev alan elemanları taşımaktadır. Bunlar pol, gag, rev gibi elemanlardır. 3-Envelop plasmid (zarf plasmidi), geniş bir tropizme sahip olması ve virion partiküllerine stabilite kazandırması için vesicular stomatitis virus zarf proteini olan VSV-G yaygın olarak kullanılmaktadır. VSV-G proteinin hücrede toksik etkiye sahip olması ise sistemin dezavantajını oluşturmaktadır. Ancak, bu sistemle elde edilen vektör virionlarla bölünen veya bölünmeyen geniş bir hücre yelpazesini infekte etmek mümkündür (49, 50). İnsanı infekte etmeyen virus'lara (Non-human viruses) ait zarf proteinleri ile farklı zarf proteinleri ile virus eldesi (pseudotyping) çalışmaları yeni çalışmaların alanı olarak devam etmektedir.

HIV ismi ve doğası gereği, HIV derive lenti-vektörlerin gen tedavisinde kullanımında bazı endişeler bulunmaktadır. Lenti vektör derive ve oldukça iyi disekte edilmiş olsa da bütün parçaların yeniden birleşerek infeksiyöz özelliğine sahip rekombine hale gelme olasılığı yaygın bir endişedir. Ancak, birinci jenerasyon lenti vektörlerde dahi günümüze kadar bildirilen böylesi bir rekombinasyon bildirilmemiştir. İkinci jenerasyon lenti vektörlerde oldukça iyi disekte ve en önemlisi 3-UTR LTR kısmında self-replikasyonu yapan elementler yok (deleted) edilmiştir. Üçüncü jenerasyonda ise LTR elementler kaldırılarak tat bağımlı vektörlerden tamamıyla uzaklaşmıştır. Transgenik RNA'yı LTR yerine hücresel bir promoter eksprese

etmektedir. İkinci ve üçüncü jenerasyon plazmidler HIV için gerekli olan yapı elemanlarını içermemektedir. Günümüzde bu tip vektörler gen tedavi amaçlı araştırmalarda kullanılmaktadır.

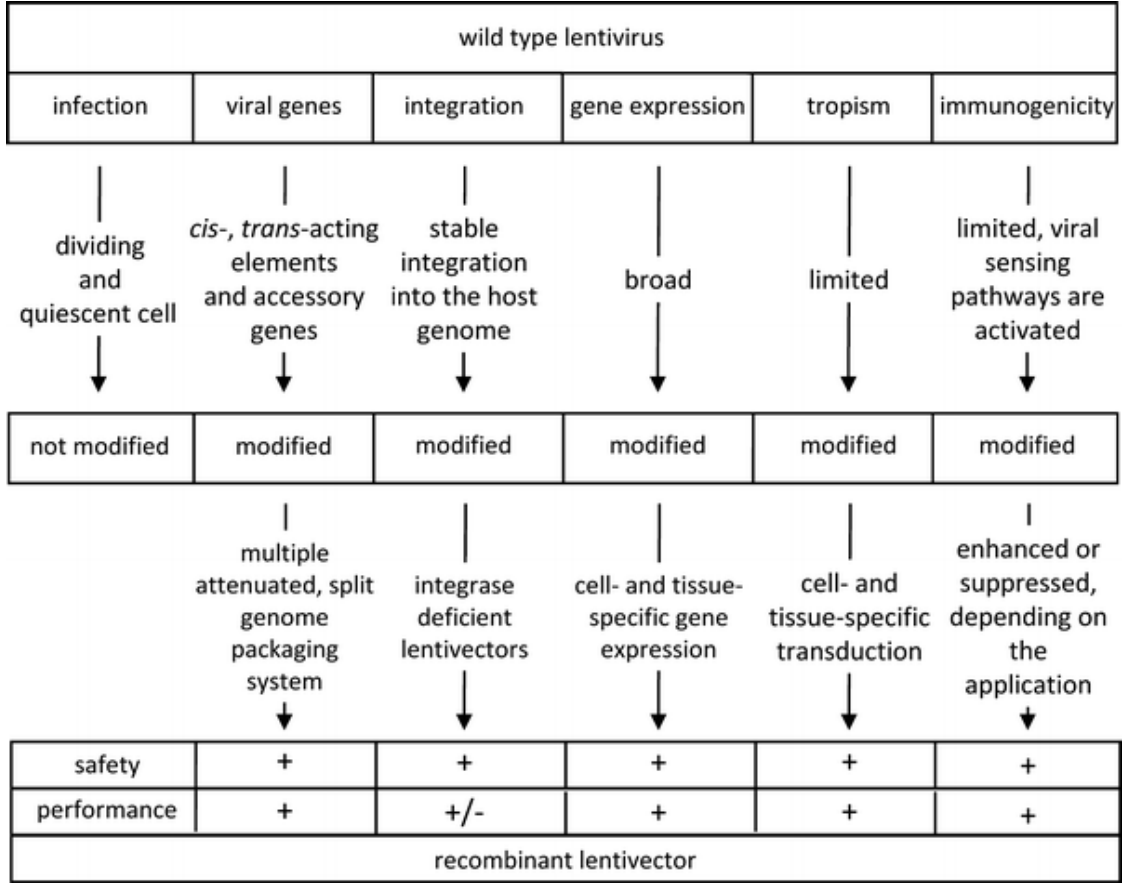
Lentiviral vektörlerin gen tedavi amaçlı kullanımı için genellikle lentivektör parçacıklarının üretimi üç farklı plazmidin insan embryonik hücre soyuna (293T) birlikte transfekte edilmesi (co-transfection) ile sağlanır (Şekil 2.2.1). Bu işlemlerde kullanılan plazmidler; paketleme plazmid, transfer plazmid ve zarf-kodlayan plazmid olmak üzere farklı işlevlere sahiptirler. Yeni lentivektör tasarım sistemlerinde ise tat ve rev genleri paketleme plazmidini yerine dördüncü bir plazmid aracılığıyla viral partiküllerin üretimine katılırlar (50).



**Şekil 2-5:** Lentiviral plazmidler ve lentivektör tasarımı (51)

Lentivektörler üretimlerinde kullanılan paketleme plazmidlerine göre “nesiller” halinde sınıflandırılmışlardır. Birinci nesil paketleme plazmidleri tüm gag ve pol dizileri ile birlikte viral düzenleyici genler ve ek genleri içerirken, ikinci nesilde plazmidin içerdiği ek genler (vif, vpr, vpu ve nef) çıkarılarak daha sade bir tasarım oluşturulmuştur. Üçüncü nesil paketleme plazmidlerinde ise rev geni ek bir plazmide aktarılırken, transfer vektöründeki 5' LTR kısmı tat-bağımsız bir promoter ile değiştirilmiştir. Rekombinant lentivirüslerin geliştirilmesi ve bu yaklaşımların güvenlik ve verim üzerinden değerlendirilmesi Şekil 2.2.1b verilen tabloda mevcuttur (51).





Şekil 2-6: Lentiviral vektör geliştirme yöntemleri, güvenlik ve verim karşılaştırması (47)

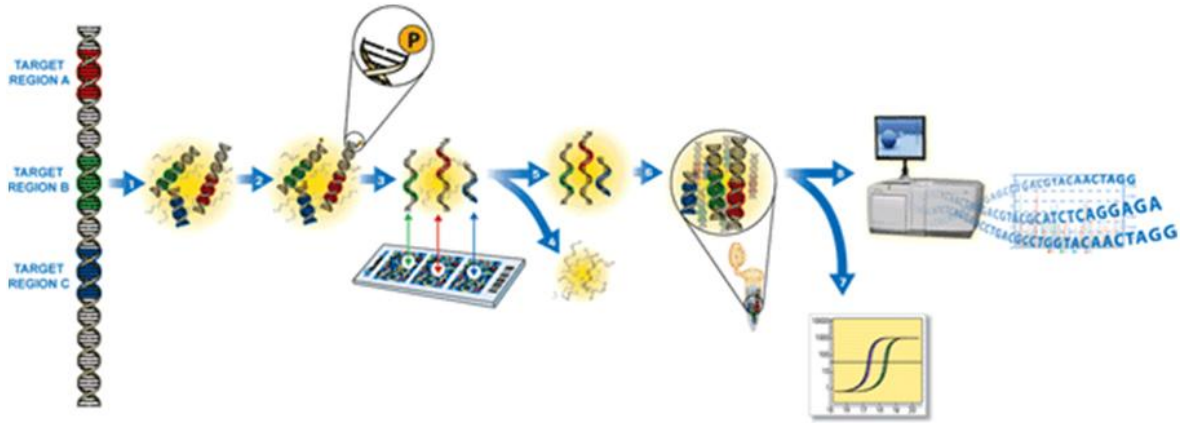
### 2.3. 293T ve K562 Hücre Soyları

293T hücre soyu, HEK 293 hücre soyunun derivatlarından biridir. HEK 293 insan embriyonik böbrek hücrelerinin adenovirüs 5 DNA ile transforme edilmesiyle oluşturulmuştur. HEK 293 hücre soyu pek çok derivatifi olan bir hücre soyudur. 293T hücreleri lentivirüs üretimi ve lentiviral vektör kökenli gen terapisi çalışmalarında sıkça kullanılan hücre soylarından biridir (6, 8). 293T hücreleri Simian virüs 40 (SV40) büyük T antijeni içeren ve sürekli eksprese eden hücrelerdir (52). Yapılan çalışmada SV40 integrasyon bölgesi içerdiği bilinen bu hücre soyu kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan K562 hücre soyu, kronik miyeloid lösemili 53 yaşındaki kadın hastadan elde edilen lösemi hücre soyudur. Bu hücre popülasyonları diferansiye olmamış ve granülositik serilerle karakterizedirler. K562 hücreleri gen terapisi çalışmalarında kullanılan immortalizasyon aşamalarında DNA tümör virüsleri kullanılmış hücrelerdir ve bu çalışmada vektör profilleri incelenmiştir (53).

#### 2.4. Hedefli dizi yakalama yöntemi

Hedefli dizi yakalama yöntemi, bir DNA veya RNA havuzundan özel bir amaç için sadece istenen dizinin çekilerek ayrılması olarak tanımlanabilir. Bu yöntem genetikte pek çok uygulamanın temelini oluşturmaktadır (54).



Şekil 2-7: Hedefli dizi yakalama metodu (54)

Hedefli dizi yakalama metodunda elde edilen genomik DNA küçük parçalara ayrıldıktan sonra standart FLX kütüphanesi oluşturma işlemi ile diziler adaptörlere bağlanıp bir DNA havuzu oluşturulur. Oluşturulan bu DNA havuzundan istenen diziler bu dizilere tamamlayıcı problemler yardımıyla alınır, geriye kalan diziler yıkanıp atıldıktan sonra elde edilen bu fragmanlar dizilerek analiz edilir (55).

Bilimsel çalışmanın ilerleyebilmesi sadece istenen moleküllerin diğerlerinden ayrılmasını gerektirdiğinde, bu yöntemin işlevi daha belirgin hale gelmekte ve kullanılması kaçınılmaz olmaktadır. Hedefli dizi yakalama metodunun işleyiş mantığı ile virüs integrasyon bölgelerinin tespiti üzerine yapılan çalışmalarda verim artırma isteği arasındaki bağ dikkatlerden kaçırılmaması gereken önemli bir noktadır. Hedefli dizi yakalamanın buradaki işlevi şu anda hala çok masraflı olan tüm genom dizilemesinin önceden yapılan düzenlemelerle makul maliyetlere indirilmesini de sağlar. İlgilenilen bölgeler sadece kimerik integrasyon bölgeleri olduğundan bu bölgelerin yeni nesil dizileme öncesi seçilerek geriye kalan DNA'dan ayrılması ve daha

sonra dizileme ve analiz aşamalarına geçilmesi hem elde edilen sonuçların verimi ve analizi hem de maliyet açısından önemli avantajlar sağlamaktadır.

## 2.5. Yeni Nesil Dizileme

Yeni nesil dizileme teknolojileri, DNA dizilemesi alanında çığır açarak bu alanın çok hızlı bir şekilde büyümesini sağlamıştır. Geliştirilen teknolojilerin uygulama alanları gün geçtikçe artmakta ve bu durum bilimsel çalışmalardan elde edilen bilginin genişlemesinin önünü açmaktadır.

İlk “high throughput” dizileme teknolojisinin geliştirilmesinden kısa süre sonra yeni teknolojilerle alandaki rekabetin hızlanması sağlanmış ve bu durum yapılan çalışmaların çerçevesinin de farklılaşmasına ve disiplinler arası projelerin yaygınlaşmasına neden olmuştur (9).

Yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak insan, bakteri, bitki, virüs gibi pek çok farklı organizmanın genomu hızlı ve doğru bir şekilde dizilenebilmektedir. “Shotgun” dizileme metodu uzun DNA parçalarının dizilenebilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemde büyük boyutlardaki DNA fragmanları yaklaşık 300-800 bp arasında olacak şekilde fiziksel yöntemlerle (sonikasyon, nebulizasyon, vb.) parçalanır, oluşan küçük parçaların uçlarına adaptörler takılarak DNA yakalama boncuklarına tutturulurlar. Oluşturulan DNA Kütüphanesi her bir boncuğun üzerindeki dizinin çoğaltılıp dizilenmesi ile okunmuş olur ve biyoinformatik yöntemlerle analiz edilerek birleştirilir. Bu yöntem kullanılarak *Drosophila melanogaster* (56) ve *Haemophilus influenzae* (57) ve insan genomları (58) dizilenmiştir.

Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri GS FLX 454, Illumina Genome Analyzer, Applied Biosystem SOLID, Helicos, Pacific Biosciences ve Ion Torrent PGM’dir.

Bu sistemlerden FLX 454 teknolojisi ortalama fragman uzunluğu en ileri teknoloji olarak, kimerik DNA dizilerinin dizilenmesi açısından en uygun teknolojiye sahiptir. Bu sistemin kullandığı yöntem “pirodizileme” olarak bilinir. Bu yöntem 1996 yılında Ronaghi ve arkadaşlarının sentez yoluyla dizileme fikrini geliştirmesi ile ortaya çıkmıştır (59). Pirodizileme getirdiği düşük maliyet ve büyük miktarda bilgi üretme avantajları ile klasik Sanger dizilemenin yerini almıştır.

Pirodizileme DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespiti prensibine dayanır. Dizileme reaksiyonu tek iplikli DNA (ssDNA) dizisinin üzerine tamamlayıcı dizinin sentezlenmesi ile gerçekleştirilir. Öncelikle çift iplikli DNA molekülünün 300-800 baz çifti dizilere nebulizasyon işlemi ile parçalanması gerçekleştirilir. Adaptörleri taşıyan DNA fragmanlarının mikroreaktörler içerisinde emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu (emPZR) gerçekleştirilir. Bu aşama sonucunda yaklaşık 10 milyon kopyaya çıkarılmış DNA dizileri, yaklaşık 3.6 milyon kuyu içeren özel bir plate üzerinde sentez yoluyla dizileme tekniği kullanılarak dizilenir. Dizileme primeriyle sabitlenen tek iplikli kalıp DNA üzerine ardışık olarak bakan A, C, G, T nükleotidlerinin kalıp DNA'ya tamamlayıcı olması durumunda bu nükleotidler DNA polimeraz tarafından tamamlayıcı diziye eklenir ve ortamda bir ışık oluşur. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotidin varlığında oluştuğu tespit edilir. Sabitlenen ssDNA, DNA polimeraz, ATP sülfirilaz, lüsiferaz, apiraz, APS ve lüsiferin ile inkübe edilir. Nükleotid akışı sırasında tamamlayıcı nükleotidin gelmesi durumunda DNA polimeraz pirofosfat (PPi) açığa çıkmasını sağlar. ATP sülfirilaz bu PPi'ı kantitatif olarak ATP'ye dönüştürür. ATP, lüsiferaz enzimi aracılığıyla lüsiferinin oksilüsiferine dönüşmesini sağlar. Oksilüsiferin görülebilir bir ışık yaratır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarı ile doğru orantılıdır ve bu sayede dizi üzerindeki tek nükleotid tekrarları (homopolimer) tespit edilebilir. Ortaya çıkan ışık CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar programları yardımıyla DNA dizilerine dönüştürülür (60).

Yeni nesil dizileme teknolojileri; üretilen bilgi miktarı, hız ve maliyet açısından çok önemli avantajlara sahiptir. Bu teknolojiler sayesinde hücre içerisindeki tüm genom kompozisyonu anlaşılabilen ve analiz edilebilmektedir. Hedeflenen bölgeler hızlı bir şekilde taranarak, doğru ve geniş perspektifli bir bakış açısı yakalanabilmektedir. Yeni nesil dizileme viral integrasyon bölgelerinin tespiti alanında da kullanılabilen ve bu alanın gelişmesine önemli katkılar sunan bir teknolojidir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

K562 ve 293T hücre soyları ve pLVTHM lentiviral vektörü bu çalışmada kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

Yapılan çalışmada K562 ve 293T hücrelerinin kültürü yapılmış ve bu hücreler pLVTHM vektörü ile transdükte edilmiştir.

##### 3.2.1. K562 Hücre Soy

Bu çalışmada kullanılan K562 hücre soyu, kronik miyeloid lösemili 53 yaşındaki kadın hastadan elde edilen lösemi hücre soyudur. Bu hücre popülasyonları diferansiye olmamış ve granülositik serilerle karakterizedir. İnsan kronik myeloid lösemi hücre soyu K-562 (ATCC CCL-243); 10% fetal calf serum, 200 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin ilave edilen RPMI 1640 medyumunda 37 °C'de, 95% hava ve 5% CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir ve pasajlanmıştır.

##### 3.2.2. 293T Hücre Soy

293T hücre soyu, HEK 293 hücre soyunun derivatiflerinden biridir. HEK 293 insan embriyonik böbrek hücrelerinin insan adenovirüs 5 DNA ile tranforme edilmesiyle oluşturulmuştur. 293T hücreleri 10% fetal calf serum, 200 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin ilave edilen RPMI 1640 medyumunda 37 °C'de, 95% hava ve 5% CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir ve pasajlanmıştır.

##### 3.2.3. Donmuş Hücre Soyunun Çözülmesi

-80 °C'de saklanan K562 ve 293T hücre soylarını içeren tüpler çıkarıldıktan sonra 37 °C'deki su banyosuna konulup 1-2 dakika su banyosunda eridikten sonra 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Üzerine yavaşça 4 ml'lik kültür medyumunu eklenip 100 ul ayrılarak hücre sayımı yapılmıştır. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası medyum uzaklaştırılmış ve yukarıda özellikleri belirtilmiş taze medyuma  $1 \times 10^5$

hücre içerecek şekilde flaslara dağıtılmıştır. 37 °C’de, 95% hava ve 5% CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir ve pasajlanmıştır.

### 3.2.4 K562 ve 293T Hücrelerinin Pasajlanması

Inkübatörde flaslarda çoğaltılan hücreler günlük olarak ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Hücre sayısı pasaj için uygun olacak kadar çoğaldığında, hücreler hafifçe çalkalandıktan sonra pipetle 50 ml’lik falkonlara alınmış ve 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine 10 ml RPMI 1640 eklenmiştir. Homojen dağılımı sağlanacak şekilde karıştırılıp hücre sayım cihazında (*Vi-cell XR cell viability analyzer, Beckman coulter inc. Brea, CA, USA*) sayımları yapılmış ve 1x10<sup>6</sup> hücre hesaplaması yapılarak medyumda çözülerek flaslara dağıtılmıştır. 37 °C’de, %95 hava ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir ve pasajlanmıştır.

### 3.2.5. Hücrelerin pLVTHM Lentiviral Vektörü ile Transdükte Edilmesi

293T hücre hattı aşağıdaki protokol ile tranfekte edildi:

1.gün: 2.5x10<sup>6</sup> 293T hücreleri %10 FBS serum, %1 L-glutamin, penisilin/stertomisin içeren MEM besi yerinde % CO<sub>2</sub> de 37OC de inkübe edildiler.

2.gün: Roche HD-FuGe ile,

Transfer vektörü:.....20 ug

Packaging plasmid.....15 ug (pax2 10 ug+pRSV-Rev 5 ug)

Zarf plasmidi.....6 ug (VSV-G)

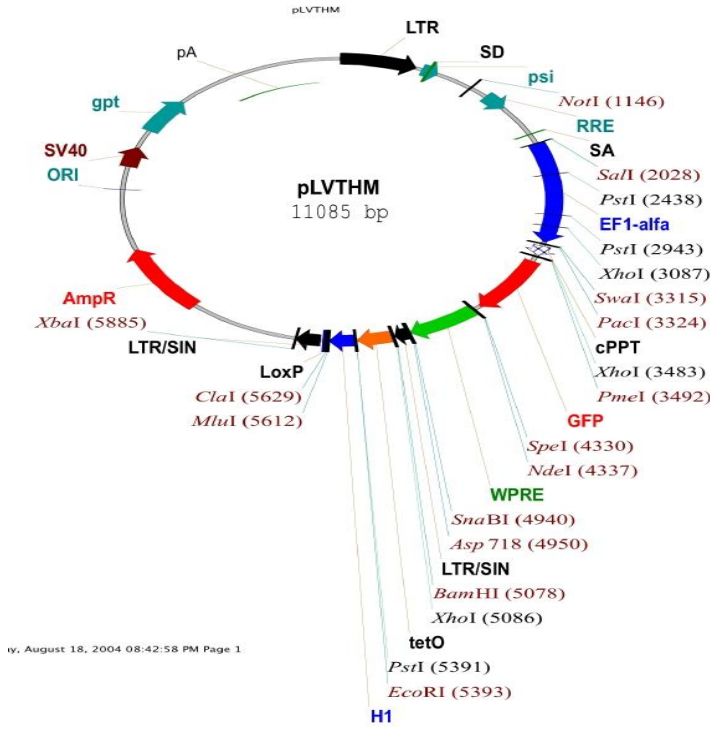
CaCl<sub>2</sub>(2.5 M).....50 ul

ile tarnsfekisyonu gerçekleştirdik. 6-8 saat sonra medyum yavaşça pasteur pipeti ile alınıp taze medyum ile değiştirildi.

3.gün: Hücrelerin üzerisindeki medyum alınıp, 0,22 mikronluk filtreden geçirildikten sonra buz dolabında saklandı.

4.gün: Hücrelerin üzerisindeki medyum alınıp, 0,22 mikronluk filtreden geçirildikten sonra konsantrasyon işlemine geçildi. İst. Tıp Fak. Temel Bilimler Biyokimya A. B. Dalı’nda bulunan, Beckman konik tüpler konularak Beckman SW28

swingle bucket rotorda 26.000 rpm 2 saat 4<sup>0</sup>C işleme tabi tutuldu. Supernatant atıldıktan sonra serumsuz medyum ortamında 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine bölünerek -80<sup>0</sup>C de saklandı.



Şekil 3-1: pLVTHM vektörünün yapısı (61)

### 3.2.6. Transdükte Edilen Hücrelerin Belirlenmesi ve Ayrılması (FACS)

pLVTHM+GFP transfeksiyonu sonrası 40x fazkonstrat invert floresans mikroskopla almış olduğumuz GFP pozitif görünüm sonrası hücreler İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalın'da bulunan FACSAria II (BD Biosciences) ile akım sitometri sonucu GFP pozitif hücreler ayrıştırıldı. Ayrıştırılan hücre hemen kültüre edildi.

### 3.2.7. Genomik DNA İzolasyonu

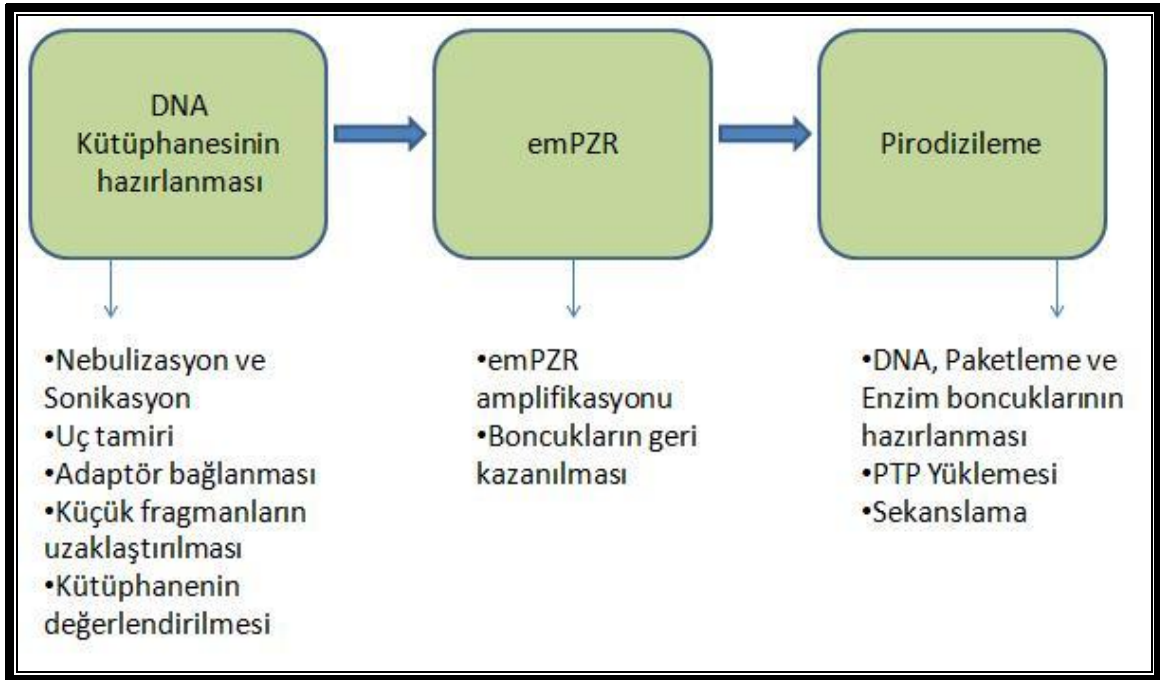
pLVTHM vektörü ile transdükte edilen K562 ve 293T hücrelerinin genomik DNA'sı Qiagen DNA Blood Maxi Kit kullanılarak izole edilmiştir ve her hücre soyu için 20 ug genomik DNA, parçalarını yakalama işlemi için NimbleGen firmasına gönderilmiştir.

### 3.2.8. Hedefli Dizi Yakalama

pLVTHM vector (Şekil 3-1) DNA dizisinin bütününe (11085 bp) 45 bp uzunluğunda örtüşen (overlap) problr dizayn ettirilerek DNA yakalama (Capture) Nimblegen firmasına yaptırıldı (Roche Nimblegen, Madison, WI).

### 3.2.9. Yeni Nesil Dizileme

Sekanslama aşamasında; Roche GS FLX sistemi kullanılmıştır. Farklı ve birçok protokollerin bir bütünü olan bu sistemde firmanın önerdiği protokol uygulanmış ve hedefli dizi yakalama ile elde edilen DNA'nın yüksek hız ve yüksek doğrulukta dizilenmesi amaçlanmıştır. Sekanslama aşamasında izlenecek iş akış şeması Şekil 3-2'de gösterilmiştir.



Şekil 3-2: Dizileme aşamasında iş akışı

#### 3.2.9.1. DNA Kütüphanesinin Hazırlanması

##### 3.2.9.1.1 DNA'nın Fragmanlara Ayrılması (Nebulizasyon)

Bu aşamada DNA'nın 300 – 800bç uzunluğunda olacak şekilde fragmanlara ayrılması sağlanmıştır. Nebulizasyon yapılmak üzere örneklerden 1µg daha alındı ve TE tamponu ile 100µl'ye tamamlandı. Üzerine 500µl Nebulizasyon tamponu eklendi ve 30psi'de nebulize edildi. Sonikasyon yapılan örneğin üzerine 500µl, Nebulizasyon



yapılan örneğin üzerine 2,5ml PBI Tamponu eklendi ve “Qiagen MinElute PCR Purification Kit” Protokolüne başlandı. Örneklerin tamamı kolonlarda filtre edilene dek 15 saniye, 13000rpm’de santrifüj edildi. Alta geçen filtrat atıldı. 750µl PE Tamponu eklendi, 1 dakika 13000rpm’de santrifüj edildi ve filtrat atıldı. 1 dakika daha 13000rpm’de santrifüj edildi, tüp 180° döndürülüp bir kez daha 1 dakika, 13000rpm’de santrifüj edildi. Yeni ve steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilen kolonların üzerine 16µl TE tamponu eklendi ve 1-2 dakika beklendi. 13000rpm’de santrifüj edildi. Alta geçen örnek 200µl’lik steril tüpe alındı.

### 3.2.9.1.2. DNA Uçlarının Tamiri

Bu işlemin amacı, 300-800 bp uzunluğunda elde edilen DNA fragmanlarının uçlarının T4 DNA polimeraz ve T4 Polinükleotid Kinaz ile küt hale getirilmesini sağlamaktır. Bu şekilde hazırlanan uçlara spesifik küçük adaptörlerin eklenmesi kolaylaştırılmaktadır.

Her bir örneğe 9µl Uç Tamiri karışımı (Tablo 3-1) eklendi. Hemen ardından örnekler PZR cihazına yerleştirilip Uç tamiri programı (Tablo 3-2) başlatıldı.

**Tablo 3-1:** Uç tamiri karışımı

Miktar	Malzeme
5 µl	10X PNK Tamponu
5 µl	ATP
2 µl	dNTP
2 µl	T4 Polimeraz
2 µl	Taq Polimeraz
2 µl	T4 Polinükleotid Kinaz

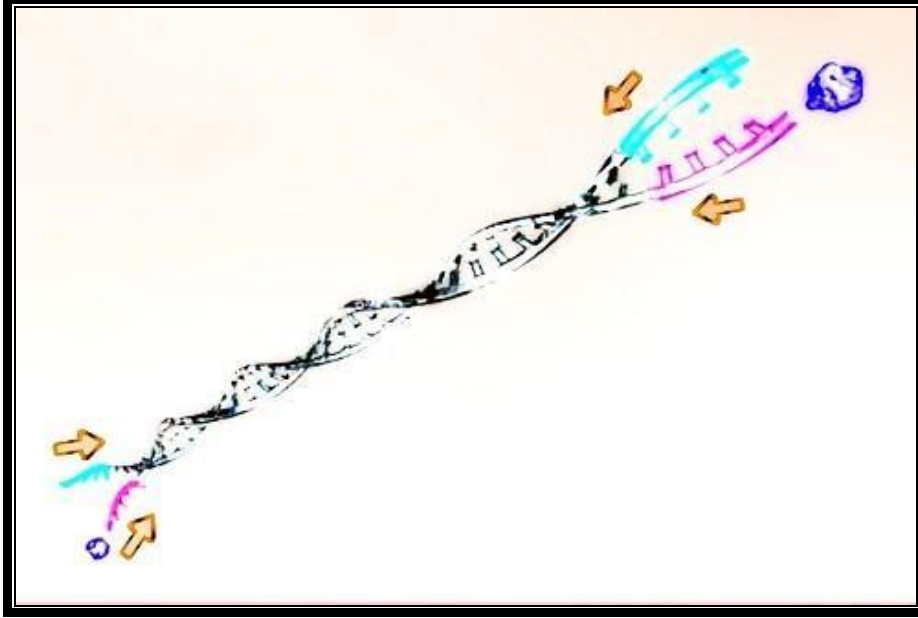
**Tablo 3-2:** Uç tamiri programı

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
25	20
72	20
4	∞

### 3.2.9.1.3 Adaptör Bağlanması

Bu işlem parçalanmış ve uçları törpülenmiş DNA fragmanlarının 3’ ve 5’ uçlarına adaptör adı verilen sekansların eklenmesini sağlamaktadır. (Şekil 3-3)

Adaptör A ve Adaptör B, amplifikasyon ve nukleotid dizilemesi için gerekli primer bölgelerini içeren ve yakalama boncuklarına bağlanmayı sağlayan çift zincirli oligonükleotidlerdir. (Tablo 3-3)



**Şekil 3-3:** Fragmanlara Adaptör Dizilerin Bağlanması (62)

Uç tamiri programı tamamlandığında reaksiyon tüplerine 1µl RL Adaptör eklendi. Her bir tüpe 1µl RL Ligaz eklendi. 5 saniye vortekslendi ve 2 saniye spin santrifüj yapıldı. PZR cihazında, 25°C’de 10 dakika inkübe edildi.

**Tablo 3-3:** Adaptör sekansların baz dizilimi

	<b>Adaptör Sekansı</b>
<b>Adaptör A</b>	5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-3'
<b>Adaptör B</b>	5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-3'

#### **3.2.9.1.4. AMPure Boncuklarının Hazırlanması ve Küçük Fragmanların Uzaklaştırılması**

- AMPure Boncuk şişesi içindeki boncuklar tamamen homojen dağılına kadar vortekslendi.
- 1,7ml mikrosantrifüj tüplerine 125µl AMPure Boncuk dağıtıldı. Tüpler MPC’ye (Magnetic Particle Concentrator) yerleştirildi.
- Boncuklar tamamen tüpün kenarına yapıştığında, boncuklara değmeden süpernatant çekilip atıldı.

- Boncukların üzerine 163µl TE Tamponu eklendi, MPC'den kaldırılıp 5 saniye vortekslendi.
- 500µl Boyutlandırma Solüsyonu eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- Ardından mini santrifüjde 2 saniye spin yapıldı.
- Tüpler buzda bekletildi. İnkübasyon sonrası alınan örneklerle hazırlanan ve buzda bekleyen AMPure boncuklar eklendi.
- 5 saniye vortekslenip mini santrifüjde 2 saniye spin edildi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından MPC'ye yerleştirildi.
- Boncuklar tamamen tüpün kenarına yapıştığında, boncuklara değmeden süpernatant çekilip atıldı. 190µl TE Tamponu eklenip 5 saniye vortekslendi.
- 500µl Boyutlandırma Solüsyonu eklenip 5 saniye vortekslendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından MPC'ye yerleştirildi.
- Boncuklar tamamen tüpün kenarına yapıştığında, boncuklara değmeden süpernatant çekilip atıldı.
- 190µl TE Tamponu eklenip 5 saniye vortekslendi. 500µl Boyutlandırma Solüsyonu eklenip 5 saniye vortekslendi.
- 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından MPC'ye yerleştirildi. Boncuklar tamamen tüpün kenarına yapıştığında, boncuklara değmeden süpernatant çekilip atıldı.
- Tüpler MPC üstünde olduğu halde pellete dokunmadan 1ml %70 etanol ile yıkandı, 30 saniye beklendi ve etanol tamamen uzaklaştırıldı. Bu aşama bir kez daha tekrar edildi. MPC üstündeki tüplerin kapağı açıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika, pelletin kuruması beklendi.
- Tüp MPC'den kaldırıldı ve 53µl TE Tamponu eklendi. 5 saniye vortekslendi ve mini santrifüjde 2 saniye spin yapıldı.
- Tekrar MPC'ye yerleştirilip boncukların tamamen tüpün duvarına yapışması beklendi. Boncuklara dokunmadan, DNA kütüphanemizi içeren süpernatanttan 50µl alındı ve yeni, steril 1,7ml mikrosantrifüj tüpüne konuldu.

#### **3.2.9.1.5 DNA Kütüphanesinin Sayısal Değerlendirilmesi**

- RL Standartlarını hazırlamak üzere 8 TBS tüpü alındı. İlk tüpe 90µl RL Standart ve 90µl TE tampon çözeltisi ilave edildi karıştırıldı.

- Diğer 7 tüpe 60µl TE tampon çözeltisi eklendi. Birinci tüpten 120 µl alınarak ikinci tüpe aktarıldı ve 5 dakika vorteksleme işlemi yapıldıktan sonra 2 saniye spin işlemi uygulandı.
- Geriye kalan 6 tüp için bu seyreltme işlemi tekrarlanarak gittikçe azalan miktarlarda RL standartının hazırlanması sağlandı.\_Hazırlanan standartların her birinin 50µl'si 8 ayrı küvete alındı.
- BLANK okutmak için 50µl TE tampon çözeltisi da ayrı bir küvete alındı.
- TBS 380 Fluorometer (Turner Biosystem) cihazı kullanılarak önce hazırlanan standartlar okutuldu ve standart eğrisinin çizilmesi sağlandı.
- Daha sonra örnekler okutuldu. Sonuçlar Rapid Library Quantitation Calculator uygulaması kullanılarak hesaplandı. Bir sonraki aşamada gerekecek olan  $10^7$  adet DNA fragmanı alınabilmesi için gerekli olan örnek miktarları belirlendi.

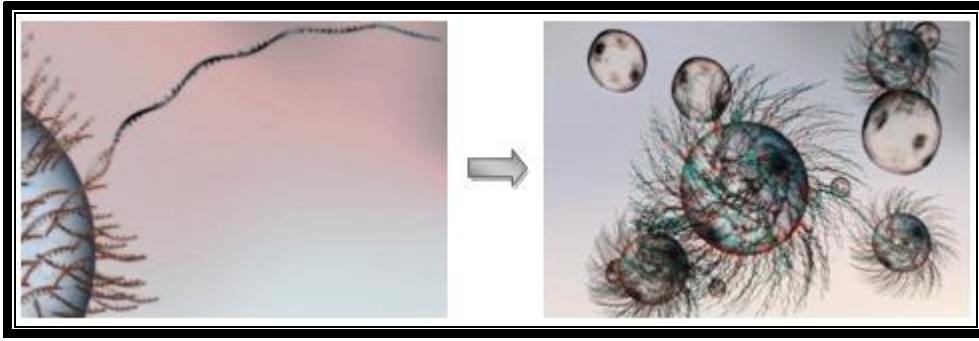
#### **3.2.9.1.6. DNA Kütüphanesinin Kalite Değerlendirmesi**

Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ve Agilent High Sensitivity DNA Kit kullanılarak kütüphanenin kalite değerlendirilmesi yapıldı.

- Çip hazırlama düzeneği ve şırıngası monte edildi.
- High Sensitivity DNA jel matriksinin tamamının üzerine 15µl High Sensitivity DNA boyası eklendi.
- Vorteksledi ve minisantrifüjde spin yapıldı.
- Karışım filtreli tüpe aktarıldı.
- 2240 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve ışıktan korunacak şekilde +4°C'ye kaldırıldı.
- Karışımın içinden 9µl, çip üzerindeki ilgili kuyuya yüklendi.
- 1ml seviyesinde bekleyen şırıngaya 60 saniye süreyle basıldı ve böylece karışımın çip içerisindeki kanallara dağılması sağlandı.
- Belirtilen diğer kuyulara da 9µl karışım yüklendi.
- Örnek ve Ladder kuyularının her birine 5µl Marker yüklendi.
- Belirtilen kuyuya 1µl High Sensitivity DNA ladder yüklendi.
- Geriye kalan kuyulara örnekler yüklendi.
- Çipe uygun dizayn edilmiş vortekste 2400rpm'de 1 dakika vorteksledi.
- Agilent 2100 BioAnalyzer cihazına yerleştirildi ve program başlatıldı.

### 3.2.9.2. emPZR

DNA Kütüphanesi hazırlandıktan sonra elde edilen fragmanlar, 1 yakalama boncuğuna 1 fragman gelecek şekilde hesaplanıp boncukların ve fragmanların birbirlerine bağlanması sağlanır. Ardından bu boncuklar yağ içerisinde su karışımı olacak şekilde emülsifiye edilir. Böylece her bir yakalama boncuğu PZR amplifikasyonunun gerçekleşeceği bir mikroreaktör içine hapsedilmiş olur. PZR amplifikasyonundan sonra mikroreaktörler kırılır ve yağdan temizlenir. Amplifiye olmuş boncuklar pirodizileme aşamasında kullanılmak üzere ayrılır. (Şekil 3-4)



Şekil 3-4: emPZR' da amplifiye olmamış ve amplifiye olmuş yakalama boncukları (62)

#### 3.2.9.2.1 emPZR Amplifikasyonu:

- Emülsiyon yağı kapları TissueLyzer cihazına yerleştirildi ve 2 dakika 28Hz'de çalkalandıktan sonra cihazdan alındı.
- Her iki Emülsiyon yağı kabına 5µl Mock Mix çalışma solüsyonu eklendi.
- 2 – 3 defa alt-üst edilip TissueLyzer'a yerleştirildi.
- 28Hz'de 5 dakika çalkalandı ve cihazdan alındı ve Live Amplifikasyon karışımı hazırlandı. (Tablo 3-4)

Tablo 3-4: Live amplifikasyon karışımı içeriği

Miktar	Malzeme
2100 µl	Su
3000 µl	emPZR İlavesi
1720 µl	5X Amplifikasyon Karışımı
600 µl	Amplifikasyon Primeri
400 µl	emPCR Enzim Karışımı
10 µl	PPiaz

- Hazırlanan karışım 5 saniye vortekslendi ve buz üstünde bekletildi.
- Yakalama boncuğu tüpleri vortekslendi, spin yapıldı ve supernatant atıldı.
- Tüpler, 1X Yakalama Boncuğu Yıkama Tamponu TW ile iki kez yıkandı. Her yıkamada 1ml 1X Yakalama Boncuğu Yıkama Tamponu TW eklendi, vortekslendi, spin yapıldı ve süpernatant atıldı.
- Hazır olan DNA Kütüphanesi 95°C’de 2 dakika denature edildikten sonra 4°C’ye alındı.
- Hazırlanan DNA kütüphanelerinin TBS-380 ölçümlerine göre aşağıdaki denklem (Şekil 3-6) kullanılarak her bir tüpte kullanılacak DNA kütüphanesi miktarı belirlendi. Hesaplama sonucunda, %10 zenginleştirme olacak şekilde, kütüphaneden 45,5µl alındı.

$$\text{Her tüpteki kütüphane } (\mu\text{l}) = \frac{(\text{Boncuk başına istenen molekül}) \times (\text{Tüp başına } 35 \cdot 10^6 \text{ boncuk})}{\text{Kütüphane konsantrasyonu (Molekül}/\mu\text{l})}$$

**Şekil 3-5:** Her bir tüpte kullanılacak DNA Kütüphanesinin hesaplanması

- 5 saniye vortekslendi ve DNA Yakalama Boncukları ve kütüphaneler 15ml’lik tüplere alındı.
- Her tüpe 3,75ml Live Amplifikasyon Karışımı eklendi. Vortekslendi.
- 15ml’lik tüpteki boncuklarca yakalanmış kütüphane, Emulsiyon kabına aktarıldı.
- Kap 3 kez alt-üst edildi.
- TissueLyzer’a yerleştirilen kaplar 12Hz’de 5 dakika çalkalandı.
- Yağ, karışım ve boncuklar emulsifiye edildikten sonra 96 kuyulu plate’e kuyu başına 100µl olacak şekilde dağıtıldı.
- Kuyular şeffaf film ile sıkıca kapatıldı.
- PZR cihazına yerleştirildi ve emPZR reaksiyonu başlatıldı (Tablo 3-5)

**Tablo 3-5:** emPZR reaksiyonu koşulları

<u>Döngü Sayısı</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
1X	94°C	4 dakika
50X	94°C	30 saniye
	60°C	10 dakika
	10°C	∞

### 3.2.9.2.2. Amplifiye Olmuş Boncukların Geri Kazanılması

- Reaksiyonu biten platelerin her biri bir adet SOLID Emulsion Collection Tray denen kaplara ters olarak yerleştirildi ve 130 x g'de 4 dakika santrifüj edildi. Böylece kuyuların içindeki karışım tamamen bu kaplara alınmış oldu.
- Bu kaplarda toplanan emulsiyon yeteri kadar isopropanol ile karıştırılıp pipetaj yapılarak 50ml'lik tüplere alındı ve toplam hacim isopropanol ile 40ml'e tamamlandı.
- Tüpler 930 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve boncuklar çöktürüldü. Süpernatant dikkatlice atıldı.
- 35ml Enhancing Fluid XT eklendi ve vortekslendi. çöken boncuklar dağıtıldı.
- Tüpler 930 x g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 35ml isopropanol eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler 930 x g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 35ml isopropanol eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler 930 x g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 35ml ethanol eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler 930 x g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 35ml Enhancing Fluid XT eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler 930 x g'de 5 dakika santrifüj edildi, 2ml kadar Enhancing Fluid XT kalacak şekilde süpernatant atıldı.

- Bir emulsion kabı için 2 tane 1.7ml'lik tüp olacak şekilde tüpler hazırlandı ve boncuklar bu tüplere alındı.
- Bütün boncuklar bu tüplerde toplandıktan sonra üzerlerine 1ml Enhancing Fluid XT eklendi ve vortekslendi, spin yapıp supernatant atıldı.
- Her tüpe 1ml Melt solüsyonu eklendi ve vortekslendi
- 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi, spin yapıldı, supernatant atıldı.
- Her tüpe 1ml Annealing Tamponu XT eklendi ve vortekslendi, spin yapıldı ve supernatant atıldı.
- Her tüpe 45µl Annealing Tamponu XT ve 25µl Enrichment Primeri eklendi. Vortekslendi.
- 65°C'de 5 dakika bekletildi ve hemen ardından 2 dakika buz üstüne alındı.
- 800µl Enhancing Fluid XT eklendi ve vortekslendi.
- Spin yapıldı, süpernatant atıldı.
- Her tüpe 1ml Enhancing Fluid XT eklenerek vortekslendi. Spin yapıldı, süpernatant atıldı. Bu aşama bir kez daha tekrar edildi.
- Her tüpe 800µl Enhancing Fluid XT eklendi ve vortekslendi.
- DNA boncuklarını içeren her tüpe 80µl yıkanmış Enrichment boncukları eklendi ve vortekslendi.
- Rotator'a yerleştirilen tüpler 5 dakika oda sıcaklığında döndürüldü.
- Tüpler MPC'ye yerleştirildi ve enrichment boncukları tamamen yapışana kadar bekledi.
- Enrichment boncuklarına dokunmadan süpernatant çekilip atıldı.
- Süpernatant'ta hiç DNA boncuğu kalmayacak şekilde enrichment boncukları aşağıda belirtildiği gibi yaklaşık 10 defa yıkandı.
- Her tüpe 1ml Enhancing Fluid XT eklendi ve vortekslendi.
- Tüpler MPC'ye yerleştirildi ve boncukların tüpün duvarına yapışarak pellet oluşturması sağlandı.
- Kenara yapışan Enrichment boncuklarına dokunmadan süpernatant çekilip atıldı.
- Tüpler MPC'den kaldırıldı ve 700µl Melt solüsyonu her bir tüpe eklendi. Vortekslendi.



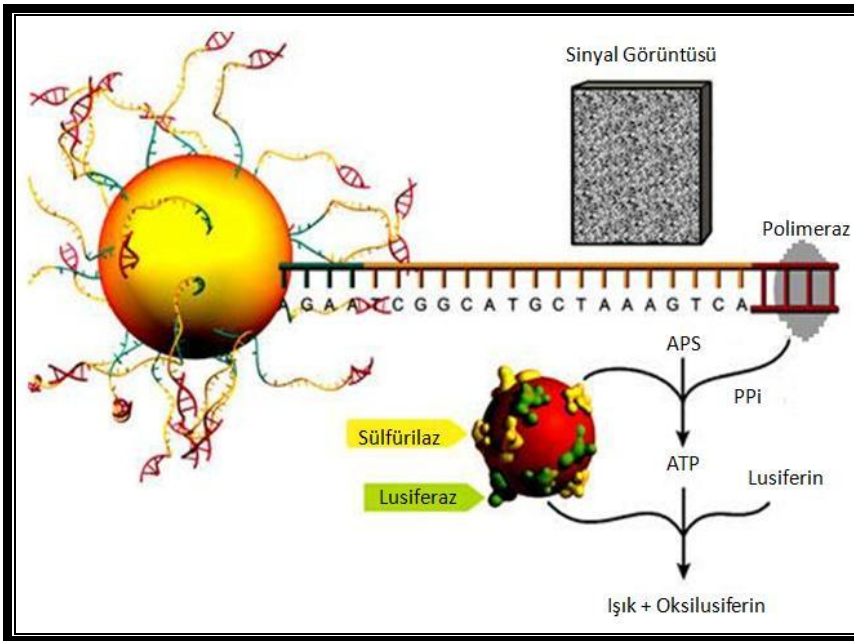
- Tekrar MPC'ye yerleştirilen tüplerde Enrichment boncuklarının tüpün kenarına yapışması beklendi.
- Süpernatant çekilip yeni, steril 1,7ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Yeni tüpler spin yapıldı ve süpernatant atıldı.
- Eski tüpler MPC'den kaldırıldı ve 700µl Melt solüsyonu her bir tüpe eklendi. Vortekslendi.
- Tekrar MPC'ye yerleştirilen tüplerde Enrichment boncuklarının tüpün kenarına yapışması beklendi.
- Süpernatant çekilip yeni, steril 1,7ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Yeni tüpler spin yapıldı ve süpernatant atıldı.
- Eski tüpler MPC'den kaldırıldı ve 700µl Melt solüsyonu her bir tüpe eklendi. Vortekslendi.
- Tekrar MPC'ye yerleştirilen tüplerde zenginleştirme boncuklarının tüpün kenarına yapışması beklendi.
- Süpernatant çekilip yeni, steril 1,7ml mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- Yeni tüpler spin yapıldı ve süpernatant atıldı.
- Bu aşamada zenginleştirme tüpleri atıldı.
- Her bir tüpe 1ml Annealing Tamponu XT eklendi ve vortekslendi. Spin yapıldı ve süpernatant atıldı. Bu aşama iki kez daha tekrar edildi.
- Boncuk pelletleri 200µl Annealing Tamponu XT içinde süspanse edildi.
- Her tüpe 50µl sekans primeri eklendi ve vortekslendi.
- 65°C'de 5 dakika bekletildi ve hemen ardından buz üzerine alınıp 2 dakika daha bekletildi.
- Her tüpe 800µl Annealing Tamponu XT eklendi, vortekslendi. Spin yapıldı, süpernatant atıldı.
- Her tüpe 1ml Annealing Tamponu XT eklendi, vortekslendi. Spin yapıldı, süpernatant atıldı.
- Zenginleştirme oranını öğrenmek için sekans primeri bağlama aşaması tamamlanmış DNA'lardan 3µl, partikül sayıcıya (Beckman Coulter Z1 Particle Counter) yüklendi.
- Çıkan sonuç belirtilen formüle göre hesaplandı. (Şekil 3-6)

$$\text{Zenginleştirme \%} = \frac{\text{Geri kazanılan boncuk sayısı}}{35 \cdot 10^6 \text{ boncuk / kap}} \times 100$$

Şekil 3-6: Zenginleştirme oranının hesaplanması

### 3.2.9.3. Dizileme

GS-FLX sisteminin temelini pirosekanslama bazlı dizileme sistemi oluşturmaktadır. Pirosekanslama, DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitine dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı üzerinde tamamlayıcı sarmalının sentezlenmesi şeklinde kendini gösterir. Dizileme primeriyle sabitlenen tek sarmallı kalıp DNA üzerine ardışık olarak akan A, C, G, T nükleotitlerinin kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olması durumunda ortamda bir ışık oluşur. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotitin bağlanması sırasında olduğu tespit edilir. Nükleotit akışı sırasında tamamlayıcı nükleotitin gelmesi durumunda DNA polimeraz, pirofosfat (PPi) açığa çıkmasını sağlar. ATP sülfürilaz enzimi bu PPi'yi ATP'ye dönüştürür. ATP, lusiferaz enzimi aracılığıyla lusiferinin oksilusiferin'e dönüşmesini sağlar. Oksilusiferin görülebilir bir ışık yaratır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılıdır. Ortaya çıkan bu ışık CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar programı yardımıyla sekans datalarına (flogram) dönüşür. Nükleotit akışı sırasında eşleşmeyen nükleotitler ve ortamdaki ATP, apiraz tarafından parçalanır ve reaksiyon yeni bir tur nükleotit akışıyla devam eder (58). (Şekil 3-7)



Şekil 3-7: Sekanslama aşamasındaki reaksiyonlar (62)

GS FLX cihazının programında ilgili kısma gelinerek Ön yıkama programı başlatıldı.

PicoTiterPlate (PTP), BB2 tamponuna batırılarak kullanılacağı ana kadar bu tamponun içinde bekletildi.

#### **3.2.9.3.1. Paketleme Boncuklarının Hazırlanması**

- Paketleme boncukları 3 defa 1ml BB2 ile yıkandı. Vortekslendi ve 10000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üçüncü yıkamadan sonra her tüpe 550µl BB2 eklendi, boncuklar süspanse edildi ve buz üstünde bekletildi.

#### **3.2.9.3.2. DNA Boncuklarının (Örnek ve Kontrol) Hazırlanması**

- Kullanılacak olan 2'li BDD'ye (Bead Deposition Device) uygun miktar olan 2000000 DNA boncuğu için gereken 650µl DNA Boncuğuna 20µl kontrol boncuğu eklendi. Toplam hacim 670µl oldu.
- 1 dakika spin yapıldı.
- 620µl süpernatant çekildi ve böylece toplam hacim 50µl kalmış oldu.
- Diğer yandan da 1570µl BB2, 150µl Polimeraz kofaktörü, 300µl DNA Polimeraz karıştırılarak toplam hacim 2020µl olacak şekilde DNA Bead Incubation Mix (DBIM) hazırlandı.
- 50µl hacimli DNA boncuğu tüplerinin her birine 950µl DBIM eklendi.
- Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında Rotator'da döndürülerek inkübe edildi.

#### **3.2.9.3.3. Enzim ve PPiaz Boncuklarının Hazırlanması**

- Enzim ve PPiaz boncukları vortekslendi ve MPC'ye yerleştirildi.
- 2-3 dakika bekletilip tüplerin kenarında pellet oluşması sağlandı.
- Birkaç kez alt-üst edilip 2 dakika daha beklendi.
- Boncuklara dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
- Enzim boncukları üç defa 1ml EB Wash ile yıkandı, vortekslendi ve MPC yardımıyla pellet ayrıldı, süpernatant atıldı.
- Üçüncü yıkamadan sonra 1ml EB Wash eklendi, vortekslenip boncukların suspanse olması sağlandı ve buz üzerinde beklemeye alındı.
- PPiaz boncukları üç defa 1ml BB2 ile yıkandı, vortekslendi ve MPC yardımıyla pellet ayrıldı, süpernatant atıldı.

- Üçüncü yıkamadan sonra 500µl BB2 eklendi, vortekslenip boncukların suspanse olması sağlandı ve buz üzerinde beklemeye alındı.
- 1., 3. ve 4. katmanlar için üç ayrı 15ml'lik tüp hazırlandı ve isimlendirildi. Tablo 3-6'da görüldüğü gibi hazırlandı.

**Tablo 3-6:** Katmanlara yüklenecek boncukların hazırlanması

Boncuk Katmanı	Kullanılan Tampon (µl)	Enzim Boncukları(µl)	PPiaz Boncukları(µl)	Toplam Hacim(µl)
1	EB Yıkama Tamponu (3230)	570	---	3800
3	EB Yıkama Tamponu (2460)	1340	---	3800
4	BB2 Tamponu (3340)	---	460	3800

#### 3.2.9.3.4. DNA Boncukları ve Paketleme Boncuklarının Birleştirilmesi

- 1000µl DNA boncuğu üzerine, 265µl Paketleme boncuğu ve 435µl BB2 eklendi. Toplam hacim 1.7ml oldu.
- Oda sıcaklığında 5 dakika Rotator'da döndürülerek inkübe edildi.

#### 3.2.9.3.5. Boncukların PTP'ye Yüklenmesi ve Dizileme

- Hazırlanan katmanlar sırasıyla PTP'ye yüklendi ve santrifüj edildi (Tablo 3-7)
- Yükleme gasketindeki PTP'ye her iki bölge için 1860µl BB2 yüklendi ve 1620 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan çekilip atıldı.
- Katman 1 için hazırlanan tüp vortekslenip ve şekilde her bölge için 1860µl yüklendi. 1620 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan çekilip atıldı.
- Katman 2 için hazırlanan tüp vortekslenip. Her iki bölge için 1700µl yüklendi. 1620 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj bitince supernatant çekilmeden

bir kez daha 1620 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu aşamadan sonar supernatant çekilip atıldı.

- Katman 3 için hazırlanan tüp vortekslendi. Her iki bölge için 1860µl yüklendi ve 5 dakika 1620 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant çekilip atıldı.
- Katman 4 için hazırlanan tüp vortekslendi, her bölge için 1860µl yüklendi ve 5 dakika 1620 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant çekilip atıldı.

**Tablo 3-7:** Boncukların katmanlara yüklenme sırası

Boncuk Katmanı	Enzim Boncukları (İlk Katman)
Boncuk Katmanı	DNA ve Kontrol Boncukları
Boncuk Katmanı	Enzim Boncukları (İkinci Katman)
Boncuk Katmanı	Ppiaz Boncukları

- Boncukların yüklendiği PTP, yükleme gasketinden çıkartıldı ve GS FLX cihazına yerleştirildi. Cihaza bağlı bilgisayarda ilgili program seçildi ve sekanslama çalışması başlatıldı.

### 3.2.10. Biyoinformatik Analiz

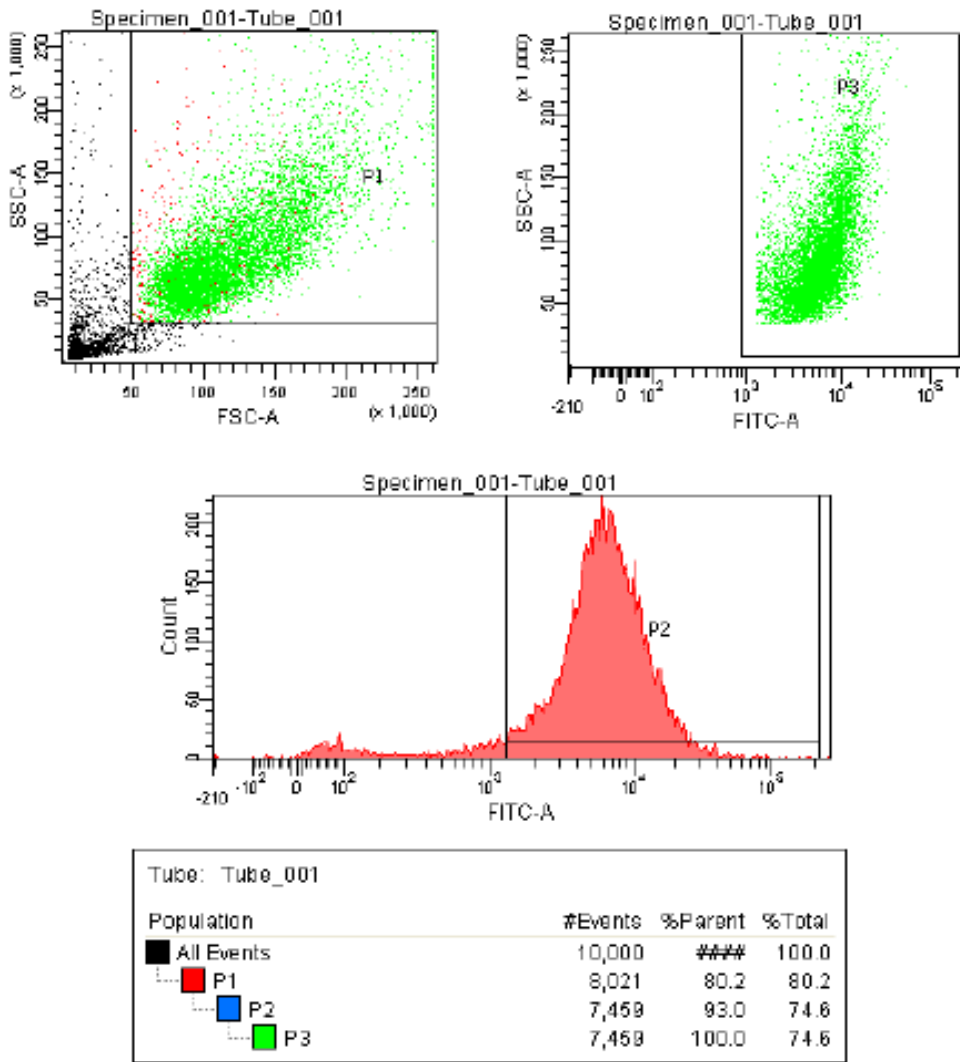
Dizileme sonucu üretilen data GS Run Browser kullanılarak DNA dizilerine dönüştürülmüştür. Bu aşamada düşük kaliteli DNA dizileri program tarafından elenmiştir. Elde edilen DNA dizileri insan kromozomları ile karşılaştırılarak dizilerin, kromozomlar üzerindeki vektör dizilerine homolog bölgelere göre dağılımı belirlenmiştir. K562 ve 293T hücrelerinde insan kromozomlarına uymayan diziler; NCBI veritabanından indirilen SV 40, Epstein-Barr, İnsan Papilloma Virüsleri, Adenovirüsler gibi immortalizasyonda kullanıldığı rapor edilen DNA virüslerinin dizileri ile CLCBIO Genomic Workbench 5.1 programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Daha sonra, bu aşamada hiçbir diziyle eşleşmeyen fragmanlar NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) veritabanında aranarak eşleştikleri diziler incelenmiştir. SV-40 T antijeni ile eşleşen fragmanlardan kimerik olanlar incelenerek, kromozomal entegrasyon bölgeleri tespit edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, K562 ve 293T hücre soylarının ölümsüzleştirilmesinde kullanılan vektörlere ait DNA dizilerinin varlığı ve genomdaki dağılımı incelenmiştir. K562 ve 293T hücre soyları çözülerek uygun medyumda çoğaltılmış ve pasajlanmıştır.

### 4.1. Floresanla Aktive Hücre Ayırma (FACS)

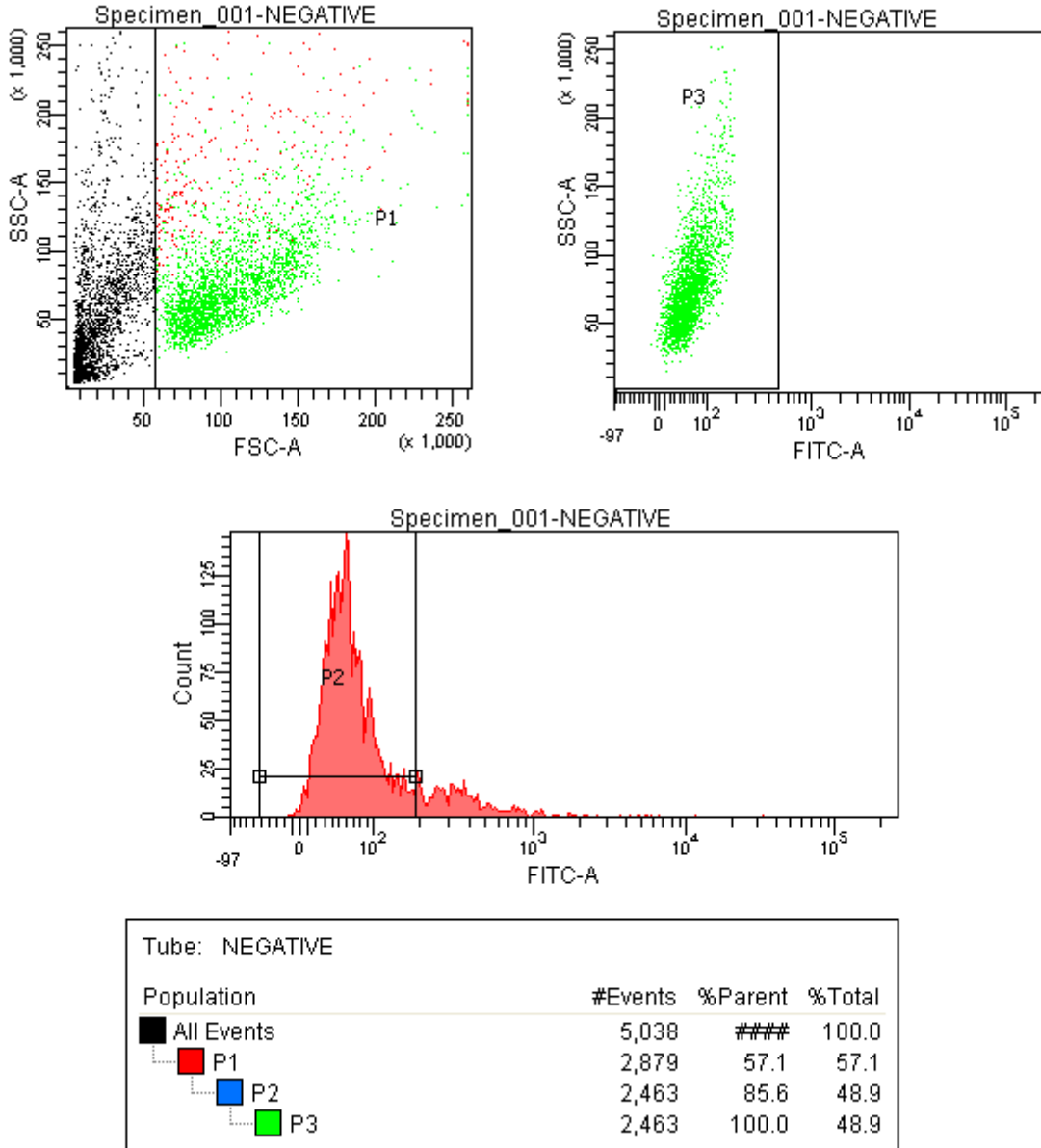
293T hücre soyu pLVTHM lentiviral vektörü ile transdükte edildikten sonra, hücreler FACS hücre ayırma metodu ile ayrılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4-1: Transdükte edilmiş 293T hücrelerinin FACS sonuçları

GFP pozitif hücreler (safılık: % 100) ayrıldıktan sonra hücre kültürü ortamında pasajlanmıştır ve 9. pasajdan sonra genomik DNA Qiagen DNA Blood Maxi Kit

kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen 20 ug DNA hedefli dizi yakalaması için Nimblegen'e gönderilmiştir. Hedefli dizi yakalama metodu kullanılarak bu DNA'daki viral integrasyon bölgeleri ve plasmid dizileri diğer dizilerden ayrılmıştır. Transdükte edilmemiş K562 hücre soyu, floresan aktive hücre ayırmada negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.2).



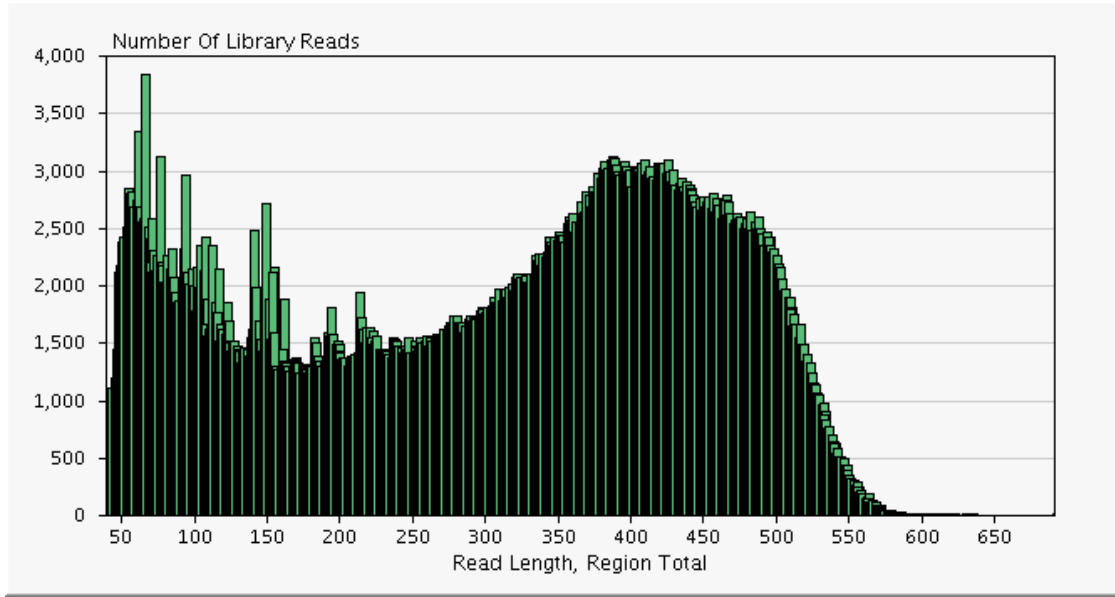
Şekil 4-2: Transdükte edilmemiş K562 hücrelerinin FACS sonuçları

K562 hücre soyu pasajlanarak uygun hücre sayısına ulaşıldıktan sonra 20 ug genomik DNA Qiagen DNA Blood Maxi Kit ile izole edilmiş, hedefli dizi yakalama

metodu kullanılarak bu DNA'daki viral integrasyon bölgeleri ve plasmid dizileri diğer dizilerden ayrılmıştır.

#### 4.2. Yeni nesil dizileme

Dizi yakalaması sonucu kazanılan fragmanlar, GS FLX sistemi kullanılarak dizilenmiştir. Uzunlukları 40 bç ile 691 bç arasında değişen ortalama 321 bç uzunluğunda fragmanlar elde edilmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4-3:** Dizileme sonucu elde edilen DNA fragmanlarının uzunluk dağılımları

İki hücre soyu için elde edilmiş fragman sayısı, ortalama uzunluk ve toplam baz sayısı ile ilgili bilgiler Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-1:** Yeni nesil dizileme sonuçları

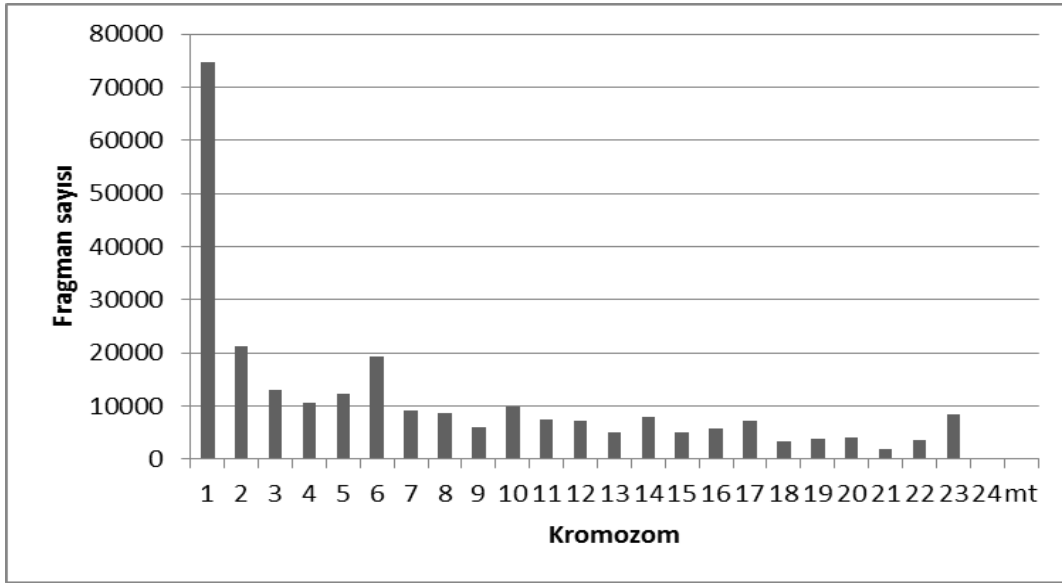
	<b>K562</b>	<b>293T</b>	<b>Toplam</b>
Ham kuyu sayısı	444,124	432,831	876,955
Anahtar içeren diziler	432,096	420,632	852,728
Fitreden geçen sayısı	272,481	299,575	572,156
Toplam baz sayısı	83,881,664	99,382,141	183,263,805
Uzunluk ortalaması	308.09	331.9	321.2
Uzunluk Std. Sapması	142.85	138.07	
En uzun dizi	691	616	691
En kısa dizi	40	40	40
Medyan dizi uzunluğu	338	366	



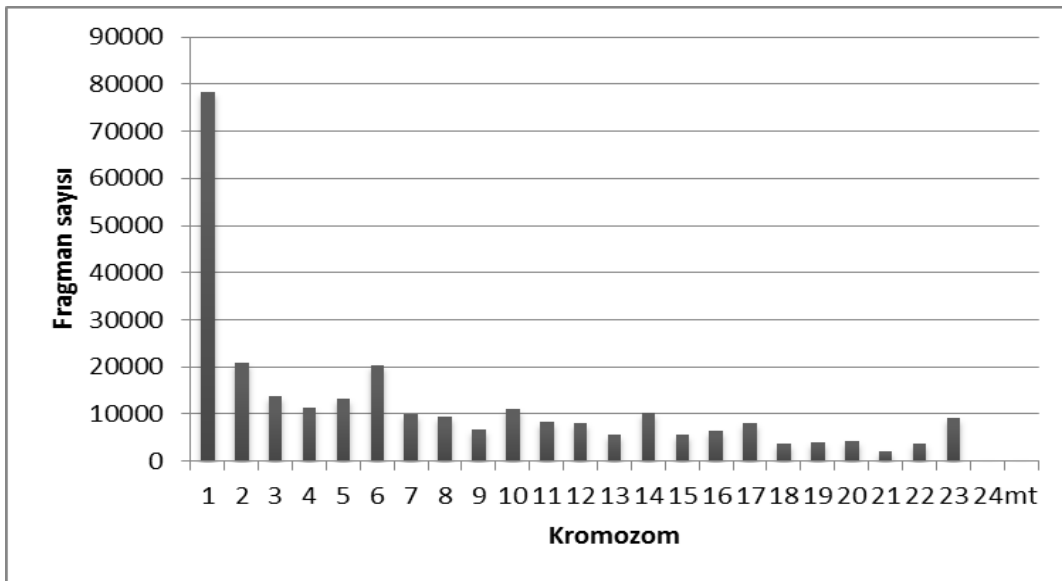
### 4.3. Biyoinformatik Analiz

İki hücre soyunda toplam 183,263,805 baz dizilenmiştir. pLVTHM plasmid’inde insan genlerine homolog parçalar bulunmaktadır. Yakalama problemleri bu plasmid temel alınarak tasarlandığından elde edilen fragmanlardan K562’de 256,722 ve 293T’de ise 292,135 tanesinin insan kromozomlarındaki homolog bölgeler ile eşleştiği görülmüştür (Şekil 4.4).

#### a. K562

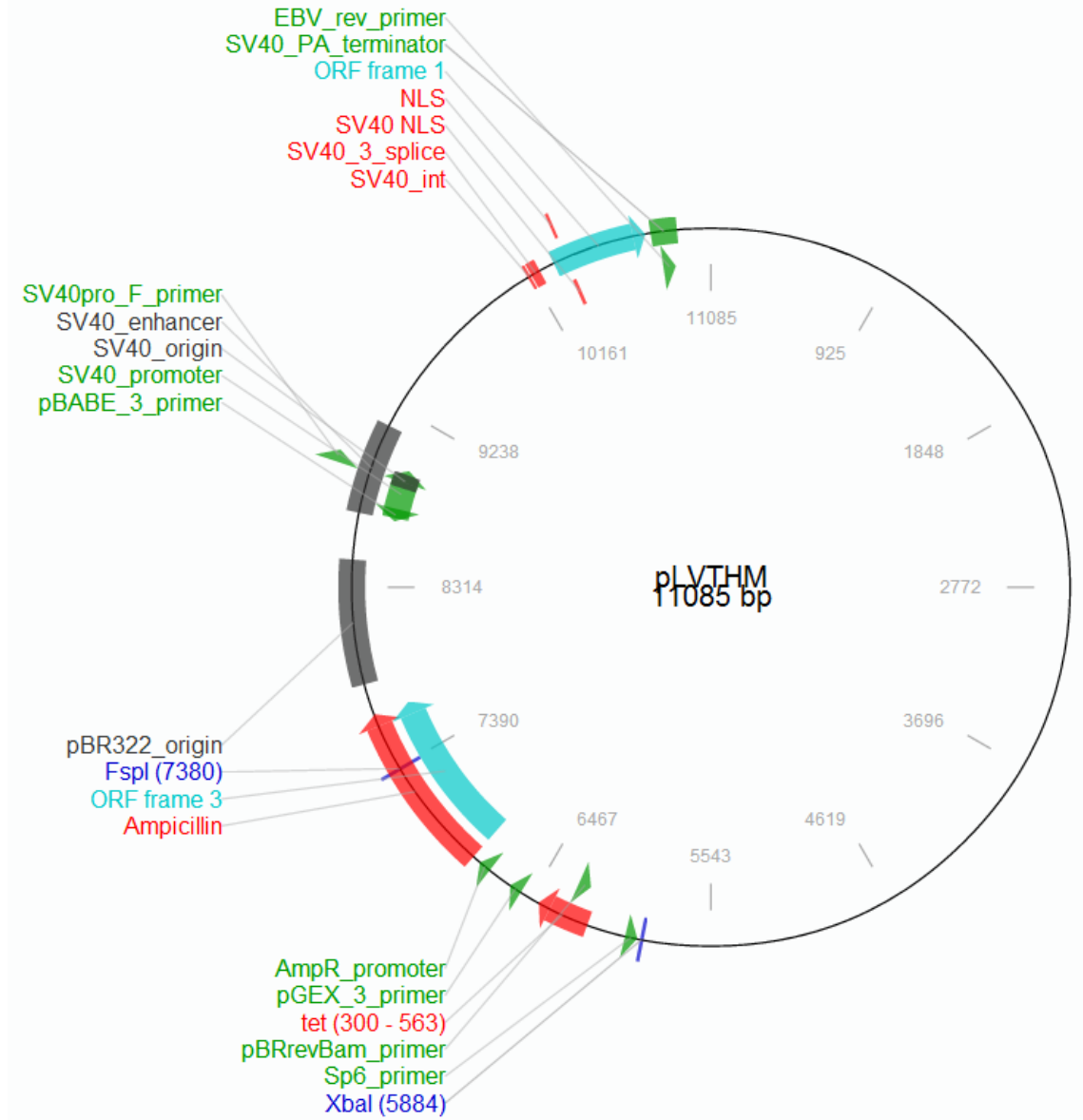


#### b. 293T



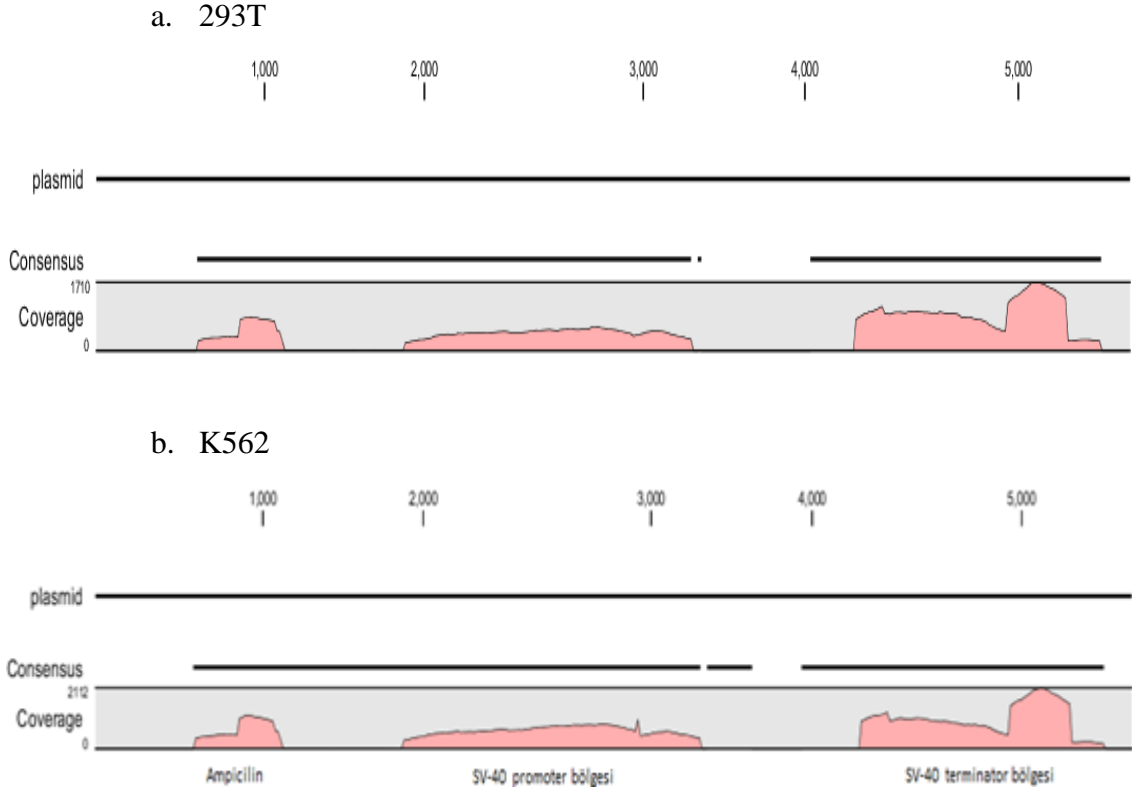
Şekil 4-4: İki hücre soyunda yeni nesil dizileme sonucu elde edilen fragmanların insan kromozomlarındaki problemlere homolog bölgelere göre dağılımı a. K562, b. 293T

İnsan kromozomları ile eşleşmeyen DNA dizileri, hücreleri transdükte etmek için kullanılan pLVTHM lentiviral vektörünün plazmid kısmı (5885-11085) (Şekil 4.5) referansı ile karşılaştırılarak eşleşen diziler belirlenmiştir.



**Şekil 4-5:** pLVTHM vektörünün plazmid kısmının genetik haritası (5885-11085)

CLC Genomics Workbench 5.1 kullanılarak yapılan eşleştirme sonucu elde edilen DNA dizilerinin lentiviral vektörün plazmid parçası üzerinde oluşturduğu genel profil ortaya konulmuştur (Şekil 4.6).



**Şekil 4-6:** pLVTHM vektörünün sadece klasik plazmid kısmı (5885-11085 bç arası) ile eşleşen fragmanların 293T (a), K562 (b) hücreleri için toplu görünümü

Plazmid kısım ile eşleşen bu 22980 fragmanın ise hücre soylarında immortalizasyon işleminde kullanılarak DNA'ya entegre olmuş viral ve plazmid kalıntılara ait olduğu görülmüştür. Elde edilen 15540 K562 ve 7440 293T fragmanının, benzerlik gösterdikleri plazmid bölgelerine göre dağılımı CLCBIO Genomic Workbench 5.1 kullanılarak belirlendikten sonra bu bölgelere giden fragmanların ait oldukları plazmidler NCBI database taranarak bulunmuştur ve bu fragmanların bu vektörlerde eşleştiği bölgeler gösterilmiştir (Tablo 4.2, Tablo 4.3).

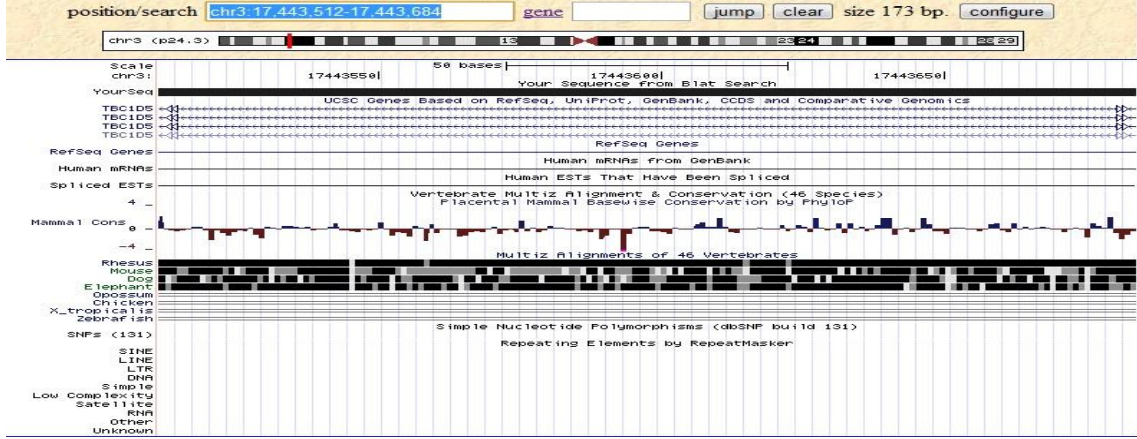
**Tablo 4-2:** K562 hücre soyundan elde edilen fragmanların hücre soyu oluşturmada kullanılan vektörlere göre dağılımı.

<b>Vektör adı</b>	<b>Fragman sayısı</b>	<b>Eşleşen bölge</b>
Simian virus 40	9348	SV40 Büyük T antijeni
pGNS-BAC	1831	Replikasyon orijini (colE1)
pSTH1-GFP	1786	PolyA sinyali, insan sitomegalovirüs CMV promotör bölgesi
FBDki knock-in	1670	Neomisin direnç geni
İnsan herpes virüs (HHV5)	905	UL124- UL133
<b>Toplam</b>	<b>15540</b>	

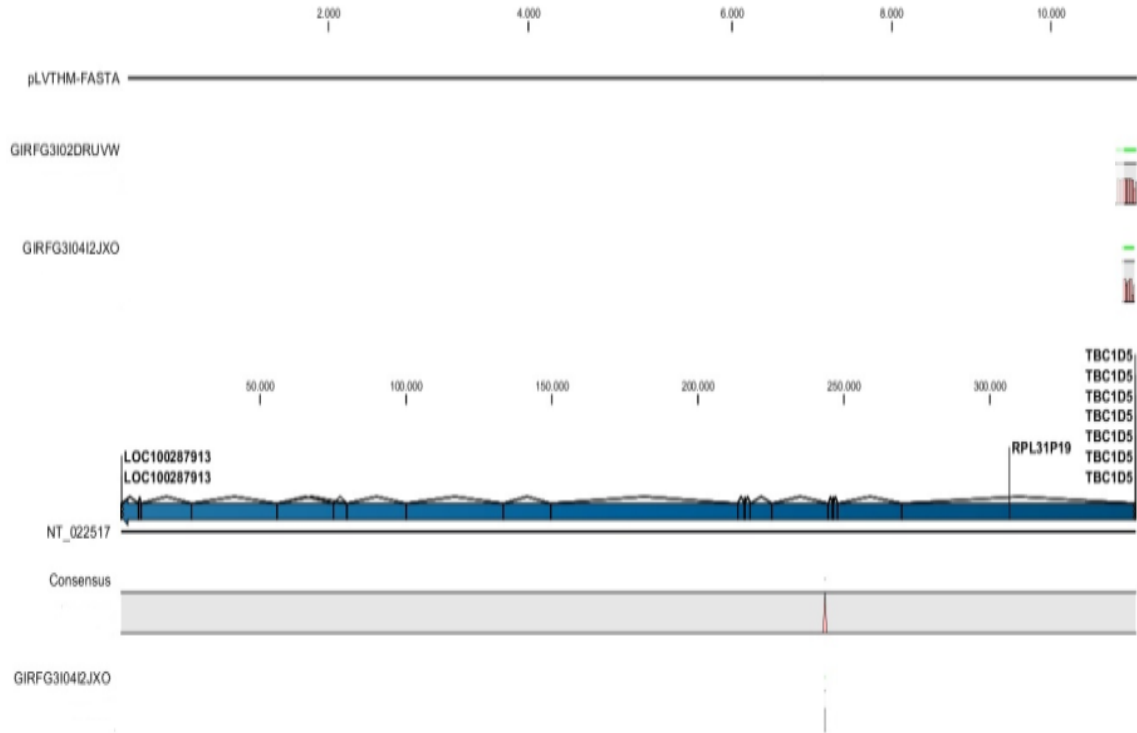
**Tablo 4-3:** 293T hücre soyundan elde edilen fragmanların hücre soyu oluşturmada kullanılan vektörlere göre dağılımı.

<b>Vektör adı</b>	<b>Fragman sayısı</b>	<b>Eşleşen bölge</b>
Simian virus 40	4348	SV40 Büyük T antijeni
pCMV-HIF-1a-FLAG	945	Neomisin direnç geni
pHR'-CMVLacZ	756	Ampisilin direnç geni
pHR'-CMVLacZ	744	pUC replikasyon orijini
pHR'-CMVLacZ	647	SV40 poliadenilasyon sinyali ve intron
<b>Toplam</b>	<b>7440</b>	

SV40 referansı ile eşleşen fragmanlar analiz edilerek, her iki hücre soyunda da 3. kromozomun p kolu üzerindeki TBC1D5 genine integre olmuş diziler tespit edilmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8).



Şekil 4-4: SV40 için elde edilen kimerik fragmanların BLAT karşılaştırması sonuçları



Şekil 4-5: Kimerik fragmanların TBC1D5 geni üzerindeki görünümü

Bu aşamada integrasyon bölgesinin güvenilirliğinin tespiti için %98 benzerlik oranı ve minimum 50 bç uzunluk kıstasları temel alınmıştır. Elde edilen integrasyon bölgesini içeren dizilerin bu kıstaslara uyduğu ve aynı zamanda pirosekanslama için öngörülen kalite skorlarını sağladığı belirlenmiştir. Diğer vektör dizileri de integrasyon bölgelerinin tespiti için analiz edilmiş ancak kimerik diziler tespit edilmemiştir.

## 5. TARTIŞMA

Kontrollü deneysel modellerin oluşturulmasında hücre soyları in vitro çalışmalar için oldukça önemli materyallerdir. Spesifik genotipik özelliklere sahip hücre soylarının oluşturulması için kullanılan en yaygın yol DNA virüsleri veya antijenleridir. Bunlar, tümöral transformasyon özelliğine sahip olan SV40 large T-antigen (LT) ve small t-antigen (ST) proteinleridir (63). Büyük T-antijen proteini retinablastoma ve p53 tumor baskı yolunu ortadan kaldırarak transformasyona katkıda bulunur (64). Retinablastoma ve p53 yolakları birçok kanserde de baskılanmıştır (65). Ancak, küçük t-antigen proteini protein phosphatase 2A yolunu ortadan kaldırarak hücrelerin yüzey bağımlılıklarını ortadan kaldırarak gerçek transformasyonu sağlamaktadır. SV40 LT ve ST proteinleri ile trasforme olmuş bir hücre ölümsüz (immortal) hale gelmiş bir hücredir (66).

Hücrelerin immortalizasyonunda kullanılan vektörlerin hücre DNA'sına entegre olmaları hücre soyunun stabilizasyonu için önemli ve kritiktir. Bu vektörler aracılığıyla hücreler sonsuz bölünme yeteneği kazandıkları gibi, hücre kültürü ortamında kullanılabilmelerini sağlayacak stabiliteye de ulaşırlar. DNA virüslerinin hücre genomundaki integrasyon bölgelerinin tespiti ve etkileri üzerine farklı çalışmalar bulunmaktadır. Hücre soylarındaki integrasyon bölgelerinin analizi kontrollü deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçların güvenilirliği için önemli olduğu gibi insersiyonal mutagenesis problemine de ışık tutacaktır (67) .

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, immortalizasyon tekniklerinin işleyiş mekanizmasının anlaşılması ve optimize edilmesi amacını taşımıştır. Ancak tek tek viral vektör analizlerini içeren çalışmalar çok olmakla beraber, bu alanda tüm vektörlerin bir bütün halinde ve tüm genom düzeyinde değerlendirilmesi ve bunun yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak yüksek miktardaki bilgilerin ışığında yapılması temelinde çok az çalışma mevcuttur (68).

Yapılan çalışmada, K562 ve 293T hücre soylarının ölümsüzleştirilmesinde ve stabil hale getirilmesinde kullanılan vektörlere ait DNA dizilerinin binlerce pasaj sonrasındaki varlıkları ve genomdaki dağılımları incelenmiştir. Kullanılan vektörlere ait DNA parçaları, bir lentiviral vektöre özgün örtüşen proplar kullanılarak hedefli dizi yakalama (sequence capture array) metodu ile yakaladıktan sonra yeni nesil dizileme teknolojisi ile dizilenmiştir. Çalışmada kullanılan 293T hücreleri lentivektör ile transdükte edilirken K562 hücreleri transdükte edilmeden kullanılmıştır. Hedefli dizi yakalama

sonucu iki hücre soyu için birbirine yakın sayıda dizi elde edilmiştir. Bu aşamada transdükte edilmemiş olan K562 hücrelerinde daha az fragman elde edilmesi beklenebilir ancak kullanılan yöntemin sınırları nedeniyle K562 hücrelerinden elde edilen DNA'da yalnızca lentiviral vektörün plazmid kısmı ile eşleşen diziler bulunmasına rağmen yakın sayıda fragman elde edilmiştir.

Dizileme sonucu, K562 hücre soyunun ölümsüzleştirilmesinde kullanılan vektörlere ait 15540 fragman elde edilmiştir. Bu fragmanlarla yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, 9348 fragmanın (%60) SV-40 T antijenine, 1831 fragmanın pGNS-BAC klonlama vektörüne, 1786 fragmanın pSTH1-GFP DNA klonlama vektörüne, 1670 tanesinin FBD'ki knock-in vektörüne ve 905 tanesinin de insan herpes virüs 5 (HHV 5) strain Toledo'ya ait olduğu belirlenmiştir. Bu fragmanların; pGNS-BAC klonlama vektöründe replikasyon orijini (colE1) bölgesine, FBD'ki knock-in vektöründe Neomycin direnç geni ile soriano vektörü bölgesine gitmektedir. İnsan herpes virüs 5'te UL124 - UL133 genleri arasındaki bölgesi ve pGNS-BAC klonlama vektöründe PolyA sinyali, insan sitomegalovirüs CMV promotör bölgesi ile eşleşmektedir. Fragmanların vektörler üzerinde eşleştikleri bölgeler hücre immortalizasyonunda kullanılan plazmid DNA'ların ortak bölgelerini oluşturmaktadır. Replikasyon orijini, neomisin direnç geni gibi diziler klasik vektör iskeletini oluşturan diziler olarak bilinmektedir.

293T hücre soyu için de K562 hücrelerine benzer şekilde neomisin direnç geni, SV40 T antijeni, SV40 poliadenilasyon sinyali ve intron ve replikasyon orijini bölgeleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar farklı kökene sahip iki hücre soyunun aslında genel olarak aynı iskelete sahip vektörler ile enfekte edildiğini göstermektedir.

SV-40 hücre soyu oluşturma işleminde en sık kullanılan virüs tiplerinden biridir (13). K562 ve 293T hücre soylarında da SV-40'ın ölümsüzleştirme işleminde kullanıldığı bilinmektedir (69,70). Özellikle 293T hücrelerinin SV40 enfeksiyonu, integrasyonu ve stabilizasyonu açısından uygun karaktere sahip hücreler olduğu tespit edilmiştir. Bu alanda yapılan çalışmalar 293T hücrelerinin sinir hücrelerine olan benzerlikleri nedeniyle SV40 enfeksiyonu ve integrasyonu açısından daha verimli olduklarını göstermektedir (71).

Çalışmamızda, SV-40 T antijenine ait fragmanlar incelenerek viral integrasyon bölgelerini içeren olası kimerik fragmanlar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu fragmanların analizi sonucunda SV-40'ın K562 ve 293T hücre soylarında 3p24.3 kromozomal bölgesinde bulunan, TBC1D5 adlı gene entegre halde bulunduğu görülmüştür. Bugüne

kadar SV40 için pek çok farklı hücre soyunda integrasyon bölgesi tespiti çalışmaları yapılmış ve farklı integrasyon bölgesi rapor edilmiştir. SV40 konak DNA'da rastgele bölgelere entegre olabilen bir DNA tümör virüsüdür. Ancak, virüsün zamanla enfekte hücrelerin bölünmesi ve pasajlanması ile kendisi ve konak için en uygun bölgede seleksiyonla baskın ve tek hale geldiği bilinmektedir. SV-40'ın integrasyon bölgeleri enfekte ettiği hücrelerin kökenine göre farklılık göstermekle beraber aynı bölgeleri de tercih edebileceği rapor edilmiştir. Bu durumda virüsün integrasyon bölgesi tercihinde hücre kökeninden çok genomik DNA'nın yapısal özelliklerinin baskın rol oynadığı ileri sürülebilir. Aynı zamanda farklı hücre soylarında farklı integrasyon bölgelerinin tercih edilebileceğinin bildirilmesi, virüsün hücre tipine göre değişkenlik gösteren enfekte etme yeteneğine bağlı olarak konak hücredeki virüs sayısının değişmesi ve dolaylı olarak da integrasyon bölgesi profilinin etkilenmesi temeline dayandırılabilir. Bu varsayımdan hareketle, elde ettiğimiz sonuçların farklı doku kökeninden gelen ancak binlerce pasaj sonrası analiz edilen hücrelere ait olduğu düşünülürse yukarıda bahsedilen viral integrasyon bölgesi tercihinin daha stabil hale geldiği ve konak DNA'daki muhtemel görece en uygun bölgenin kaldığı speküle edilebilir (14).

Hücre soylarının immortalizasyonunda kullanılan virüslerin DNA entegrasyon profilinin belirlenmesi, hücre soylarının bilimsel çalışmalardaki verimi üzerine olası etkilerinin hesaplanabilmesini sağlayabilir. Ayrıca son yıllarda onkolitik plazmidlerin gen tedavisinde kullanımı üzerine yapılan çalışmalar artmıştır (70). Endojen DNA vektörlerinin lokalizasyon bilgisi bu çalışmalara da yol gösterecektir.



## KAYNAKLAR

1. Jung HM, Choi SG, Kim JK. Expression profiles of SV40 immortalization-associated genes upregulated in various human cancers. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;**106(4)**: 703-13
2. Shay JW, Wright WE, and Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta*. 1991; **1072**: 1-7
3. Hammerschmidt W and Sugden B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein–Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*, 1989; **340**: 393–397.
4. Ozer HL, Banga SS, Dasgupta T, Houghton J, Hubbard K, Jha KK, Kim SH, Lenahan M, Pang Z, Pardinas JR, Patsalis PC. SV40-mediated immortalization of human fibroblasts. *Exp Gerontol* 1996; **31**: 303–310.
5. Shiga T, Shirasawa H, Shimizu K, Dezawa M, Masuda Y, Simizu B. Normal human fibroblasts immortalized by introduction of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6-E7 genes. *Microbiol Immunol* 1997; 41:313–319.
6. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977; **36 (1)**: 59–74.
7. Gama-Norton L, Botezatu L, Herrmann S, Schweizer M, Alves PM, Hauser H, Wirth D. Lentivirus Production Is Influenced by SV40 Large T-Antigen and Chromosomal Integration of the Vector in HEK293 Cells. *Hum Gene Ther.* 2011;**22(10)**:1269-79
8. Wang GP, Garrigue A, Ciuffi A, Ronen K, Leipzig J, Berry C, Lagresle-Peyrou C, Benjelloun F, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, and Bushman FD. DNA bar coding and pyrosequencing to analyze adverse events in therapeutic gene transfer. *Nucleic Acids Research*, 2008; **36(9)**: e49
9. Gabriel R, Eckenberg R, Paruzynski A, Bartholomae CC, Nowrouzi A, Arens A, Howe SJ, Recchia A, Cattoglio C, Wang W, Faber K, Schwarzwaelder K, Kirsten R, Deichmann A, Ball CR, Balaggan KS, Yáñez-Muñoz RJ, Ali RR, Gaspar HB, Biasco L, Aiuti A, Cesana D, Montini E, Naldini L, Cohen-

- Haguenauer O, Mavilio F, Thrasher AJ, Glimm H, von Kalle C, Saurin W, Schmidt M. Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. *Nat Med.* 2009;**15**(12):1431-6.
10. Okou DT, Locke AE, Steinberg KM, Hagen K, Athri P, Shetty AC, Patel V, Zwick ME Combining microarray-based genomic selection (MGS) with the Illumina Genome Analyzer platform to sequence diploid target regions. *Ann Hum Genet.* 2009;**73**(5): 502-13.
  11. Duncavage EJ, Magrini V, Becker N, Armstrong JR, Demeter RT, Wylie T, Abel HJ, Pfeifer JD. Hybrid capture and next-generation sequencing identify viral integration sites from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue *J Mol Diagn.* 2011;**13**(3):325-33.
  12. Johansson H, Isaksson M, Sörqvist EF, Roos F, Stenberg J, Sjöblom T, Botling J, Micke P, Edlund K, Fredriksson S, Kultima HG, Ericsson O, Nilsson M. Targeted resequencing of candidate genes using selector probes. *Nucleic Acids Res.* 2011; **39**(2): e8.
  13. Bryan TM, Reddel RR. SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncol* 1994; **5**: 331–357.
  14. Chang TH, Ray FA, Thompson DA, Schlegel R. Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells. *Oncogene* 1997; **14**: 2383–2393.
  15. Schoental R. Effects of A/-Methyl-/V-Nitrosourethane on Cells in Tissue Culture. *Nature*, 1967; **275**: 535
  16. Berwald Y and Sachs L. In vitro cell transformation with chemical carcinogens. *Nature*, 1963; **200**: 1182–1184.
  17. Sanders FK, and Burford BO. Morphological conversion of cells in vitro by N-nitrosomethylurea . *Nature (London)* 1967; **213** : 1171-1173.
  18. Sugimura T and Fujimura S. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N9-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 1967; **216**:943–944.

19. DiPaolo JA, Nelson RL, and Donovan PJ. In vitro transformation of Syrian hamster embryo cells by diverse chemical carcinogens. *Nature (London.)*, 1967; **235**: 278-280.
20. Albor A, Flessate DM, Soussi T, and Notario V. 3-Methylcholanthrene inactivates the p53 gene in Syrian hamster embryo fibroblasts by inducing a specific intronic point mutation. *Cancer Res.*, 1994; **54**: 4502-4507.
21. Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi K, Lim YM, Yamazaki S, Umeda M, Tanaka N. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat. Res.*, 2010; **702**: 100–122
22. Milo GE, Oldham JW, Zimmerman R, Hatch GG, and Weisbrode SA. Characterization of human cells transformed by chemical and physical carcinogens in vitro. *In Vitro* 1981; **17(8)**: 719–29.
23. Milo GE, Noyes I, Donahoe J, and Weisbrode S. Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro after exposure to chemical carcinogens. *Cancer Res* 1981; **41(12)**: 5096–102.
24. Maeda E, Akahane M, Kiryu S, Kato N, Yoshikawa T, Hayashi N, Aoki S, Minami M, Uozaki H, Fukayama M, Ohtomo K. Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Jpn J Radiol* 2009; **27(1)**: 4–19.
25. Murray PG, Young LS Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2001; **3**: 1–20
26. Miller G., Robinson J, Heston L and Lipman M. Differences between laboratory strains of Epstein-Bert virus based on immortalization, abortive infection and interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1974; **71**: 4006-4010.
27. Rabson M, Gradoville L, Heston L and Miller G. Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *Journal of Virology* 1982; **44**: 834-844.

28. Yenamandra SP, Hellman U, Kempkes B, Darekar SD, Petermann S, Sculley T, et al. Epstein-Barr virus encoded EBNA-3 binds to vitamin D receptor and blocks activation of its target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2010; **67**: 4249–4256.
29. Hertle ML, Popp C, Petermann S, Maier S, Kremmer E, Lang R, Mages J, Kempkes B. Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. *PLoS Pathogens* 2009; **5**: e1000506.
30. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 1999; **189** (1): 12–9
31. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus research* 2002; **89** (2): 213–228
32. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; **22**: 5201–5207
33. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111–4.
34. Halbert CL, Demers G W, and Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol.*, 1991; **65**: 473-478.
35. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; **36**: 59–74.
36. Houweling A, van den Elsen PJ & van der Eb A J. E1A alone has the property of immortalize primary cells in culture. *Virology* 1980; **105**, 537-550
37. Ruley HE. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 1983; **304**: 602–606.
38. Endter C, and Dobner T. Cell transformation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2004; **273**:163-214.

39. Keller W, Müller U, Eicken I, Wendel I, Zentgraf H. Biochemical and Ultrastructural Analysis of SV40 Chromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1978; **42**: 227-244
40. Sedman SA, Good PJ, & Mertz JE. Leader-encoded open reading frames modulate both the absolute and relative rates of synthesis of the virion proteins of simian virus 40. *Journal of Virology* 1989; **63**: 3884-3893.
41. Vilchez RA, Butel JS. Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. *Clin Microbiol Rev* 2004;**17**:495–508.
42. Nakanishi A, Li PP, Qu Q, Jafri QH, and Kasamatsu H. Molecular dissection of nuclear entry-competent SV40 during infection. *Virus Res.* 2006; **124**(1-2): 226-30.
43. Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 2006; **63**(7-8): 865-876
44. Eddy BE. Tumors produced in hamsters by SV40. *Fed Proc.*1962;**21**:930-935.
45. Chang SE. In vitro transformation of human epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.*1986; **823**(3): 161–194.
46. Hara H, Kaji H. Random integration of SV40 in SV40-transformed, immortalized human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1987; **168**(2): 531–538.
47. Escors D and Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2010; 58: 107–119.
48. Panganiban AT. Retroviral reverse transcription and DNA integration. *Semin Virol.* 1990;**1**:187-194.
49. Gallay P, Chin D, Hope TJ, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells mediated through the recognition of integrase by the import/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94**: 9825–9830.
50. Buchschacher GL Jr, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 2000; **95**: 2499-2504.
51. Lentiviral packaging systems. 2011 Erişim tarihi: 24.07.2012 <http://www.addgene.org/lentiviral/packaging/>

52. Kim CH, Oh Y, Lee TH. Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells-human or yeast codon usage effect on over-expression in 293T cell culture. *Gene* 1997; **199**: 293–301
53. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; **45** (3): 321–34.
54. Sequence capture. 2011. Erişim tarihi: 24.07.2012  
<http://www.nimblegen.com/products/seqcap/index.html>
55. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, Richmond TA, Middle CM, Rodesch MJ, Packard CJ, Weinstock GM, Gibbs RA. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nature Methods* 2007; **4**: 903-5.
56. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000; **287**(5461): 2185-95
57. Fleischmann, R.D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; **269**:496–512.
58. Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M. Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 1998;**280**(5369): 1540-2.
59. Ronaghi M, Nygren M, Lunderberg J, Nyren P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing *Anal Biochem.* 1999; **267**(1): 65-71
60. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 2001; **11**(1): 3-11
61. Plasmid 12247: pLVTHM plasmid data. Erişim tarihi: 24.07.2012  
<http://www.addgene.org/12247/>
62. 454 Sequencing, Roche Diagnostics. 2011 Erişim tarihi: 24.07.2012  
<http://www.454.com/>
63. Dyson, N., Buchkovich K, Whyte P, and Harlow E. Cellular proteins that are targetted by DNA tumor viruses for transformation. *Princess Takamatsu Symp.* 1989; **20**: 191–198.

64. Levine, AJ. The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses. *Virology* 1990; **177**: 419–426
65. Levine, AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**:323–331.
66. Sellers, WR., and Kaelin WG. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* 1997; **15**:3301–3312
67. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G et al. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669–672.
68. Ustek D, Sirma S, Gumus E, Arikan M, Cakiris A, Abaci N, Mathew J, Emrence Z, Azakli H, Cosan F, Cakar A, Parlak M, Kursun O. A genome-wide analysis of lentivector integration sites using targeted sequence capture and next generation sequencing technology. *Infect Genet Evol.* 2012;**12**(7):1349-1354
69. Chang, LS, Pan S,. Pater MM, and Di Mayorca G. Differential requirement for SV40 early genes in immortalization and transformation of primary rat and human embryonic cells. *Virology* 1985;**146**:246–261.
70. Karlsson S, Humphries RK, Gluzman Y, Nienhuis AW. Transfer of genes into hematopoietic cells using recombinant DNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;**82**:158.
71. Yoshihara C, Hamada K, Kuroda M, Koyama Y. Oncolytic plasmid: A novel strategy for tumor immuno-gene therapy. *Oncol Lett.* 2012;**3**(2):387-390

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Muzaffer	<b>Soyadı</b>	Arıkan
<b>Doğ.Yeri</b>	Dicle	<b>Doğ.Tar.</b>	19.09.1987
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	28210522754
<b>Email</b>	muzafferarikan@gmail.com	<b>Tel</b>	

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üniversitesi	2012
<b>Lisans</b>	İstanbul Teknik Üniversitesi	2010
<b>Lise</b>	Dicle Necati Ceylan Lisesi	2004

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	iyi	Çok iyi	93.75	TOEFL - 88

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	93	90	87
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. A genome-wide analysis of lentivector integration sites using targeted sequence capture and next generation sequencing technology. Duran Ustek, Sema Sirma, Ergun Gumus, **Muzaffer Arıkan**, Aris Cakiris, Neslihan Abaci, Jaicy George, Hülya Azakli, Zeliha Emrence, Fulya



Cosan, Atilla Çakar, Mahmut Parlak, Olcay Kurşun. Infect Genet Evol. 2012 May 14. [Epub ahead of print]

2. Whole Mitochondrial Genome Analysis of a Family with NARP/MILS Caused by T8993C Mutation in the MT-ATP6 Gene. Bülent Kara, **Muzaffer Arikán**, Neslihan Abacı, Duran Ustek. Mol Genet Metab. 2012 Jul 10. [Epub ahead of print]

3. Whole Genome Sequencing, Assembly and Annotation of Halomonas smyrnensis, A Leván Producing Halophilic Bacterium. Elif Soğutcu, Zeliha Emrence, **Muzaffer Arikán**, Aris Cakiris, Neslihan Abacı, Ebru Toksoy Öner, Duran Ustek, Kazım Yalcın Arga. (Yazı hazırlık aşamasındadır.)

4. Screening of Mitochondrial Genome at MTLE Patients. Candan Gurses, Ahmet Alptekin, Hulya Azakli, **Muzaffer Arikán**, Aris Cakiris, Neslihan Abacı, Olcay Kursun, Duran Ustek. (Yazı hazırlık aşamasındadır.)

5. Genome sequence of Planktothrix agardhii strain IFCC-204 isolated from Kucukcekmece lagoon, Turkey. Aris Cakiris, Zeliha Emrence, Atilla Cakar, **Muzaffer Arikán**, Neslihan Abacı, Duran Ustek. (Yazı hazırlık aşamasındadır.)

6. Case report: A Novel ATP8 Mutation Identified in an Infant with Tetralogy of Fallot. Turkan Tansel, **Muzaffer Arikán**, Ferda Paçal, Atilla Çakar, Duran Ustek (Yazı hazırlık aşamasındadır.)

7. Analysis of Cellular Signaling Pathways Modulated by EBV-LMP2A in Myc induced lymphomas. Cen O, Fish P, Cen YS, **Arikán M**, Ucur, A, Ustek D, and R Longnecker. (Yazı hazırlık aşamasındadır.)

8. An insertion mutation in the MDFIC (MYOD Family Inhibitor Domain Containing) gene defines a novel autoinflammatory syndrome associated with Lymphedema. A. Gül, D. Ustek, G. Hatemi, H. Azakli, Z. Emrence, F. Cosan, A. Cakiris, N. Abacı, **M. Arikán**, A. Cakar, N. Arisoy, O. Kasapcopur, H. Ozdogan (Yazı hazırlık aşamasındadır.)

### **Özel İlgi Alanları (Hobileri)**

Kitap okumak, film izlemek.