

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

*ANP63 $\beta$*  GENİNİN T98G HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Buse TÜREGÜN ATASOY

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Fikret ŞAHİN

Mart 2015

## **ETİK BEYAN**

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Buse TÜREGÜN ATASOY

İmzası

## ONAY

Prof. Dr. Fikret ŞAHİN danışmanlığında Buse TÜREGÜN ATASOY tarafından hazırlanan bu çalışma 09/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hakan AKBULUT

İmza:

Üye: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Fikret ŞAHİN

İmza:

Üye: Doç Dr. Rengül ÇETİN ATALAY

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

# ÖZET

Doktora Tezi

$\Delta$ Np63 $\beta$  Geninin T98G Hücreleri Üzerindeki Fenotipik ve Genotipik Özelliklerinin  
Araştırılması

Buse TÜREGÜN ATASOY

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Fikret ŞAHİN

P53 ailesi üyelerinden biri olan p63 yapısal olarak p53 ile benzer olsa da fonksiyonel olarak, oluşturduğu izoformlarıyla p53'den farklılıklar göstermektedir.

Bu tezde, p53 ailesinin bir üyesi olarak bilinen, p63 proteinin izoformlarından biri olan, fonksiyonu tam olarak bilinmeyen ve henüz kayda geçmiş ayrıntılı literatür çalışması olmayan  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nin insan glioma kanser hücresi, T98G hücreleri üzerindeki fenotipik ve genotipik özellikleri incelendi. P63 proteinin tümör baskılayıcı olarak hücrede rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle  $\Delta$ Np63 $\beta$  proteinin, T98G hücrelerinin fenotipi ve genotipinde oluşturacağı etkileri sürekli hücrelerde izleyebilmek için doksasiklin varlığında indüklenen pRetroX-Tet-On vektör sistemi kullanıldı. İlk olarak rtTA ifade eden bu vektör sistemi ile sürekli hücre hatları elde edildi ve bu hücre hattına  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden pRetro-pur vektör sistemi transfekte edildi.  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden bu hücre hattı kullanılarak bu proteinin hücre üzerindeki fenotipik ve genotipik etkileri incelendi.

Literatür bilgilerine göre, p63 proteinlerinin, TA izoformları tümör baskılayıcı,  $\Delta$ N izoformlarının onkojen olarak kabul edilmelerine karşın,  $\Delta$ N izoformlarından biri olan  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nin T98G hücrelerindeki ifade artışı dramatik bir şekilde hücre ölümüne neden olmuştur. Gerçekleşen bu hücre ölümlerinin nedeni beklenildiği gibi apoptozisten değil  $\Delta$ Np63 $\beta$  proteininin hücre sitotoksik etkisinden kaynaklandığı saptandı.

$\Delta$ Np63 $\beta$  proteinin genetik etkilerini araştırmak amacıyla temel olarak p53 proteinin hedef genleri ve proteinlerinin ifade analizleri yapıldı.  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'in apoptozis ile ilgili genlerin ifadelerinde değişiklik oluşturmadığı buna karşın anti apoptotik genlerde artışa neden olduğu belirlendi. Ayrıca P53 ile ilgili kanıtlanmış interferon (IFN) ve IFN tarafından regüle edilen genler olarak adlandırılan ve hücre defansında rol alan hedef genlerde p53'ün oluşturduğu genetik değişikliklere benzer değişiklikler  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifadesi artmış hücrelerde de belirlendi. Onkojenitede rol alan birçok gen ifadesi düzeyinde artış görünmesine rağmen  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifadesinin arttığı T98G hücrelerinde gerçekleşen hücre ölümlerinin nedenlerinin ortaya konması için daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.

2014, 82 sayfa

**Anahtar kelimeler:** p63, p53, kanser, onkojen, apoptozis

## ABSTRACT

Investigation of the Phenotypic and Genetopic Effects of  $\Delta$ Np63 $\beta$  Gene on T98G Cell Lines

Buse TÜREGÜN ATASOY

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Fikret ŞAHİN

P63 is described as a member of the p53 family. Although p63 resembles to p53 as structural and functional, it is different from the p53 because it has different isoforms.

Although there are studies related with p63 isoforms,  $\Delta$ Np63 $\beta$  that is an isoform of p63 are not presented in literature in detail. In this thesis the phenotypic and genetic effects of  $\Delta$ Np63 $\beta$  on the T98G cell line was investigated.

P63 is known as tumor suppressor protein. For this reason, to see the functions of  $\Delta$ Np63 $\beta$  on continuous cell lines pRetroX-Tet-On vector system, which induced by the doxacillin, was used. First rtTA expressing vector that is part of the pRetroX-Tet-On vector system was established on the T98G cell lines with the presence of neomycine selection. Thereafter,  $\Delta$ Np63 $\beta$  cDNA cloned Retrovir Tight retroviral vector prepared and infected the T98G cell lines containing pRetroX-Tet-On vector system and continuous cell lines were obtained with the puromycin selection. Then, the functions of the  $\Delta$ Np63 $\beta$  on the T98G cell line were investigated.

Although TA p63s is described as tumor suppressor and  $\Delta$ N p63 isoforms is described as oncogene in the limited number of literature, in this study, overexpression of  $\Delta$ Np63 $\beta$  in the T98G cell lines killed cell dramatically. Interestingly, It was determined that cell death is due to the necrosis not as expected as due to apoptosis.

Genetic effects of  $\Delta$ Np63 $\beta$  was investigated basis on the expression analysis of the p53 target genes. It was found that while  $\Delta$ Np63 $\beta$  has no effects on the apoptosis-related genes, it has changed the expression of the anti-apoptotic genes. In addition the apoptosis related genes, Interferon regulated genes which are regulated by p53 and have roles in cell defence were investigated. Results indicates that Expressions of IFN regulated genes showed similar patterns to the p53 results.

Although  $\Delta$ Np63 $\beta$  overexpression increased the some of the oncogenite related genes, cell died dramatically. Further experiements are needed to explore the causing of cell death.

2015, 82 pages

**Keywords:** p63, p53, cancer, onkogen, apoptosis

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle, yapıcı eleştirileriyle bana yol gösteren saygı değer tez danışmanım Prof. Dr. Fikret ŞAHİN'e, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan Bölüm Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet KIYAN'a, Tez İzleme Komitemde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN ve Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına, özellikle manevi desteklerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Dr. Duygu ÖCAL ve Dr. Büşra Betül ÖZMEN ÇAPIN'a, laboratuvar çalışmalarım esnasında eşsiz tecrübesi ve bilgisiyle kendisinden çok şey öğrendiğim eğitimim süresince çalışma imkanı bulduğum Dr. Djursun KARASARTOVA'ya ve çalışma arkadaşım Saber YARİ BOSTANABAD'a, bugünlere gelmemi sağlayan maddi, manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili annem Menekşe TÜREGÜN'e ve babam Cemal TÜREGÜN'e, tez yazım aşamasında bana en büyük sabrı ve sevgiyi gösteren, bilgi ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, desteğini hiç esirgemeyen değerli eşim Toygun ATASOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Buse TÜREGÜN ATASOY

Ankara, 2015

Bu çalışma 'HBV ve HCV tedavisinde p63 proteinin etkisinin araştırılması' adlı proje kapsamında, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (proje no: 109S446) desteği ile gerçekleştirilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN.....</b>	<b>i</b>
<b>ONAY .....</b>	<b>ii</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>v</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>xii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. P63'ÜN KEŞFİ .....	3
2.2. P63 GENİ VE PROTEİN YAPISI .....	3
2.3. P63'ÜN EMBRİYONİK GELİŞMEDEKİ ROLÜ .....	5
2.4. P53 VE P63 BENZERLİKLERİ VE FARKLILIKLARI.....	8
2.5. P63 PROTEİNLERİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	9
2.6. P63'ÜN KANSER ÜZERİNE ETKİSİ.....	11
<b>3. GEREKÇE VE AMAC .....</b>	<b>13</b>
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>14</b>
4.1. MATERYAL.....	14
4.1.1. VEKTÖRLER.....	14
4.1.1.1. Klonlama vektörü.....	14
4.1.1.2. pRetroX-Tet-On Advanced .....	15
4.1.1.3. pRetroX-Tight-Pur .....	16
4.1.1.4. pRetroX-Tight-Pur-Luc.....	17
4.1.1.5. Retroviral paketleme sistemi vektörleri .....	18
4.1.2. MEMELİ HÜCRE HATLARI .....	18
4.1.3. KULLANILAN ENZİMLER .....	18
4.1.3.1. Restriksiyon enzimleri.....	18
4.1.3.2. Ligasyon enzimleri .....	19
4.1.3.3. DNA polimeraz enzimleri .....	19
4.1.3.4. Fosfataz enzimleri .....	19
4.1.4. KULLANILAN BESİYERLERİ.....	20
4.1.4.1. Luria bertani (LB) agar katı ve sıvı besiyerlerinin içeriği ve hazırlanışı .....	20
4.1.4.2. Hücre kültürü besiyeri .....	21
4.1.5. KULLANILAN SOLÜSYONLAR .....	21
4.1.5.1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri .....	21
4.1.5.2. Alkaline lizis solüsyonları ve içerikleri.....	22
4.1.5.3. Western blot solüsyonları ve hazırlanışı .....	23

4.1.6. KULLANILAN KİTLER .....	24
4.1.7. KULLANILAN ANTİKORLAR .....	25
4.1.8. MOLEKÜLER BİYOLOJİ AMACIYLA KULLANILAN BAKTERİYEL HÜCRELER .....	25
4.1.9. KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER.....	25
4.1.10. KULLANILAN PRİMERLER .....	26
<b>4.2. YÖNTEMLER.....</b>	<b>28</b>
4.2.1. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU .....	28
4.2.2. <i>ΔNP63B</i> TRANSKRİPT ÜRÜNÜNÜN PARSİYEL OLARAK PZR YÖNTEMİYLE ÇOĞALTILMASI .....	28
4.2.3. <i>ΔNP63B</i> PZR ÜRÜNÜNÜN KLONLANMASI.....	29
4.2.3.1. $ΔNp63β$ PZR ürününün pBSK içerisine klonlanması.....	29
4.2.3.2. $ΔNp63β$ 'nın pRetroX-Tight-Pur vektörü içerisine konlanması .....	30
4.2.4. PBSK-T VEKTÖRÜN HAZIRLANMASI .....	31
4.2.5. FARKLI RESTRİKSİYON ENZİMİ İLE KESİLEN ÜRÜNLERİN UÇLARININ KÜT HALE GETİRİLMESİ .....	31
4.2.6. LİGASYON .....	32
4.2.6.1. pBSK içerisine PZR ürünün klonlanması .....	32
4.2.6.2. pRetroX-Tight-Pur içerisine klonlanması .....	32
4.2.7. TRANSFORMASYON .....	33
4.2.8. ALKALİN LİZİS YÖNTEMİ İLE PLAZMİT DNA İZOLASYONU (MİNİ PREP).....	33
4.2.9. RTTA İFADE EDEN STABİL TG8G HÜCRELERİN HAZIRLANMASI .....	34
4.2.10. RTTA İFADE EDEN T98G HÜCRELERİNE PRETROX-PUR- $ΔP63B$ PLAZMİTİNİN TRANSFEKSİYONU İLE STABİL HÜCRE ELDE EDİLMESİ ..	34
4.2.11. HÜCRE TRANSFEKSİYONU .....	35
4.2.12. MTT DENEYİ.....	35
4.2.13. LDH TESTİ .....	35
4.2.14. APOPTOZİS TESTİ.....	36
4.2.15. WESTERN BLOTTİNG .....	36
4.2.16. İSTATİKSEL ANALİZ.....	37
<b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. <i>ΔNP63B</i> TRANSKRİPT ÜRÜNÜNÜN PARSİYEL OLARAK PZR YÖNTEMİYLE ÇOĞALTILMASI.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2. <i>ΔNP63B</i> PZR ÜRÜNÜNÜN KLONLANMASI.....</b>	<b>40</b>
5.2.1. PBSK-T İÇERİSİNE KLONLANMASI VE REKSTRİKSİYON ENZİMİYLE DOĞRULANMASI.....	40
5.2.2. PRETROX-TİGHT-PUR VEKTÖRÜ İÇERİSİNE $ΔNP63B$ 'NİN KLONLANMASI VE REKSTRİKSİYON ENZİMİYLE DOĞRULANMASI.....	41
<b>5.3. RTTA İFADE EDEN STABİL TG8G HÜCRELERİN HAZIRLANMASI.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4. PRETROX-PUR-P63B BULUNDURAN TAT98G HÜCRELERİNİN DOKSASİKLİN VARLIĞINDA <math>ΔNP63B</math> İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>	<b>44</b>
<b>5.5. <math>ΔNP63B</math> İZOFORMUNUN HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN MTT TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI.....</b>	<b>44</b>
<b>5.6. <math>ΔNP63B</math> İZOFORMUNUN HÜCRE SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN LDH TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI .....</b>	<b>45</b>
<b>5.7. <math>ΔNP63B</math> İZOFORMUNUN HÜCRE APOPTOZİSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>	<b>46</b>



<b>5.8. ΔNP63B İZOFORMUNUN HEDEF GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>	<b>46</b>
5.8.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL MEKANİZMASINDAN SORUMLU GENLERİN VE PROLİFERASYONDAN SORUMLU GENLERİN ANALİZİ.....	48
5.8.2. APOPTOZİS İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE ANALİZLERİ.....	54
5.5.3. P53 İLE İLİŞKİLİ INF HEDEF GEN İFADESİNİN ANALİZLERİ.....	57
<b>5.9. TAT98G VE TAT98G-ΔNP63B HÜCRELERİNİN PROTEİN İFADE DÜZEYLERİNİN WESTERN BLOT İLE GÖSTERİLMESİ VE GEN İFADE DÜZEYLERİYLE KIYASLANMASI.....</b>	<b>60</b>
5.9.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL MEKANİZMASINDAN SORUMLU PROTEİNLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN ANALİZİ .....	62
5.9.2. APOPTOZİS İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN ANALİZİ .....	64
5.9.3. P53 İLE İLİŞKİLİ INF HEDEF PROTEİNLERİNİN İFADE DÜZEYLERİNİN ANALİZİ .....	65
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>KAYNAKLAR .....</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b><u>EKLER.....</u></b>	<b><u>78</u></b>
<b><u>ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b><u>YAYINLAR.....</u></b>	<b><u>82</u></b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. p63 izoformlarının yapısının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. p63 izoformlarının protein yapısının şematik gösterimi .....	5
Şekil 2.3. Çeşitli doku örneklerinde p63'ün immunohistokimyasal boyanması .....	6
Şekil 2.4. P63 -/- farelerde deri oluşumunun gösterimi.....	7
Şekil 2.5. P53 ve p63 yapıları arasındaki farklılıkların gösterimi .....	9
Şekil 4.1. pBSK vektörünün genel yapısı.....	14
Şekil 4.2. pRetroX-Tet-On vektörünün genel yapısı.....	15
Şekil 4.3. pRetroX-Tight-Pur vektörünün genel yapısı.....	16
Şekil 4.4. pRetroX-Tight-Pur-Luc'un genel yapısı .....	17
Şekil 4.5. $\Delta Np63\beta$ izoformunun kesim bölgelerinin ve primerlerin bağlandığı yerlerin şematik gösterimi.....	29
Şekil 4.6. $\Delta Np63\beta$ PZR ürününün pBSK İçerisine Klonlanması .....	29
Şekil 4.7. $\Delta Np63\beta$ 'nın pRetroX-Tight-Pur vektörü içerisine konlanması .....	30
Şekil 5.1. $\Delta Np63\beta$ transkript ürününün parsiyel olarak çoğaltılan PZR ürünlerinin görüntülenmesi .....	38
Şekil 5.2. $\Delta Np63\beta$ 'nın PZR ürününün görüntülenmesi .....	39
Şekil 5.3. $\Delta Np63\beta$ 'nın pBSK vektörü içerisine klonlanması .....	40
Şekil 5.4. pBSK- $\Delta Np63\beta$ klon 1'in restriksiyon enzimleriyle doğrulanması .....	41
Şekil 5.5. $\Delta Np63\beta$ 'nın pRetroX-Tight-pur vektörü içerisine klonlanması .....	41
Şekil 5.6. Retro - $\Delta Np63\beta$ klon 10' un restriksiyon enzimiyle doğrulanması .....	42
Şekil 5.7. rtTA ifade eden T98G hücrelerinin Lusiferase geni ifade düzeyleri.....	43
Şekil 5.8. TAT98G retro/p63 $\beta$ ifade eden hücrelerin aktin ve p63 ifade düzeyleri .....	44
Şekil 5.9. $\Delta Np63\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımdan 72 saat sonra birbirinden bağımsız 3 kez tekrarlanan MTT testi yapılarak proliferasyon üzerine etkisinin araştırılması.....	45
Şekil 5.10. $\Delta Np63\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımdan 72 saat sonra birbirinden bağımsız 3 kez tekrarlanan LDH testi yapılarak hücre üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması.....	45
Şekil 5.11. $\Delta Np63\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin tetrasiklin ile uyarımdan 72 saat sonra birbirinden bağımsız 3 kez tekrarlanan apoptozis testi yapılarak hücre üzerindeki apoptotik etkisinin gösterimi .....	46

Şekil 5.12. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P63 ifade düzeylerinin gösterimi .....	47
Şekil 5.13. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra aktin ifade düzeylerinin gösterimi .....	47
Şekil 5.14. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P21 ifade düzeylerinin gösterimi .....	48
Şekil 5.15. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CYCD1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	49
Şekil 5.16. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P13K ifade düzeylerinin gösterimi .....	49
Şekil 5.17. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra AKT1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	50
Şekil 5.18. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra TGFA ifade düzeylerinin gösterimi .....	50
Şekil 5.19. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra TGFB3 ifade düzeylerinin gösterimi .....	51
Şekil 5.20. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra Midkin ifade düzeylerinin gösterimi .....	51
Şekil 5.21. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IGF2 ifade düzeylerinin gösterimi .....	52
Şekil 5.22. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IGFBP2 ifade düzeylerinin gösterimi .....	52
Şekil 5.23. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra HIF1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	53
Şekil 5.24. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra PAF1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	53
Şekil 5.25. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BCLX1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	54
Şekil 5.26. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BAX ifade düzeylerinin gösterimi .....	55
Şekil 5.27. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BAD ifade düzeylerinin gösterimi .....	55
Şekil 5.28. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BİD ifade düzeylerinin gösterimi .....	56

Şekil 5.29. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	56
Şekil 5.30. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP2 ifade düzeylerinin gösterimi .....	57
Şekil 5.31. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra XIAP ifade düzeylerinin gösterimi .....	57
Şekil 5.32. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra MX1 ifade düzeylerinin gösterimi .....	58
Şekil 5.33. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra MX2 ifade düzeylerinin gösterimi .....	58
Şekil 5.34. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra OASL ifade düzeylerinin gösterimi .....	59
Şekil 5.35. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IFI6 ifade düzeylerinin gösterimi .....	59
Şekil 5.36. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra p53 ifade düzeylerinin gösterimi .....	60
Şekil 5. 37. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra aktin proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	61
Şekil 5. 38. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P63 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	61
Şekil 5. 39. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra p21 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	62
Şekil 5. 40. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra AKT1 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	63
Şekil 5. 41. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra PH AKT1 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	63
Şekil 5. 42. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP1 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	64
Şekil 5. 43. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP2 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	64
Şekil 5. 44. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra XIAP proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	65
Şekil 5. 45. $\Delta$ Np63 $\beta$ ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IL29 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi .....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Luria bertani (LB) agar katı besiyerinin hazırlanışı .....	20
Çizelge 4.2. Luria bertani (LB) agar sıvı besiyerinin hazırlanışı .....	20
Çizelge 4.3. Hücre kültürü besiyerinin hazırlanışı .....	21
Çizelge 4.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar.....	22
Çizelge 4.5. Agaroz jelin hazırlanışı .....	22
Çizelge 4.6. Alkalın lizis solüsyonların hazırlanışları.....	23
Çizelge 4.7. Western blot solüsyonlarının hazırlanışı .....	24
Çizelge 4.8. Kullanılan primerler .....	26

## SİMGELER DİZİNİ

Bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Santigrat derece
C	Karbon
cDNA	Komplementer DNA
COOH	Karboksilik asit
CIAP1	Baculoviral IAP repeat containing 1
CIAP2	Baculoviral IAP repeat containing 2
CMV	Cytomegalo Virus
DBD	DNA Bağlanma Domaini
ddH <sub>2</sub> O	Çift damıtılmış su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNTP	Deoksinükleotid triphosphate
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EEC sendromu	Ektodermal displazi
g	Gram
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IFI6	Interferon alpha-inducible protein 6
IFN	İnterferon
IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2
IL29	İnterlökin 29

JAG1	Jagged1
L	Litre
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Micro RNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	messenger RNA
MSV	Fare sarkoma virus
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OASL	59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein
OD	Oligomerizasyon domaini
PBS	Phosphate-buffered saline
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	Round per minute
RT-PZR	Reverse Transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
rtTA	Reverse tetrasiklin transaktivatör
SAM	Steril alfa motifi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
TA	Transaktivatör

TAE	Tris asetik asit EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris borik asit EDTA
TGFA	Transforming growth factor alpha
TGFB3	Transforming growth factor beta-3
Tet	Tetrasiklin
TID	Transaktivatör inhibisyon domaini
UV	Ultra violette
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar



## 1. GİRİŞ

P63, tümör baskılayıcı olan p53'e benzeyen 1998 yılında keşfedilmiş bir proteindir. P63 genin kodladığı proteinler, N-terminal transaktivasyon, DNA bağlanma ve karboksil oligomerizasyon gibi p53'ün protein yapısında bulunan domainlere benzerlik göstermektedir (1). Bu domainlerin dışında alternatif promotor ya da alternatif splizing ile tamamen farklı fonksiyonlara sahip izoformlar oluşmaktadır (2). Bu izoformlar başta embriyonal epitel oluşumu ve gelişiminde önem taşımakla birlikte p63 geninde meydana gelen mutasyonlar ektodermal displazi ile karakterize epidermal defektlere neden olmaktadır (1).

İnsanlarda görülen kanserlerde en sık görülen p53 mutasyonları, kanserin metastaz yeteneği ve prognozu gibi fenotipik fonksiyonlarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (3). Yapısal olarak p53'e oldukça benzeyen p63'ün fonksiyonel olarak da benzer özellikte olması beklenmektedir. Hücre invazyon yollağında etkili olduğu bilinen p63, hücre invazyonunun metastaz üzerindeki etkisi düşünüldüğünde kısmen de olsa insanlarda görülen kanserlerin prognozunu belirlemesine aracılık ettiği görülmektedir. Bunlara ek olarak 'epitelyal düzenleyici' işlevi ile p63, epidermal mezenşimal geçiş, kök hücrenin oluşumu, hücre yaşlanması, hücre ölümü ve hücre döngüsünün durdurulması gibi fonksiyonlarında görevlidir. Bu özellikler kanserin prognozunu belirlemesinde oldukça önemli yer tutmakta bu özellikleriyle birlikte p63 kanser hücrelerinin kemoterapiye direncini veya duyarlılığını etkilemektedir (4).

P63, transaktivasyon domaini içeren ve içermeyen olmak üzere iki, daha sonra karboksil ucunda meydana gelen alternatif splizing ile de beş farklı izoform oluşturmaktadır (Şekil 2.1, Şekil 2.2) (4, 5). TAp63 hücre ölümü ve hücre döngüsünü durdurma özelliği ile tümör baskılayıcı,  $\Delta$ Np63 ise genellikle kanserde aşırı salınarak onkojeniktir. Bu özelliğiyle bu iki izoform birbiriyle zıt etkilere sahip oldukları düşünülmektedir (6).

Farklı izoformlara sahip p63'ün henüz fonksiyonları detaylı olarak tanımlanmamış olan  $\Delta$ Np63 izoformunun T98G (İnsan glioma kanser hücresi) hücresi üzerindeki genotipik ve fenotipik etkileri bu çalışmada incelenmiştir. Bu amaçla; tümör baskılayıcı özellikte

olduğu düşünölen p63'ün isteğimiz dışında hücrede fenotipik, genotipik değişiklikler yapmasını önlemek ve direkt olarak p63 proteinin etkisini görebilmek için  $\Delta$ Np63 $\beta$  izoformunun doksasiklin varlığında ifade artışını (overekspresyonunu) sağlayan vektör sistemi kullanıldı. Bu nedenle en sık kullanılan indüksüyon yöntemi olan 'pRetroX-Tet-On' vektörü ile doksasiklin varlığında rtTA ifadeleyen sürekli hücre hatları elde edildikten sonra, seçilen hücre hattı içerisine Retro-pur retroviral vektör sistemi içerisine klonlanan  $\Delta$ Np63 $\beta$  izoformu transfekte edildi. Doksasikin varlığında  $\Delta$ Np63 $\beta$  izoformunu yüksek düzeyde ifadeleyen sürekli hücre hatları elde edildikten sonra  $\Delta$ Np63 $\beta$ ' nın hedef hücre üzerindeki fenotipik ve genotipik özellikleri araştırıldı.

Çalışmada  $\Delta$ Np63 $\beta$  cDNA'sını elde etmek için kullanılan hücrelerin hiç birinde bu izoformun ifadesine rastlanmadı bunun üzerine ifade düzeyinin yüksek olduğu bilinen epitel hücrelerinden parsiyel PZR ürünleri bir araya getirilerek ile  $\Delta$ Np63 $\beta$  cDNA'sı elde edildi. Ancak bu deneyin genelinde kullanacağımız hücrede p63 ifadesinin olmaması, çalışmanın başında planladığımız  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nın hücrede ifadesinin azaltılması veya ortadan kaldırılması ile ilgili siRNA ifade sistemlerinin kullanılmasına gerek olmadığına karar verildi. Bundan dolayı çalışmamızda sadece genotipik ve fenotipik incelemeler  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nın ifade artışına (overekspresyonuna) dayanmaktadır. Ayrıca tezde kullanılması planlanan Hep G2 hücrelerinin transfeksiyon güçlüğü ve sürekli hücre hattı elde edilmesinde yaşanan zorluklar nedeniyle yerine glioblastoma multiforme hücrelerinden elde edilen T98G hücre hattının kullanılması uygun görölerek deneylere bu hücreyle devam edildi.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. P63'ün Keşfi

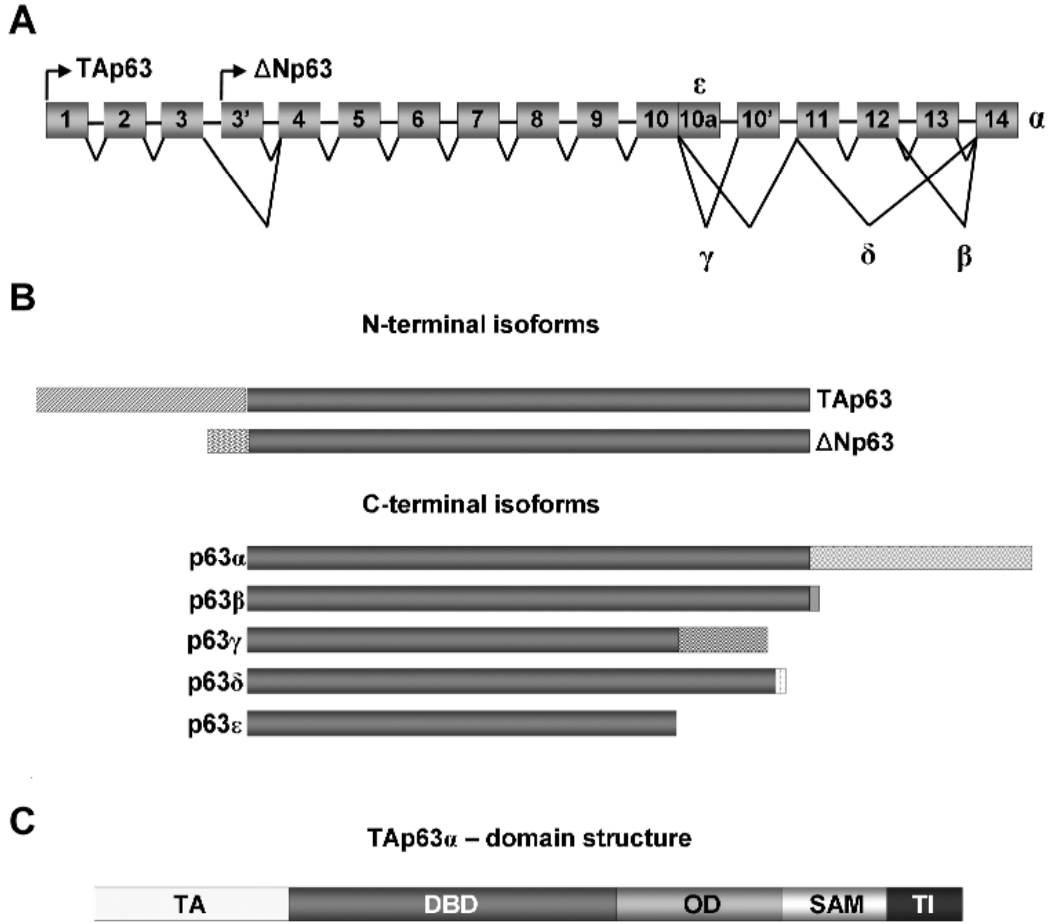
P63, p53 ailesinin tümör oluşumu ve ontogenezde önemli fonksiyonları olan transkripsiyon faktörü bir üyesidir. 1997'de p73'ün 1998'de p63'ün keşfine kadar p53'ün uzun bir zaman yapı ve fonksiyon olarak benzersiz olduğu düşünülmekteydi. Filogenetik çalışmalar p63 ve p73'ün evrimsel olarak p53'den daha eski olduğunu ve p63'ün hem p53'ün hem de p73'ün evrimsel atası olduğunu düşündürmektedir (7-9). Omurgasız hayvanlarda da p53 ailesinin sadece bir geni vardır o da yüksek derecede omurgalı p63'üne benzerlik göstermektedir. Bu nedenle daha sonra gelişmiş p53 özellikle tümör baskılayıcı özellikteyken evrimsel olarak daha eski olan p63 ve p73 ontogenez ve tümör oluşumunda farklı bir rol oynamaktadır (4, 10).

### 2.2. P63 Geni ve Protein Yapısı

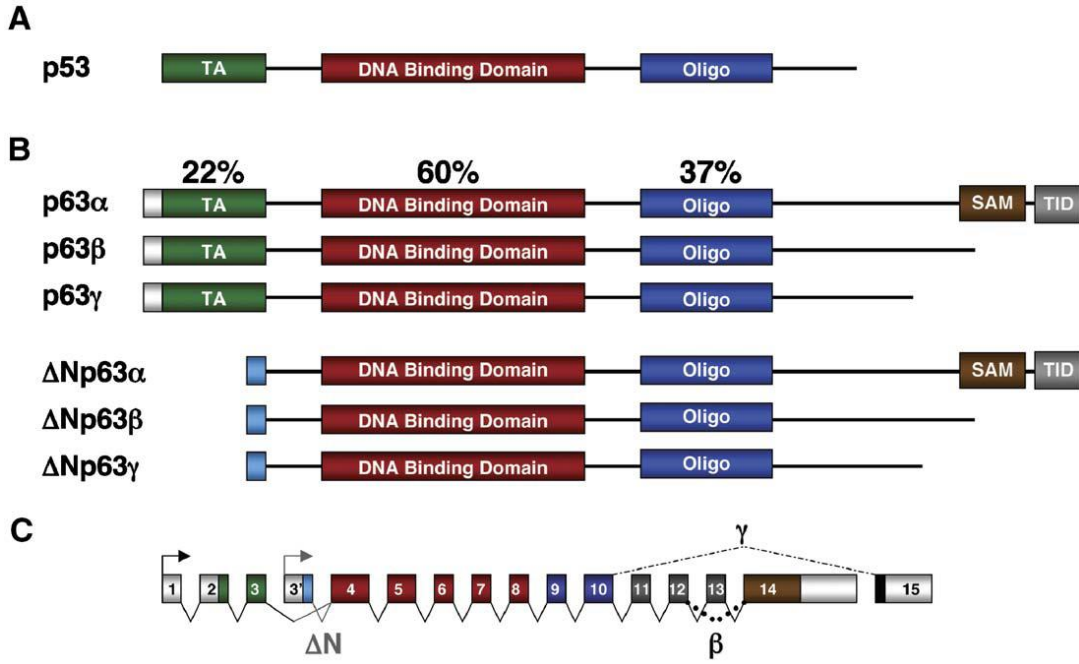
İnsan TP63 geni kromozomda 3q27-29'da yer alır. 15 ekzon ve iki promotör içermektedir (5, 11). TP63'ün tanımlanan ana fonksiyon domainleri transaktivasyon domaini (TA), DNA bağlanma domaini (DBD) ve oligomerizasyon domaini (OD) olarak bilinmektedir (Şekil 2.2) (7). TP63 iki farklı promotordan ifade olur. Birinci promotör 1.ekzonun öncesinde, ikinci promotör da 3. intronda bulunur. Birinci promotordan N terminal ucunda TA içeren TAp63 izoformu, ikinci promotordan TA domaini içermeyen  $\Delta$ Np63 izoformu ifade olur. Bu transkripsitlerin her ikisinin de karboksil ucunda meydana gelen alternatif splicing ile farklı izoformlar oluşmaktadır (5). C uçları farklı kısımlarla birleşerek  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  izoformlarını oluştururken,  $\delta$ ,  $\epsilon$  varyasyonları da yakın bir zamanda tanımlanmıştır (Şekil 2.1.) (12).

$\alpha$  proteinler, izoformlar arasındaki en uzun proteinlerdir ve tüm terminal ekzonları içerirler. Bunlar: protein protein interaksiyona dahil olan steril alfa motifi (SAM), onu takiben TA alt grup izoformlarının transkripsiyonel aktivitesinin oto inhibisyonunu yapabilen inhibitör domainidir (TI) (12-14).  $\beta$  varyantlarında, ekzon 13 ve dolayısıyla SAM ve TI domainleri

bulunmaz.  $\gamma$  varyantlarında 11, 12, 13, 14 ekzonları bulunmazken, intron 10'da fonksiyonu bilinmeyen ek bir dizi bu izoforma dahil olmaktadır (Şekil 2.2.) (12, 15).



Şekil 2.1. p63 izoformlarının yapısının şematik gösterimi (4)

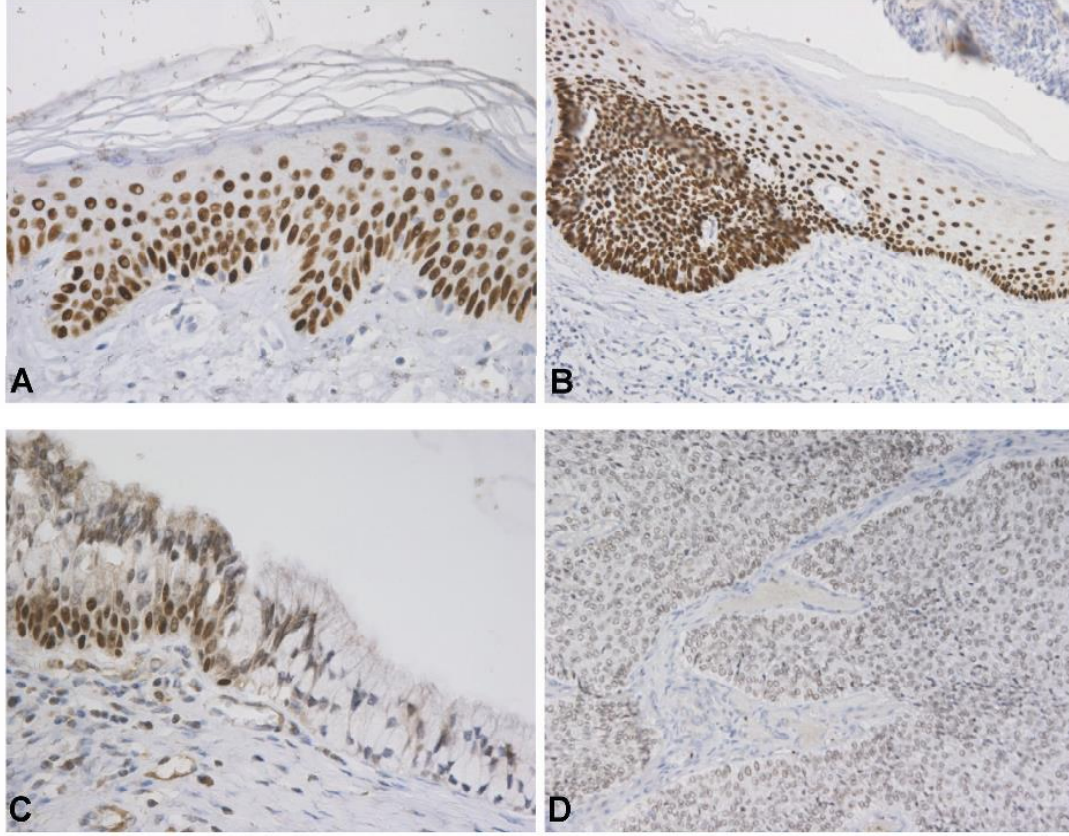


Şekil 2.2. p63 izoformlarının protein yapısının şematik gösterimi (5)

### 2.3. P63'ün Embriyonik Gelişmedeki Rolü

P63 izoformlarının ifade düzeyleri ve modelleri farklı karakterdedir.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  baskın izoformdur. Bazal hücrelerde ve glandular epitelde yüksek derecede ifade olur. İfade hüresel farklılaşmayla azalır. P63 ifadesi epitelyal hücrelerle sınırlıdır özellikle deri, özafagus, tonsil, idrar kesesi, prostat ve meme gibi grandular dokularda ifade olduğu gözlenmiştir. Normal dokularda yapılan araştırmalarla uyumlu olarak p63, baskın olarak bazal hücre ve skuamoz hücre karsinomunda ifade olmaktadır. P63 izoformlarının tümünü tanımlayan aynı monoklonal antikor kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu antikorun TAp63'ü identifiye edemediğini düşünülmüş, bunun üzerine iki N-terminal izoformlarını tanımlayan poliklonal antikor kullanılmıştır. Böylece TAp63 proteinin epitelin suprabazal bölgesinde  $\Delta$ Np63'ün de bazal bölgede ifade olduğu gösterilmiştir. TAp63 izoformunun fonksiyonu epidermal morfogenezin ilk aşamalarında,  $\Delta$ Np63 izoformunun epidermal morfogenezin sonraki aşamalarında baskın olarak ifadelendiği gözlenmiştir. Bu izoformların olgun epidermiste belirlenmesinin zor olduğu rapor edilmiştir (4).  $\Delta$ Np63 $\alpha$  özellikle bazal tabakanın keratinositlerinde ifadelenir ancak bu proteinin ifadesi, olgun epiderminin farklılaşmış suprabazal katmanın keratinositlerinde azalır (Şekil 2.3.) (16, 17). TAp63'ün  $\Delta$ Np63'e göre daha kısa yarılanma süresi olduğu bunun nedeninin de TA

domaininin proteozoma bağı protein stabilitesini düzenleyen rolünden kaynaklandığı gösterilmiştir. Bu nedenden dolayı da  $\Delta$ Np63 ifade düzeyinin daha baskın olduğu sanılmaktadır (4, 18).



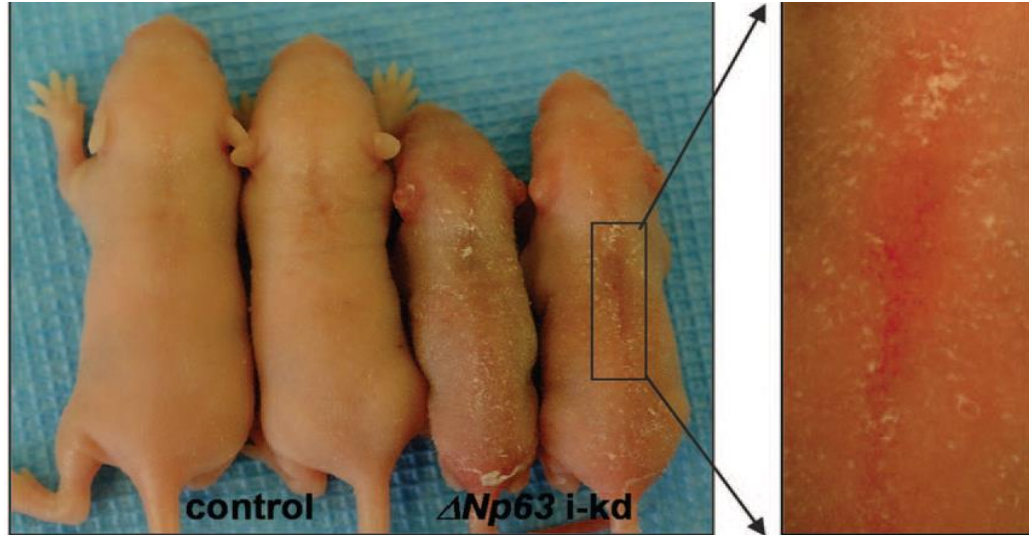
**Şekil 2.3.** Çeşitli doku örneklerinde p63'ün immunohistokimyasal boyanması (4)

A. Normal derinin epitel B. Deride bazal hücreli karsinom C. Endoservikal epitel D. Ürotelyal karsinom

Yapılan çalışmalarda, p63'ün embriyonik gelişmede önemli bir mediyatör olduğu gösterilmiştir (12, 19). P53'ün aksine p63 epidermis, meme ve prostat gibi epitelyal dokuların gelişiminde kritik öneme sahiptir. P63'ün fonksiyonunun önemi hayvan modellerinde p63 geninin yok edilmesiyle anlaşılmıştır. Yapılan deneyler sonucu, P63  $-/-$  farelerde, çarpıcı bir şekilde gelişim defektleri oluşmuş, meme, salgı ve tükürük bezlerini kapsayan tüm skuamöz epitel ve epidermal uzantılar eksik meydana gelmiştir. Doğumdan sonra şiddetli dehidrasyon sonucunda ölümler şekillenmiş (Şekil 2.4.) (20), uzuvların gelişiminde de defektler meydana gelmiştir (5).

Farelerde yapılan deneyler deride oluşan defektlerin nedeninin fonksiyonu kaybolmuş  $\Delta Np63\alpha$ 'nın indüklediği membran bütünlüğü ve farklılaşması için gerekli olan genler Frs1 ve I $\kappa$ B kinaz- $\alpha$  (I $\kappa$ k $\alpha$ ) olduğu bulunmuştur (17, 21). Bu araştırmaların sonunda  $\Delta Np63$  proteininin p63'ün epitel gelişimindeki fonksiyonu için kritik bir öneme sahip olduğu anlaşılmıştır (5).

Farelerde yapılan çalışmaların yanında insanlarda yapılan araştırmalar sonucunda da p63 geninde meydana gelen mutasyonlar çeşitli gelişim defektlerini yanında getirmektedir. P63 mutasyonunun EEC sendromunu, (split el -split ayak- ektodermal displazi – yarık damak yarık dudak sendromu) p63 fonksiyon değişikliği nedeni ile oluştuğu düşünülmektedir. Sendroma neden olan p63 mutasyonu büyük ölçüde DNA bağlanma bölgesinde olmakta ve mutant p63, proteinlerin DNA'ya bağlanma yeteneğini ortadan kaldırmaktadır. P63'de meydana gelen DNA bağlanma bölgesindeki mutasyonlar tümörlerde bulunan p53 mutasyonu ile homoloji göstermektedir (11, 22-24). P63'ün embriyonik dönemde saç ve diş gelişiminde de önemli fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (25, 26).



**Şekil 2.4.** P63 -/- farelerde deri oluşumunun gösterimi (20)

P63 keratinositlerin farklılaşmamış durumunun korunması için önemlidir. Hem fare hem de insan keratinositlerinde p63 ifadesi Notch aktivasyonu tarafından baskılanır (4). Keratinositlerde  $\Delta Np63$ 'ün regülasyonunun azalması hipoproliferasyona neden olmaktadır.  $\Delta Np63$  proliferasyonu sağlamak için, keratinositlerin farklılaşması sırasında hücre

döngüsünde görevli p21'i, siklin bağımlı kinaz inhibitörünün ifadenmesini engellediği gözlenmiş.  $\Delta Np63\alpha$  p21 promotoruna bağlanarak p21 ifadesini direkt baskılamakta hem de epidermiste Notch sinyal sistemini engelleyerek p21 ifadesini inhibe etmektedir (27, 28). TP63'ün susturulması Notch ifadesinin regülasyonunu artırır ve keratinosit proliferasyonunun azalmasına neden olur.  $\Delta Np63\alpha$  ifade artışı Notch seviyesinin azalmasına ve keratinositlerin proliferasyon potansiyelinin artmasına neden olur (29). Bu bilgiler, p63 Notch1 bağımlı transkripsiyonun seçici modülatörü olarak fonksiyon gösterdiğini düşündürmektedir. Bu nedenlerden dolayı Notch ve p63 arasında keratinositlerin kendini yenilemesi ve farklılaşmasında bir denge oluşturduğu anlaşılmaktadır (4).

#### **2.4. P53 ve P63 Benzerlikleri ve Farklılıkları**

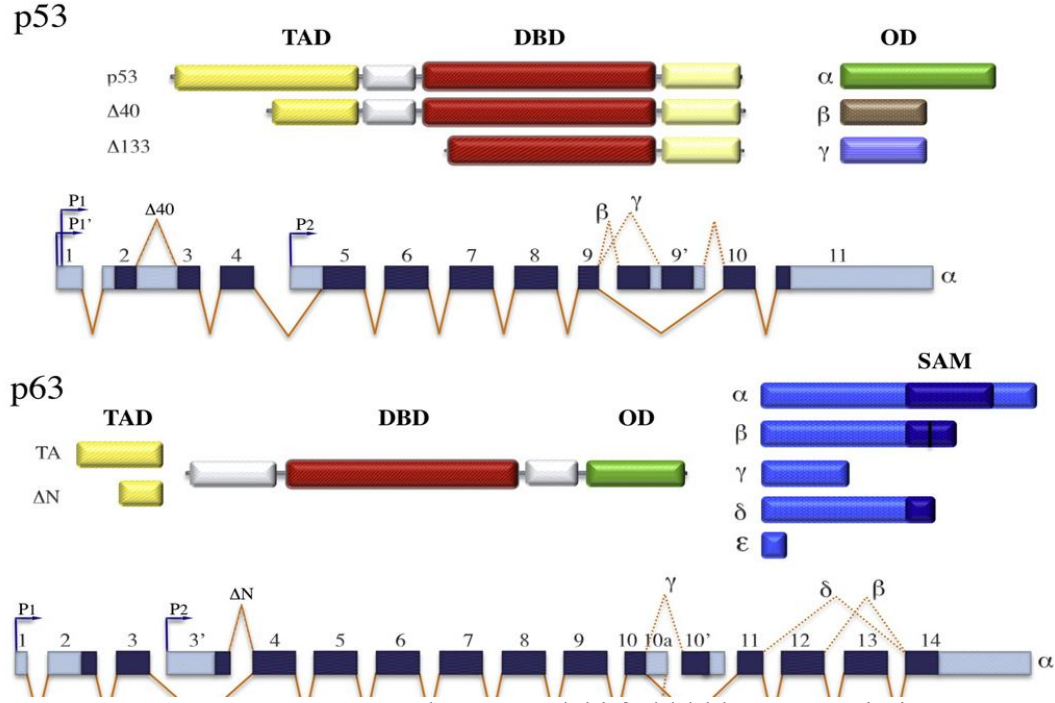
P53'ün keşfinden otuz yıl sonra, p53 gen ailesinden olduğu düşünülen p63 bulunmuştur. Bu genin p53 ile yapısal benzerliğinin temeli, tümör baskılayıcı özellikte olması, apoptozisin tetiklenmesinde etkili olması ve hücre döngüsünün kontrolünde görev alması gibi fonksiyonel benzerliklerinden ileri gelmektedir. Yapısal olarak p53: TA, özgül DNA bağlanma bölgesi ve oligomerizasyon olmak üzere üç tane domain ve tek bir promotor bulundurmaktadır, p63 iki promotor bulundurmaktadır; bunun sonucunda da iki tip protein, COOH ucunda meydana gelen alternatif splicing ile de her birinden üç farklı izotip oluşturmaktadır (Şekil 2.5.) (30).

Tüm p63 proteinleri, p53'ün DNA bağlanma domainindeki aminoasit dizisine % 60 oranında benzemekte, yaklaşık % 37 benzer oligomerizasyon domaini olarak kodlanmaktadır (11).

Apoptozisin indüklenmesi, hücre döngüsünün kontrolü için gerekli p53'ün çeşitli hedef genlerini transaktive ederek p53 benzeri gibi davrandığından dolayı TAp63'ün bir tümör baskılayıcı (30), bunun aksine  $\Delta Np63$  izoformunun ise, TAp63 ve p53'ü inhibe etme kabiliyeti ve kendine özgü fonksiyonlarının varlığı ile muhtemelen bir onkojen olduğu düşünülmektedir (31). Esas olarak birçok makalede p53'ün rolünün tümörün ilerlemesini baskılamak ile ilgiliyken p63'ün ise daha çok direkt olarak tümörün gelişmesi ve farklılaşmasıyla ilgili olduğu belirlenmiştir (12).



P63; MDM, BAX, PERP ve NOXA gibi p53'ün hedef genlerine bağlanabilmektedir. P53'e benzer şekilde apoptotik fonksiyonları gerçekleştirmektedir (1, 32).



Şekil 2.5. P53 ve p63 yapıları arasındaki farklılıkların gösterimi (2)

## 2.5. P63 Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri

P53 ailesi çok sayıda kovalent modifikasyon ve protein etkileşimiyle düzenlenmekte ve bunlar p53 ailesinin farklı üyeleri için ortak kullanılabilir. Bu ailenin üyeleri olan proteinler benzer regülasyon mekanizmalardan etkilenseler de bu mekanizmalar ilgili proteinlerin biyolojik aktivitesi üzerinde farklı şekilde etkili olabilmektedir. Ayrıca her bir proteine veya izoforma özel düzenleyici mekanizmalar da tanımlanmıştır (33-35).

P53 ailesi üyelerinden bir tanesi olan p63 proteini, p53'e benzerlik göstermektedir. P63 proteini dizi spesifik DNA bağlama özelliği ile transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir (5, 7, 11). TAp63 izoformları p53 DNA bağlama bölgeleri aracılığı ile heterolog promotörüyle hedef genlerin transkripsiyonun yanı sıra p21 gibi p53 hedef geninin endojen promotörüyle transkripsiyonu aktive eder. TAp63 proteini genellikle transkripsiyonel regülasyondan dolayı çok az ifade olmaktadır ve TAp63 proteini oldukça

dayanıksızdır. TAp63 $\gamma$  yaklaşık 1,5 saat yarılanma ömrüne sahiptir ve TAp63'ün degradasyonunun regülasyonunda rol oynayıp oynamadığı tam olarak bilinmemektedir. TAp63 $\gamma$  p53'e yapısal olarak en çok benzeyen izoformdur ve p63 izoformlarının en güçlü transaktivatörüdür. TAp63 $\alpha$  da transkripsiyonu aktive eder ancak yapısında bulundurduğu transaktivatör inhibitör domaini (TID) nedeniyle TAp63 $\gamma$  ile karşılaştırıldığında transaktivatör özelliği dikkate değer bir şekilde düşüktür. TID, TA domaini ile interaksiyona girerek TAp63 $\alpha$ 'nın transaktivasyon kapasitesini sınırlamaktadır. P63'ün alfa izoformları da p53'ün hücre döngüsünün durdurulmasında ve apoptoziste rol oynayan hedef genlerinin aktivatörleri arasındadır (36-39).  $\Delta$ Np63 proteinler, TAp63 proteinlerine göre daha stabildir (8). Epitel hücrelerin ve dokuların gelişiminden sonra TAp63 proteini az ifade olurken ya da hiç ifade olmazken  $\Delta$ Np63 proteininin seviyesi baskın bir şekilde artmaktadır (40).

MikroRNA'lar, kodlanmayan küçük RNA'lardır. miRNA'lar mRNA'ların 3'UTR bölgesine spesifik olarak bağlanarak ya translasyonu baskılar ya da mRNA'ların degradasyonunu tetikler (41, 42). Gen ifadesinin regülasyonunda rol oynayan miRNA'lar, p53 ailesinin proteinlerinin posttranskripsiyonel regülasyonunun fonksiyonel aktivasyonun altında yatan mekanizmadır (33). Tümör baskılayıcı p53'ün fonksiyonunda etkili miRNA olarak: miR-34, miR-192/215, miR107 ve miR-145 tanımlanmıştır (43). P63 ifadesini de düzenleyen spesifik miRNA'lar vardır. Epitel hücrede miR-203 p63'ü regüle eden ilk miRNA olarak tanımlanmıştır. Tümör baskılayıcı olarak tanımlanan TAp63'ün aksine,  $\Delta$ Np63'ün miR-203 tarafından negatif olarak regüle edildiği gösterilmiştir (44). Daha sonraki yıllarda, miR-5743p ve miR-720 p63 protein translasyonunu inhibe eden iki önemli regülatör olarak tanımlanmıştır (33). Epidermal miRNA ifade profilini ya direkt transkripsiyonel regülasyon yoluyla ya da indirekt Dicer ve DGCR8'in transkripsiyonunu tetikleyerek kontrol etmektedir. P63 ve miRNA'lar arasındaki bu kompleks bağlantı epidermal hücrelerin kaderini belirlemektedir (45). Yapılan birçok çalışmada, miRNA'ların kanserin oluşması ve ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (33, 46). miRNA'ların ifade artışı primer ve metastazik tümörlerde rapor edilmiş ancak bu sürecin nasıl şekillendiği tam olarak anlaşılammıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar TAp63'ün tümör oluşumunu ve metastazı baskılama özelliğiyle koordineli bir şekilde Dicer ve miR-130b regülasyonu sağladığı gösterilmiştir (47). Ayrıca p63'ün Dicer promotoruna bağlandığı rapor edilmiştir (48).

Genomik stresi takiben, tümör baskılayıcı p53 bir seri post traslasyonel modifikasyonlar geçirir (49). P53 fonksiyonunda protein stabilitesinin düzenlenmesi ve posttraslasyonel modifikasyonların kritik bir rolü vardır. Bu yüzden p63 proteinleri içinde bu süreç incelenmiştir ve p53 gibi  $\Delta Np63\alpha$  da fosfoprotein olarak bulunduğu ve DNA hasarı ve diğer hücrel stresleri takiben fosforilasyon artışı gösterdiği belirlenmiştir. Fosforilasyonun stres ile indüklenmesiyle  $\Delta Np63\alpha$ 'nın ubiquitinasyonu ve protosomal degradasyonu artar (50). P53 ve  $\Delta Np63\alpha$  protein stabilitesinin ters regülasyonu koordineli düzenlenen hedef genlerin hızlı bir şekilde modülasyonu sağlayan bir mekanizma gösterir.

P63 hedef geni olarak birçok gen tanımlamıştır. P63 proteinleri tarafından direkt düzenlenen Jagged 1'dir (JAG1). JAG1 Notch reseptörü için ligant kodlar; Notch sinyal sistemi hücrenin kaderinin belirlenmesinde, uzuvların, kraniyofasial gelişmede kritik bir öneme sahiptir. Notch sinyalinin p63 regülasyonu embriyogenezis sırasında rol oynar. Pigment epithelium derived factor (PEDF) p63'ün hedef genlerinden bir diğeridir. P63 tarafından regüle edilen diğer genler epitelyum gelişimi ve farklılaşmasında rol oynayan keratinosit farklılaşmasında marker olan loricrin ve involucrin gibi diğer genlerdir (5, 51).

## **2.6. P63'ün Kanser Üzerine Etkisi**

P63 ve p53'deki hem yapısal hem de biyokimyasal benzerlikler bu proteinlerin fonksiyonel olarak da benzer olacaklarını düşündürmektedir (4). Ancak P63, transkripsiyon faktör ve tümör baskılayıcı olan p53 ile homoloji göstermesine rağmen alternatif splicingle meydana gelen izoformları ile daha kompleks bir yapıya sahiptir. Yapılan deneylerde P53'den yoksun farelerden farklı olarak p63 susturulmuş farelerde, spontan tümörler oluşmazken sinir ve epitel gelişiminde defektler meydana gelmiştir. İnsanlar da ise, p53'de meydana gelen mutasyonlar yaklaşık % 20 oranında fonksiyonel olarak inaktif, % 50 oranında ise kanserle sonuçlanırken, p63 mutasyonları kanserlerde çok nadir görülmektedir. Ancak p63'de meydana gelen mutasyonlar genetik epidermal sendromları oluşturmaktadır (52). P63'den yoksun farelerde çeşitli gelişimsel bozukluklar olurken p53'den yoksun farelerde tümör oluşumu ve bunun ölümcül sonuçlarının olması, p63'ün tümör oluşumunda bir rolü olup olmadığına dair şüpheleri oluşturmuştur (53, 54).

P63, deri ve uzuvların gelişiminde önemli bir role sahiptir. Fare modelleri kullanılarak ve insanlarda yapılan mutasyon analizleriyle bu gösterilmiştir. Ancak henüz açıklanamayan bir soruda p63'ün bir tümör baskılayıcı mı yoksa bir onkojen mi olduğudur (55). Birçok çalışma p63 ifadesinin insanlarda meydana gelen tümörlerde arttığını gösterirken, yapılan başka çalışmalarda ise bunun aksine p63 ifadesinin kaybolduğu gösterilmiştir (56). P63'ün gelişim sürecinde özellikle de TAp63 izoformlarının fare modellerinde sinir gelişimi sırasında proapoptotik bir rol oynadığı gözlenmiştir. P53'e bağlı apoptozisde, p53 ailesi genleri arasındaki etkileşim karmaşık bir düzene sahiptir ve bu etkileşim dokuya göre farklılık göstermektedir. Bu da p53 ailesi üyelerinin birbirine bağlı olarak bir genin transaktivasyonu için hedef genin promotoruna bağlanabilme yeteneğine bağlıdır. Özellikle apoptozisten sorumlu genlerin transaktivasyonunda p63'ün sorumlu olduğu bildirilmiştir (31).

P63'ün insanlarda yapılan mutasyon analizlerinde çoğunlukla mutasyona uğramamış olması, ayrıca bazı kanser türlerinde de fazla ifade olması p53 gibi bir tümör baskılayıcı gen olup olmadığı konusunda tartışmaları beraberinde getirmiştir. Tümör baskılayıcı mı yoksa onkojen mi olduğuna dair yapılan tartışmalar sonucunda farklı izoformlara sahip p63'ün bu izoformlarının birbirine zıt fonksiyonlara sahip olduğunu ortaya çıkartmıştır. Yapılan bir çalışmada mesane karsinomlarının % 50'sinden fazlasında TAp63 ifadesinin azaldığı,  $\Delta$ Np63 ifadesinin ise arttığı gözlenmiştir. Ayrıca invaziv tümörlerin % 82'sinde TAp63 ifadesinin çok az olduğu ya da ifadesinin hiç olmadığı gözlenmiştir.  $\Delta$ Np63'ün ise mesane karsinomlarında fazla ifade olduğu bulunmuş ancak tümörün aşamasına göre bir korelasyon tespit edilmemiştir (31, 57). Mesane tümörlerinin dışında meme kanseri olgularında da p63 ifadeleri incelenmiş, aynı hastalardan alınan normal meme, duktal hipeplazi, duktal karsinom, ve invaziv duktal karsinom dokuları p63 yönünden taranmış ve duktal karsinomlarda p63 ifadesi hiç görülmezken, diğer dokularda p63 ifade varlığının devam ettiği gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma, p63 kaybının tümör progresyonunda rol oynamakta olduğunu desteklemektedir (58).

Bazı tümör tiplerinde ise özellikle skuamöz hücreli karsinomlarda, p63'ün ifade artışı tümör baskılayıcı özelliğinin aksine bir onkogen olduğunu düşündürmektedir. Yapılan ek çalışmalar,  $\Delta$ Np63'ün p53'ü inhibe ederken, TAp63'ün p53 transaktivasyonu sağlayarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (31, 50, 59)

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Keşfi yakın bir zamanda olan p63 molekülü p53 ailesi üyelerinden biri olmasına ve yapısal olarak yüksek oranda benzerlik göstermesine rağmen fonksiyonel olarak p53'den çok daha kompleks bir rol üstlenmektedir. P63'ün kompleks fonksiyonlarının nedenlerinden biri farklı izoformlar bulundurması ve bu izoformların birbirleriyle zıt etki göstermesidir. TAp63 hem yapısal hem de fonksiyonel olarak p53'e benzemektedir ve de p53 gibi tümör baskılayıcı özelliğe sahiptir. TAp63 aksine  $\Delta Np63$  ise transaktivasyon domainini bulundurmayarak yapısal olarak, onkojen özelliğiyle de fonksiyonel olarak farklılık göstermektedir. Transaktivasyon domainleri dışında karboksil uçlarında meydana gelen alternatif splicing ile yine farklı izoformlar meydana gelmektedir. Bu izoformlar  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  olarak isimlendirilmiş özellikle  $\alpha$  izoformları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. (6, 31).

P53-p63-p73'ün aralarındaki bağlantı tanımlandıktan sonra kanser araştırmalarında yeni bir sayfa açılmıştır. P53'den farklı olarak p63'ün farklı izoformlarının bulunması ve birbirleriyle farklı fonksiyonlara sahip olması p63 araştırmalarını hızlandırmıştır. Özellikle, TAp63'ün gelişim sürecinde tümör oluşumunda p53 ile arasındaki bağ dikkat çekicidir. P53 ile benzer özellik gösteren p63'de p53'ün aksine insanlarda meydana gelen kanserlerde kayda değer bir mutasyon tanımlanmamıştır (53).

P63'ün, hücre proliferasyonu, DNA hasarının kontrol mekanizması, hücre döngüsünün durdurulması, apoptozis, kanserin oluşumu ve metastazı gibi birçok hayati öneme sahip görevde rol oynaması p63 çalışmalarını önemli kılmaktadır. Bir çok izoforma sahip olan p63'ün özellikle  $\alpha$  izoformları üzerinde çalışmaların olmasına karşın  $\Delta Np63\beta$  izoformuyla ilgili detaylı bilgi bulunmamaktadır. Bundan dolayı, bu çalışmada  $\Delta Np63\beta$  izoformunun T98G glioma hücresi üzerindeki fenotipik etkilerinin yanı sıra özellikle p53 proteininin hedef genleri olmak üzere muhtemel hedef genlerin gen ifadeleri ve protein ifadelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

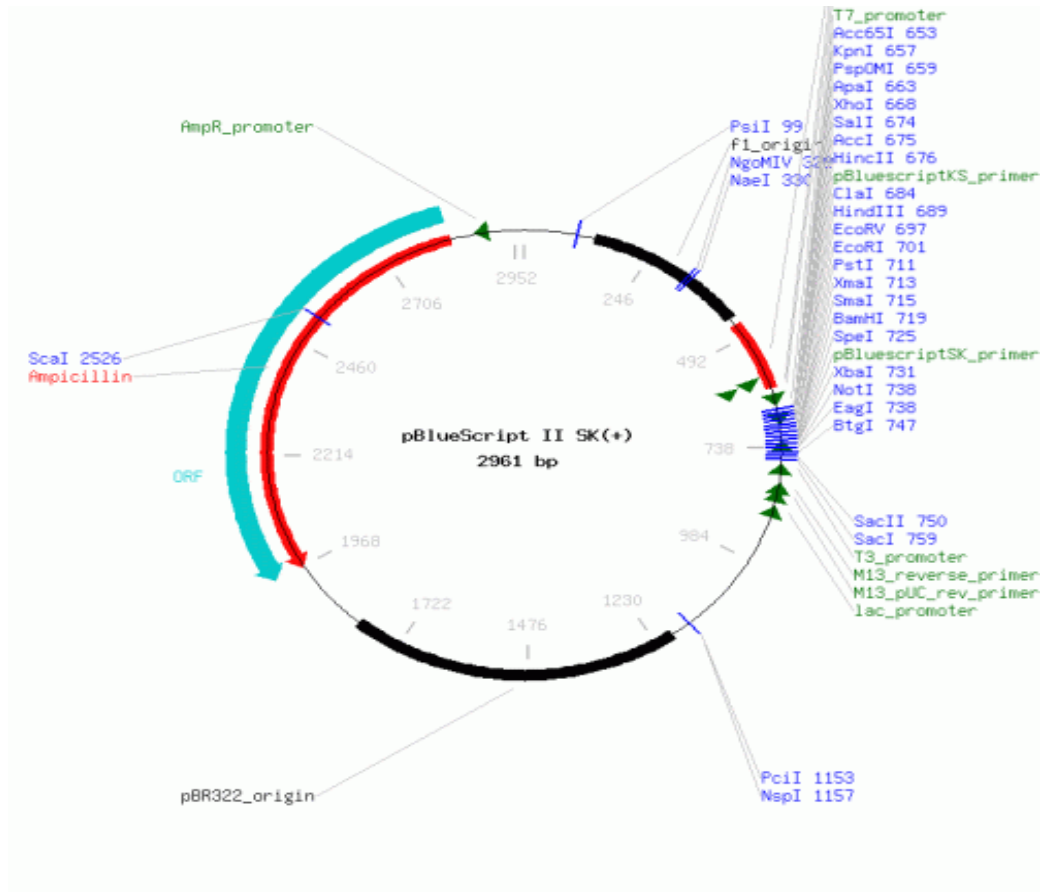
## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. Materyal

#### 4.1.1. Vektörler

##### 4.1.1.1. Klonlama vektörü

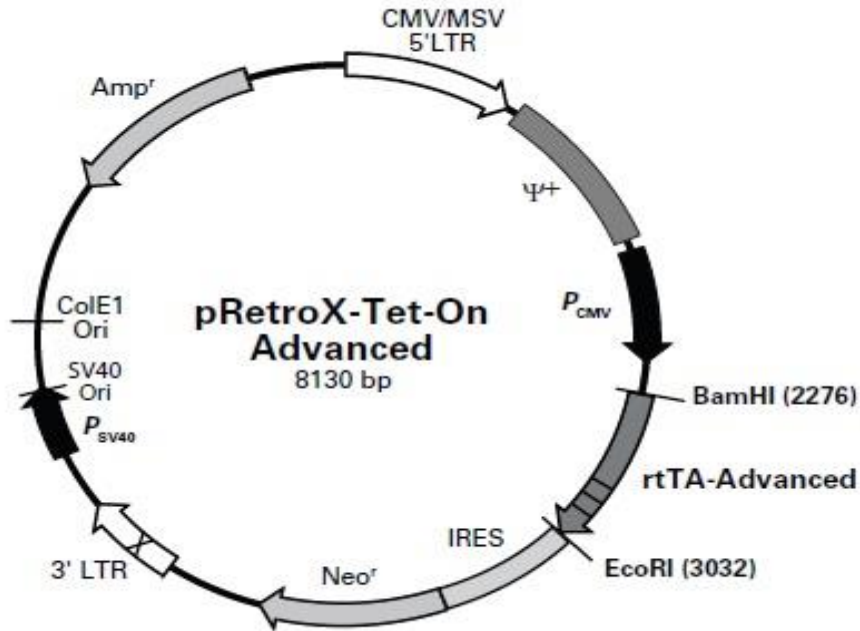
Klonlama vektörü olarak ‘pBluescript II SK (+)’ (PBSK) kullanıldı. 2961 bp uzunluğundaki vektör DNA klonlamada, invitro transkripsiyon gibi teknikler için kullanılmaktadır. lac Z operonu ve bakteriyel ampisilin direç geni içermektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. pBSK vektörünün genel yapısı

#### 4.1.1.2. pRetroX-Tet-On Advanced

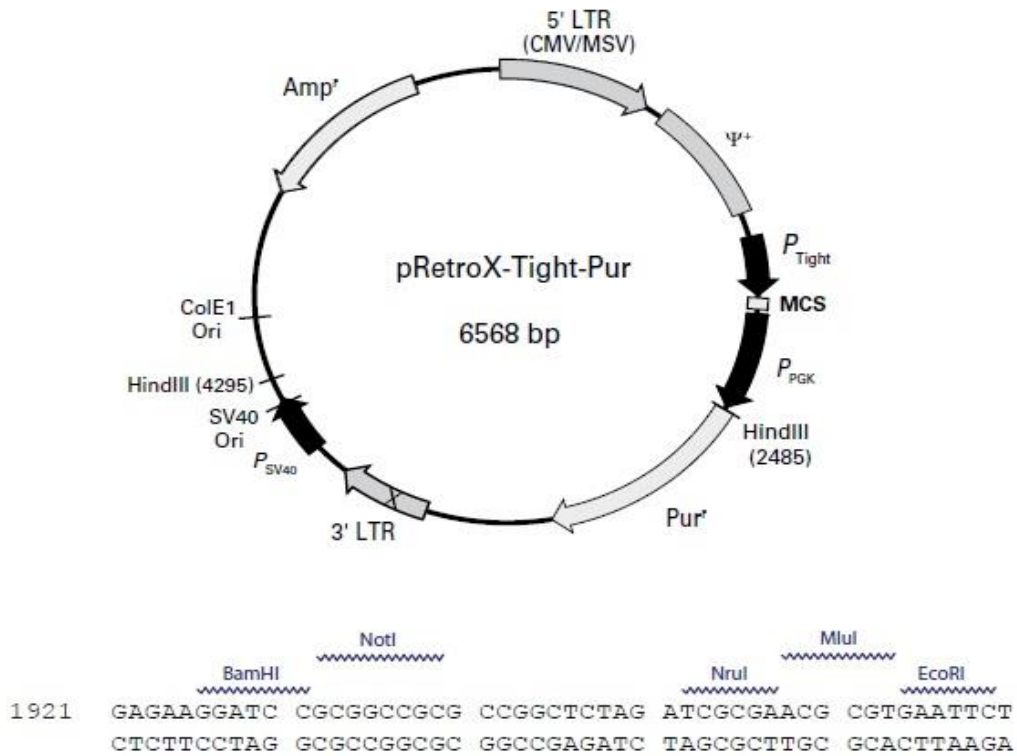
'pRetroX-Tet-On Advanced vector' (Clontech; Cat No: 632104), 8130 bç uzunluğunda olup tetrasiklin kontrolünde reverse tetrasiklin transaktivatör (rtTA) proteini ifade eden Q retroviral vektördür. rtTA proteini memeli hücrelerinde protein eksresyonu yapabilmesi için güçlü CMV promotoru tarafından aktive olur. pRetroX-Tet-On Advanced vektörü viral RNA oluşumu için gerekli 5' ve 3' LTR, paketleme sinyali ( $\Psi^+$ ) ve tRNA primer bağlanma bölgelerini içermektedir. Ayrıca memeli hücrelerinde yayılabilmesi için SV40T replikasyon bölgesiyle, bakteriyel ampisilin ve stabil hücre seçilimi için neomisin direnç genlerini bulundurmaktadır (Şekil 4.2.). Bu vektörde self-inaktivasyon mekanizması vardır. Bu mekanizma viral entegrasyon sistemindeki 5'LTR'de bir delesyonla sağlanmıştır. Bu mutasyon sonunda virüsün üretildiği hücrede tüm viral genomun yüksek ifadenmesini sağlayan 5'LTR CMV/MSV promotorları bulunur. Bu promotorlar hedef hücrede rtTA'nın sürekli olarak ifadenmesine izin verir.



Şekil 4.2. pRetroX-Tet-On vektörünün genel yapısı

#### 4.1.1.3. pRetroX-Tight-Pur

'pRetroX-Tight-Pur'(Clontech; Cat No: 632105) vektörü 6568 bp uzunluğunda olup, modifiye tetrasiklin (Tet) duyarlı bir promotörün kontrolü altında ilgili genin ifadenmesi için tasarlanmış indüklenebilen kendi inaktivasyonunu yapabilen retroviral ifade vektörüdür. Hibrit 5'LTR bölgesi cytomegalovirus (CMV) tip 1 enhancer ve fare sarkoma virüs (MSV) promotör bölgelerini içerir. Bu promotör bölgeleri Hek293 hücrelerinde viral genomunun yüksek düzeyde ifadenmesini organize eder. Vektörün kendini inaktive edebilme özelliği 3'LTR enhancer bölgesindeki (U3) delesyon ile sağlanmaktadır. pRetroX-Tight-Pur vektör viral RNA prosesi için gerekli 5' ve 3' LTR, paketleme sinyal ( $\Psi^+$ ) ve tRNA primer bağlanma bölgelerini, bakteriyel ampisilin direnç genini, stabil hücre seçilimi için neomisin direnç genlerini bulundurmaktadır. pRetroX-Tight-Pur vektör hem plazmid hem de retroviral ifade vektörü olarak kullanılabilir (Şekil 4.3.).

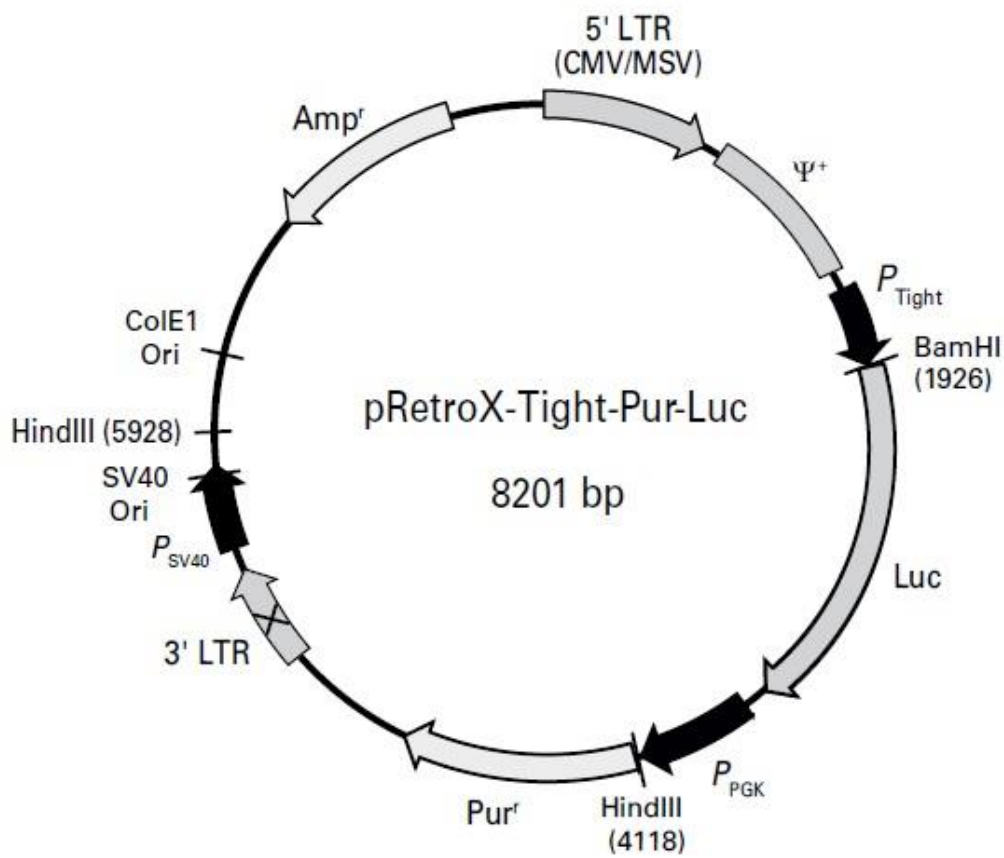


Şekil 4.3. pRetroX-Tight-Pur vektörünün genel yapısı



#### 4.1.1.4. pRetroX-Tight-Pur-Luc

Yapılan tetrasiklin indüklü hücre klonlarını kontrol etmek amacıyla ‘pRetroX-Tight-Pur-Luc’ (Clontech; Cat No: 632104-5) retroviral kontrol vektörü kullanıldı. 8201 bp uzunluğunda olup, Tet duyarlı modifiye promotörün kontrolü altında lusiferaz ifadesi yapmaktadır. Diğer retroviral vektörlerin genel özelliklerine sahiptir. Lusiferaz geni ile en yüksek rtTA ifadesinin tespitini sağlamaktadır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. pRetroX-Tight-Pur-Luc'un genel yapısı

#### **4.1.1.5. Retroviral paketleme sistemi vektörleri**

Retroviral partiküllerin oluşturulabilmesi için, pCMV-VSV-G (Addgene; plasmid 8454) ve PUMVC (Addgene; plasmid 8449) plazmitleri kullanıldı.

#### **4.1.2. Memeli hücre hatları**

T98G: İnsan glioma kanser hücresi, Johns' Hopkins Üniversitesi Patoloji Onkoloji bölümünden temin edildi.

Hek293-T: İnsan embriyonik böbrek hücreleri, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Moleküler Hücre Biyolojisi Birimi'nden temin edildi.

HTB-33: İnsan epidermoid karsinom'dan elde edilen epitel hücresi ME-180 (ATCC® HTB-33™) katalog numarasıyla ATCC'den temin edildi.

Hücreler % 10 fetal sığır serumu, % 1 penisilin/streptomisin, % 1 L-Glutamin içeren DMEM ( Dulbecco's Modified Eagles's Medium ) içinde, 37 °C sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda çoğaltıldı.

#### **4.1.3. Kullanılan enzimler**

Restriksiyon enzimleri, ligasyon enzimleri, DNA polimeraz enzimleri ve fosfataz enzimleri kullanılmıştır.

##### **4.1.3.1. Restriksiyon enzimleri**

- BamHI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™,ER0051)
- EcoRI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™, ER0275)

- EcoRV Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™, ER059)
- HindIII Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™, ER0505)
- NotI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™, ER0595)
- KpnI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™, ER0521)
- MfeI Restriksiyon Endonükleaz (Thermo Scientific™, ER0752)

#### **4.1.3.2. Ligasyon enzimleri**

- T4 DNA Ligase (New England BioLabs™, MO202S)
- T4 DNA Ligase (Thermo Scientific™, EL0011)

#### **4.1.3.3. DNA polimeraz enzimleri**

- Taq DNA polymerase (recombinant) (Thermo Scientific™, EP0406)
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific™, F530L)
- Pfu polymerase (recombinant) (Thermo Scientific™, EP0502)

#### **4.1.3.4. Fosfataz enzimleri**

- Calf İntestinal Alkaline Phosphatase (İnvitrogen, 18009-019)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific™, EF0511)
- Alkaline Phosphatase Calf İntestinal (New England BioLabs™, M0290S)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, EF0651)

#### 4.1.4. Kullanılan besiyerleri

##### 4.1.4.1. Luria bertani (LB) agar katı ve sıvı besiyerlerinin içeriği ve hazırlanışı

- Tripton (Tryptone Powder, Plasmatec, 5060179821641)
- Maya ekstraktı (Yeast extract, SRLCHEM, YI 012)
- NaCl (Merck, Germany, 1.06404.1000)
- BactoAgar (Biolab, BAA10500)
- Antibiyotik (Ampisina Flakon, Mustafa Nevzat İlaç, 8699541270106)

**Çizelge 4.1.** Luria bertani (LB) agar katı besiyerinin hazırlanışı

Besiyeri İçeriği	Kullanılan Miktar
Tripton	4 g
Maya ekstraktı	2 g
NaCl	4 g
BactoAgar	6 g
dH <sub>2</sub> O	400 ml

Karışım hazırlandıktan sonra 121 °C’de 15 dk otoklavlandı. 40-50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra 200 µl 250 mg/ml antibiyotik eklendi. Karıştırıldıktan sonra 100 mm petri kaplarına 20’şer ml paylaştırıldı ve polimerizasyona bırakıldı.

**Çizelge 4.2.** Luria bertani (LB) agar sıvı besiyerinin hazırlanışı

Besiyeri İçeriği	Kullanılan Miktar
Tripton	4 g
Maya ekstraktı	2 g
NaCl	4 g
dH <sub>2</sub> O	400 ml

Karışım hazırlandıktan sonra 121 °C’de 15 dk otoklavlandı.

#### 4.1.4.2. Hücre kültürü besiyeri

- DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco, USA, 12800)
- Fetal Bovin Serum (Hyclone, 1115-L)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco, 15070)
- L-Glutamin (Invitrogen™ Life Technologies, 21051024)

**Çizelge 4.3.** Hücre kültürü besiyerinin hazırlanışı

Besiyeri İçeriği	Kullanılan Miktar
DMEM	500 ml
Fetal Bovin Serum	50 ml
Penisilin/Streptomisin	5 ml
L-Glutamin	5 ml

#### 4.1.5. Kullanılan solüsyonlar

##### 4.1.5.1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

- Agaroz (Sigma-Aldrich, A6013)
- Tris (Sigma-Aldrich, T1513)
- Borik asit (Sigma-Aldrich, B7901)
- Asetik Asit (Sigma-Aldrich, 27225)
- EDTA (MERCK, 70156890)
- EtBr2 (APPLICHEM, 1239458)

**Çizelge 4.4.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar

<b>5X TBE</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>	<b>50X TAE</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
Tris	54 g	Tris	242 g
Borik asit	27,5 g	Asetik asit	57,1 ml
0,5M EDTA	20 ml	0,5M EDTA	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	980 ml	ddH <sub>2</sub> O	750 ml

**Çizelge 4.5.** Agaroz jelin hazırlanışı

<b>Agaroz Jel (% 1)</b>	<b>Agaroz Jel (% 1,5)</b>	
0,4 g	0,6 g	Agaroz
40 ml	40 ml	1X TBE veya 1X TAE
2 µl	2 µl	EtBr <sub>2</sub>

#### 4.1.5.2. Alkaline lizis solüsyonları ve içerikleri

- Tris (Sigma-Aldrich, T1513)
- EDTA (MERCK, 70156890)
- Glukoz (MERCK 108342)
- SDS (Sigma-Aldrich, 862010)
- NaOH (MERCK, 106482)
- Potasyum Asetat (MERCK, 104820)
- Asetik Asit (Sigma-Aldrich, 27225)

**Çizelge 4.6.** Alkalın lizis solüsyonların hazırlanışları

<b>Solüsyon I</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
1M TRIS pH 8.0	2,5 ml
0,5 M EDTA pH 8.0	2 ml
1M Glukoz	5 ml
ddH <sub>2</sub> O	90,5 ml
<b>Solüsyon II</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
% 10 SDS	2,5 ml
2M NaOH	2 ml
ddH <sub>2</sub> O	10 ml
<b>Solüsyon III</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
5 M Potasyum Asetat	60 ml
Asetik Asit	11,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	28,5 ml

#### 4.1.5.3. Western blot solüsyonları ve hazırlanışı

- Tris (Sigma-Aldrich, T1513)
- Acrylamide (MERCK, 800830)
- Bisacyrlamide (MERCK, 2610-OP)
- APS (Amresco, 0486-100G)
- SDS (Sigma-Aldrich, 862010)
- TEMED (AppliChem, A1148,0100)
- Glisin (MERCK, 100590)
- Metanol (Sigma-Aldrich, 24229)
- Gliserol (Sigma-Aldrich, G7893)
- $\beta$ -Mercaptoethanol (MERCK, 44203)

**Çizelge 4.7.** Western blot solüsyonlarının hazırlanışı

<b>Running Jel</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
1 M Tris pH:8.8	7,5 ml
% 40 Acrylamide-bisacrylamide	8,4 ml
% 10 SDS	0,3 ml
% 10 APS	250
TEMED	20
dH <sub>2</sub> O	13,3 ml
<b>Stacking Jel</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
1 M Tris pH:6.8	1,9 ml
% 40 Acrylamide- bisacrylamide	1,5 ml
% 10 SDS	150
% 10 APS	100
TEMED	7
dH <sub>2</sub> O	11 ml
<b>Running Buffer</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
Tris	6g
Glisin	15g
SDS	1g
dH <sub>2</sub> O	1000ml
<b>Transfer Buffer</b>	<b>Kullanılan Miktar</b>
Tris	3g
Glisin	14,4g
SDS	1g
Metanol	200ml
dH <sub>2</sub> O	800ml

#### 4.1.6. Kullanılan kitler

- Plazmit maxi prep kiti (GeneJET Plasmid Maxiprep Kit, Thermo Scientific™, K0492)
- Jelden DNA ekstraksiyon kiti (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific™, K0692)
- DNA purifikasyon kiti (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Scientific™, K0701)
- RNA ekstraksiyon Kiti (TriZOL Reagent, İnvitrogen™, 15596-026)
- cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific™, K1622)
- MTT testi (MTT reagent, Sigma-Aldrich, M-5655)
- Lusiferaz testi (Lusiferase Reporter Assay Kit, Biovision, K801-200)
- LDH kiti (LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit, Biovision, K311-400)
- Apoptozis kiti (SensoLyte homogenous AFC Caspase-3/7 Assay Kit, Anaspec, 71114)



- BCA protein miktar ölçüm kiti (BCA Protein Assay Kit, PIERCE, 23227)
- Transfeksiyon kiti (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech, 631312)

#### **4.1.7. Kullanılan antikorlar**

- Akt antikor (Cell Signaling, 9272)
- Phospho Akt antikor (Cell Signaling, )
- P63 antikor (Thermo Scientific™, MA1-21871)
- CIAP1 antikor (Genetex, Inc., GTX22399)
- CIAP2 antikor (Genetex, Inc., GTX22540)
- XIAP antikor (Genetex, Inc., GTX22541)
- IL29 antikor (Thermo Scientific™, PA5-11710)
- IL28 antikor (Thermo Scientific™, PA5-11708)
- $\beta$ -aktin antikor (Sigma-Aldrich, A 2066)
- P21 antikor (Cell Signaling)

#### **4.1.8. Moleküler biyoloji amacıyla kullanılan bakteriyel hücreler**

- *Eschericia coli* DH5 $\alpha$ : Plazmitlerin çoğaltılması amacıyla kullanıldı.
- *Eschericia coli* Stabl2: Rekombinasyon faktörleri olmayan bu bakteri vektörlerde homolog rekombinasyonu önlemek amacıyla kullanıldı.

#### **4.1.9. Kullanılan antibiyotikler**

- Ampisilin (Ampisina Flakon, Mustafa Nevzat İlaç, 8699541270106)
- G418 (Sigma-Aldrich, A 1720)
- Puromisin (Sigma-Aldrich, P 7130)
- Doksasiklin (Sigma-Aldrich, 9891)

#### 4.1.10. Kullanılan primerler

**Çizelge 4.8.** Kullanılan primerler

Primer	Sekans (5' → 3')	Ürün büyüklüğü	Kullanım amacı
4-5-6 F KPN1 R	TACAGCTAACATGTTGTACCT TGTCGTGAATTCAGTGCCAAC	631bç	Parsiyel klonlama
KPN1 F MFE1 R	GTGTGCTGGTACCTTATGAG CTGTTGCTGTTGCCTGTA	467bç	Parsiyel klonlama
MFE1 F 2-5 R	CAGTACCTTCCTCAGCACAC CCTTCCAGATCGCATGTCG	427bç	Parsiyel klonlama
4-5-6 F 2-5 R	TACAGCTAACATGTTGTACCT CCTTCCAGATCGCATGTCG	1427bç	Parsiyel klonlama
Aktin F Aktin R	AGAAAATCTGGCACCACACC AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	594bç	İfade analizi
P63all F P63all R1	CTCCACCTTCGATGCTCTCT AGATCAAGGTGATGACCCAC	196bç	İfade analizi
BAD F BAD R	TCCAGATCCCAGAGTTTGAG TGTGGCGACTCCGGATCTCCACAG	216bç	İfade analizi
BAX F BAX R	TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG TGCAGCTCCATGTTACTGTC	155bç	İfade analizi
BID F BID R	TACCCTAGAGACATGGAGAAG TGGCTAAGCTCCTCACGTAG	160bç	İfade analizi
P21 F P21 R	AAGACCATGTGGACCTGTCA GGCTTCCTCTTGAGAAGAT	169bç	İfade analizi
AKT1 F AKT1 R	ATGAGCGACGTGGCTATTGTGAAT GAGGCCGTCAGCCACAGTCTGGATG	330bç	İfade analizi
TGFA F TGFA R	ACACTCAGTTCTGCTTCCATG ACATGTGATGATAAGGACAGC	203bç	İfade analizi
IFI6 F IFI6 R	AGCTGGTCTGCGATCCTGAATG ATCCTCCTCACTATCGAGATAC	156bç	İfade analizi
TGFB3 F TGFB3 R	TCAGCCTCTCTGTCCACTTG TTGGCATAGTATTCCGACTCGG	250bç	İfade analizi
IGF2 F IGF2 R	TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAG TCCGATTGCTGGCCATCTCTG	338bç	İfade analizi
IGFBP2 F IGFBP2 R	AGGTTGCAGACAATGGCGATG TCCAGGCCAAGGTGATGCTTG	205bç	İfade analizi
HİF F HİF R	ATATCAAGCTTGCGGGCACCG ATATCGAATTCGACAACAACA	556bç	İfade analizi
XIAP F XIAP R	TCAGCATCAACACTGGCACGAG TCTCTTGGGGTTAGGTGAGCATAG	422bç	İfade analizi
CIAP1 F CIAP1 R	GCACATTCAATTATCTCCCACCTTG CATCATCCTTTGGTTCCCAGTTAC	301bç	İfade analizi
CIAP2 F CIAP2 R	CCTCTCAGCCTACTTTTCTTCTTC CATAGCATTATCCTTCGGTTCCC	344bç	İfade analizi
BCLX1 F BCLX1 R	ACTGAATCGGAGATGGAGACCC TGAAGAGTGAGCCCAGCAGAAC	382bç	İfade analizi
P13K F P13K R	GTCAGTGATTGAAGAGCATG CAAGCAATACATCTGGGCTAC	292bç	İfade analizi
CYCD1 F CYCD1 R	ATCTACACCGACAACCTCCATC GAACTTACATCTGTGGCAC	210bç	İfade analizi
MK S1 MK R1	AGGATGCAGCACCGAGGCTTC GTCTCCTGGCACTGAGCATTG	359bç	İfade analizi
MX1 F MX1 R	TGCATCGACCTCATTGACTC CCGAAATCTCAATCTCGTAG	250bç	İfade analizi

**Çizelge 4.8.** Kullanılan primerler (devam)

MX2 F MX2 R	AATGAATTCCTTCCAGCAACA ACTGGCTGTACAGGTTGTTC	203bç	İfade analizi
OASL F OASL R	CAACTAAGCTGAAGAGCCTC AGGTCCATCACAGTGGTGAAG	190bç	İfade analizi
PAF1 F PAF1 R	TGAGAGGTCTGGAGTGGTCTG TCAGGATTGATGAGATCGATG	198bç	İfade analizi
P53 F P53 R	CTTGCCACAGGTCTCCCAA AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	156bç	İfade analizi

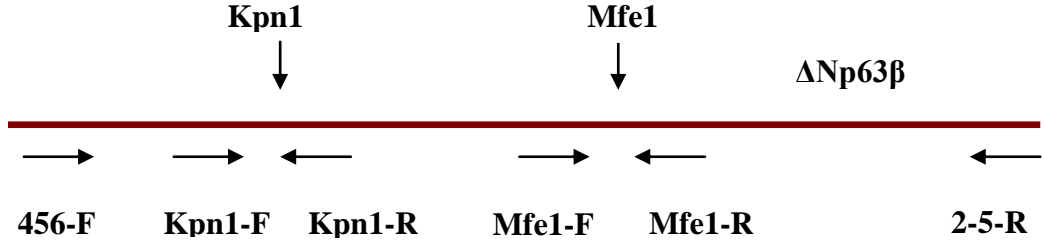
## 4.2. Yöntemler

### 4.2.1. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi için 5 µl 10x PZR reaksiyon buffer, 1.5 mM (1 µl) MgCl<sub>2</sub>, 25 µM (1µl) dNTP, 0,5 µM (1µl) primer, 2.5 ünite (1µl) Taq DNA polimeraz ve toplam volüm 50 µl olacak şekilde steril ddH<sub>2</sub>O eklendi. 0.2 ml steril PZR tüp içerisinde PZR cihazı (Biometra Personal Thermal Cyclers, Almanya) kullanılarak, kalıp DNA ilk olarak 94 °C de 2 dakika ayrıştırılıp, daha sonra 30-40 döngü, her biri 94 °C de 30sn, 58-60 °C de 45 sn ve 72 °C 45sn olacak şekilde tamamlandı. Ayrıca uzama fazının tamamlanması için reaksiyon karışımı ek olarak 72 °C'de 10 dakika devam ettirildi. PZR DNA ürünleri % 1,5 agaroz jelde (TBE veya TAE) EtBr<sub>2</sub> varlığında 120V yürütülerek UV transillüminatör (Vilber Lourmat TFX-20 M, Fransa) ile görüntülendi.

### 4.2.2. *ΔNp63β* transkript ürününün parsiyel olarak PZR yöntemiyle çoğaltılması

Yapılan çalışmalar sonunda, epitel kökenli hücre olan Hek293-T'den p63 transkript ürününü elde etmek için yapılan PZR'lerden beklenen ürünler elde edilemedi. Bunun üzerine p63 gen ifadesinin fazla olduğu bilinen epidermoid karsinoma hücresi olan HTB-33 hücresinden PZR yapıldı ancak istenilen ürün elde edilemediği için daha küçük ürün elde edebilmek üzere yeni primerler tasarlandı, ürünün parsiyel çoğaltılarak elde edilmesi amaçlandı. Bunun için önce HTB-33 hücresi cDNA'sından; 4-5-6 F ve KPN1 R primerleri ile bir PZR, KPN1 F ve MFE1 R primerleri ile bir PZR, MFE1 F ve 2-5 R primerleri bir PZR olmak üzere üç ayrı PZR yapıldı. Elde edilen ilk iki ürünle 4-5-6 F ve MFE1 R primerleri kullanılarak PZR yapıldı sonunda bu iki ürünün birleştirilmiş PZR ürünleri elde edildi. Son aşamada bu birleştirilmiş PZR ürünü ve üçüncü PZR ürünü ile 4-5-6 F ve 2-5 R primerleri kullanılarak istenilen ürün elde edildi. Elde edilen ürün jelden DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak izole edildi. Elde edilen transkript dizisi EK 1' de verilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 5.1. ve Şekil 5.2.).



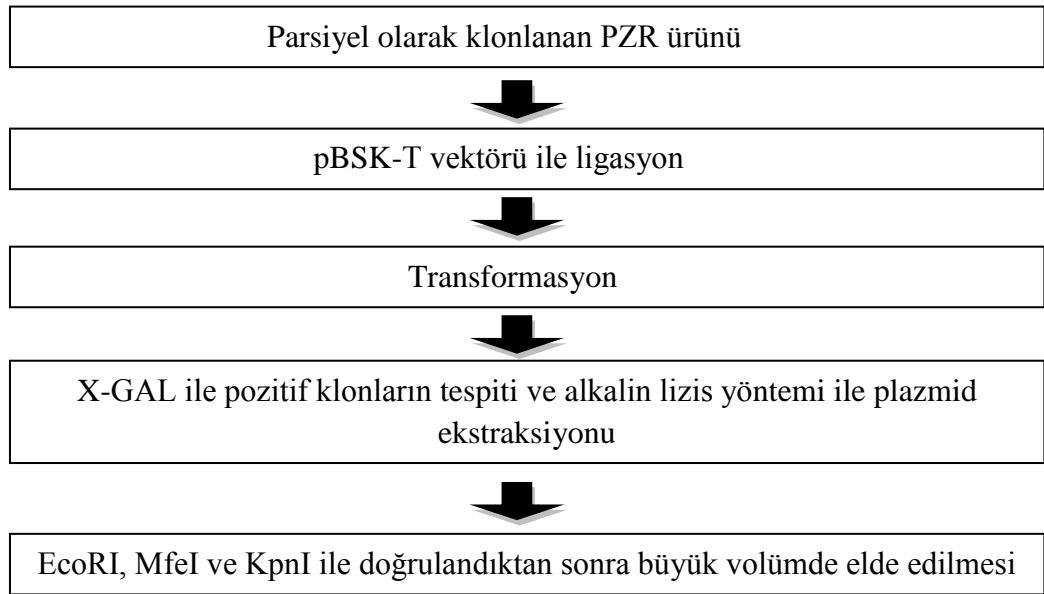
**Şekil 4.5.**  $\Delta Np63\beta$  izoformunun kesim bölgelerinin ve primerlerin bağlandığı yerlerin şematik gösterimi

#### 4.2.3. $\Delta Np63\beta$ PZR ürününün klonlanması

$\Delta Np63\beta$  ifade eden stabil T98G hücrelerinin oluşturulması için  $\Delta Np63\beta$  PZR ürünü vektör sistemleri içerisine klonlandı.

##### 4.2.3.1. $\Delta Np63\beta$ PZR ürününün pBSK içerisine klonlanması

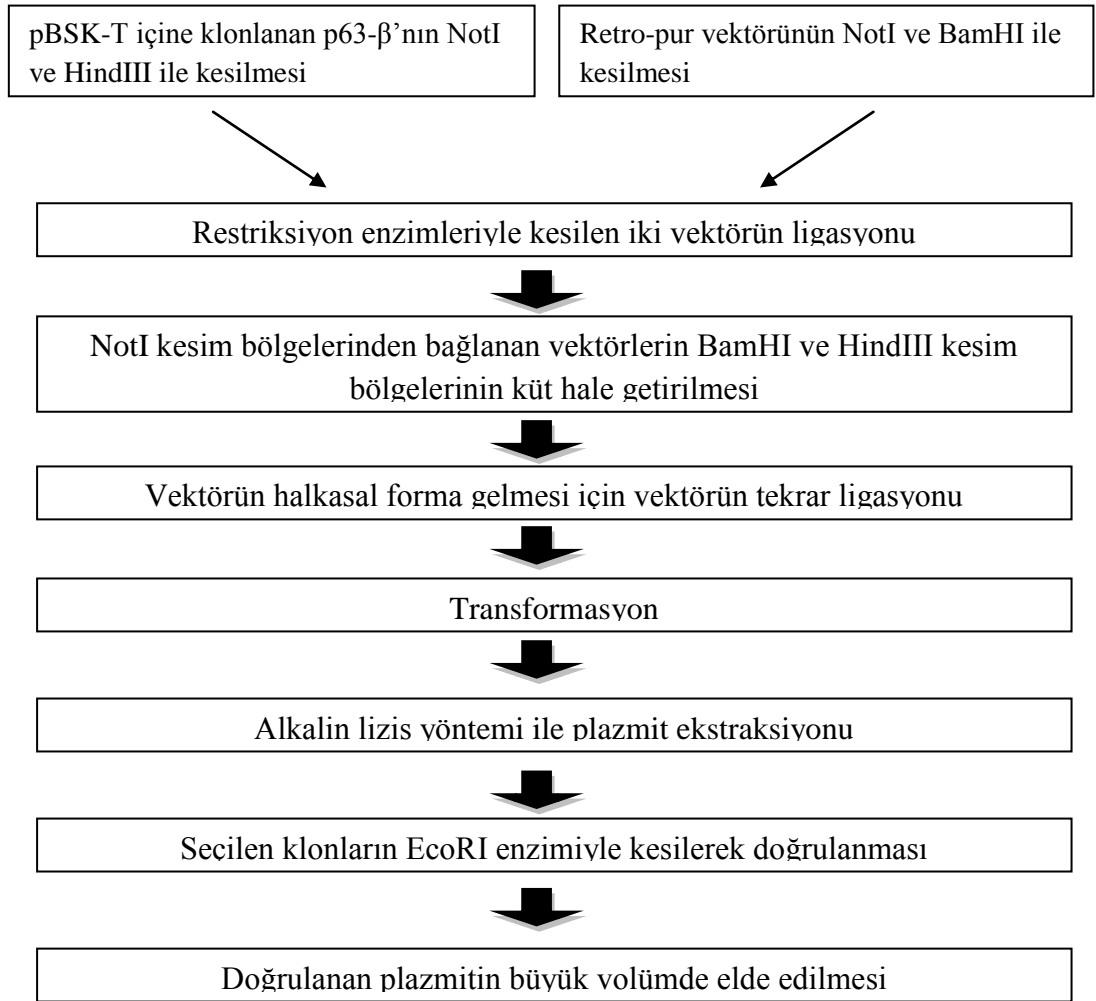
$\Delta Np63\beta$  ifade eden stabil T98G hücrelerinin oluşturulması için  $\Delta Np63\beta$  PZR ürünü önce klonlama vektörü olan pBSK içerisine klonlandı (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.**  $\Delta Np63\beta$  PZR ürününün pBSK İçerisine Klonlanması

#### 4.2.3.2. $\Delta Np63\beta$ 'nin pRetroX-Tight-Pur vektörü içerisine konlanması

$\Delta Np63\beta$  ifade eden stabil T98G hücrelerinin oluşturulması için  $\Delta Np63\beta$  PZR ürünün pBSK içerisine klonlanmasından sonra vektör içerisinden restriksiyon endonükleaz enzimleri yardımıyla alınan  $\Delta Np63\beta$  ürünün pRetroX-Tight-Pur vektörü içerisine klonlandı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7.  $\Delta Np63\beta$ 'nin pRetroX-Tight-Pur vektörü içerisine konlanması

#### 4.2.4. pBSK-T vektörün hazırlanması

pBSK küt uç oluşturan EcoRV restriksiyon enzimi ile lineer hale getirildi.

85µl EcoRV ile kesilmiş pBSK
10µl 10X taq polimeraz buffer
2µl 10mM MgCl <sub>2</sub>
2µl dTTP
1µl taq polimeraz enzim
+
-----
100µl

72 °C' de 2 saat bekletildi.

Jeden DNA ekstraksiyon kiti ile temizlendikten sonra 35µl ddH<sub>2</sub>O eklendi.

#### 4.2.5. Farklı restriksiyon enzimi ile kesilen ürünlerin uçlarının küt hale getirilmesi

1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	1µl
2.5 µM dNTP	1µl
2.5 ünite phusion DNA polimeraz	1µl
Restriksiyon enzimi ile kesilen plazmit	47µl
	+
	-----
	50 µl

72 °C 10 dakika bekletildi.

Jeden DNA ekstraksiyon kiti ile temizlendikten sonra 35µl ddH<sub>2</sub>O eklendi.

#### 4.2.6. Ligasyon

##### 4.2.6.1. pBSK içerisine PZR ürünün klonlanması

15µl Δp63β PZR Ürünü (60ng/µl)

2µl pBSK-T (50ng/µl)

2µl 10X T4 ligase buffer

1µl T4 ligase

+

---

20µl

22 °C’de 10 dakika bekletildi ve transforme edildi.

##### 4.2.6.2. pRetroX-Tight-Pur içerisine klonlanması

8.5µl Δp63β NotI-HindIII

8.5µl pRetro-pur NotI-BamHI

2µl 10X T4 ligase buffer

1µl T4 ligase

+

---

20µl

22 °C’de 10 dakika bekletildi. Jeden DNA ekstraksiyon kiti ile temizlendi.

NotI kesim bölgelerinden ligasyon olan iki farklı uca sahip bu iki ürünün sirküler hale gelebilmesi için uçları küt hale getirildi ve tekrar ligasyon yapıldı.

17µl pRetro-pur-Δp63β (linear)

2 µl 10X T4 ligase buffer

1µl T4 ligase

+

---

20µl

22 °C’de 10 dakika bekletildi ve transforme edildi.



#### 4.2.7. Transformasyon

Ligasyon yapılan pBSK- $\Delta$ p63 $\beta$ 'nin kompetant *E. coli* suşu olan DH5 $\alpha$ 'ya pRetro-pur- $\Delta$ p63 $\beta$ 'nin kompetant *E. coli* suşu olan Stabl2 bakteri hücresine transformasyonu için, kompetant hücelere 2 ng plazmit DNA ilave edilip pipetasyon yapıldı. 20 dk buzda, 3 dk 37 °C'de bekletildikten sonra tekrar buzda 2 dk inkübe edildi. Oda ısısındaki LB tamponundan 1000 $\mu$ l ilave edilip ve pipetasyon yapıldı. 37°C'de 1 saat 210 rpm'de DH5 $\alpha$ , 30°C' de 1,5 saat 180 rpm'de stabl2 bakteri hücresinde inkübe edildikten sonra antibiyotikli LB agarlı petrilere ekildi. 37°C'lik etüvde DH5 $\alpha$ , 30°C'lik etüvde stabl2 bakteri hücresi gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

#### 4.2.8. Alkalın lizis yöntemi ile plazmit DNA izolasyonu (Mini Prep)

Bakteri hücrelerinde hem plazmit hem de genomik DNA bulunmaktadır. Alkalın lizis yöntemi ile plazmit DNA haricinde genomik DNA ile birlikte tüm hücre içeriği uzaklaştırılır. Bakteri hücreleri 10 dk 10000xg'de santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine 100  $\mu$ l Alkalın Lizis Solüsyon I eklenip pipetasyon yapıldı. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Alkalın Lizis Solüsyon II 200  $\mu$ l eklendi ve yavaşça 3-4 kere alt- üst edilip 5 dk buzda bekletildi. 5 dk dolduktan sonra 150  $\mu$ l Alkalın Lizis Solüsyon III eklendi ve 5-10 defa alt üst edildikten sonra 10 dk buzda bekletildi. Buzdan alındıktan sonra 10 dk 10000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni tüpe aktarıldı ve 3 $\mu$ l RNase eklendi. Karışım vortekslenip ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine fenol kloroform eklendi. Çalkalandıktan sonra 1 dk 10000xg'de santrifüjlendi. Üstte kalan sıvı kısım yeni tüpe aktarıldı ve üzerine bir volüm saf etanol eklendi ve çalkalandıktan sonra +4°C'de 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve üzerine % 75'lik etanol eklenip vortekslenildikten sonra +4 °C'de 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve DNA'lar 30 dk kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra peletin üzerine 50  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O eklendi.

#### **4.2.9. rtTA ifade eden stabil T98G hücrelerin hazırlanması**

rtTA ifade eden pRetroX-Tet-On vektörü retroviral paketleme plazmitleri ile birlikte virüsün en iyi partikül oluşturduğu hücrelerden biri olan Hek293-T hücre hattı içerisine kalsiyum-fosfat transfeksiyon kiti kullanılarak transfekte edildi. 48 saat sonra hücre medyumları toplanıp kontaminantlardan arındırmak amacı ile filtre edildikten sonra hedef hücre olarak seçilen T98G hücrelerine verildi. Enfeksiyonu izleyen 12 saat sonunda hücre klonlarını elde etmek amacıyla hücreler 10 ml'lik hücre kültür plaklarına pasajlandı. Hücre pasajından 24 saat sonra hücre DMEM'i plazmitte bulunan direnç genine uygun olan G418 (neomisin) eklenen DMEM ile değiştirildi. 3-4 günde bir arayla DMEM'ler değiştirilerek 20-30 gün içerisinde farklı hücre klonlarının oluşması beklendi. Oluşturulan stabil hücre sistemi, tetrasiklin varlığında rtTA ifade ederek rtTA bağımlı promotor bulunduran vektör içerisindeki cDNA'nın ifade olmasını sağlamaktadır. Bu nedenle üreyen hücrelerden en iyi rtTA ifade eden hücre klonunu belirleyebilmek için her bir hücreden 2'şer adet  $4 \times 10^4$  hücre sayılarak pasaj yapıldı. Bu hücrelere retroviral kontrol vektörü olan pRetroX-Tight-Pur-luc plazmiti transfekte edildi. İki gün boyunca 24 saatte bir her bir hücreden ikişer tane yapılan pasajların DMEM'leri bir tanesi tetrasiklinli DMEM ile diğeri ise sadece DMEM ile değiştirildi. 48 saat sonunda plazmit içerisinde bulunan tetrasikline bağlı olarak uyarılan *Lusiferase* genin ifade düzeyleri ölçüldü ve en yüksek değer veren klon seçildi (Şekil 5.7.).

#### **4.2.10. rtTA ifade eden T98G hücrelerine pretrox-pur- $\Delta$ p63 $\beta$ plazmitinin transfeksiyonu ile stabil hücre elde edilmesi**

Tetrasiklin varlığında  $\Delta$ p63 $\beta$  ifade eden pRetroX-pur- $\Delta$ p63 $\beta$  vektörü retroviral paketleme plazmitleri ile birlikte virüsün en iyi partikül oluşturduğu hücrelerden biri olan Hek293-T hücre hattı içerisine kalsiyum-fosfat transfeksiyon kiti kullanılarak transfekte edildi. 48 saat sonra hücre medyumları toplanıp kontaminantlardan arındırmak amacı ile filtre edildikten sonra daha önce elde edilen rtTA ifade eden stabil T98G hücrelerine verildi. Enfeksiyonu izleyen 12 saat sonunda hücre klonlarını elde etmek amacıyla hücreler 10 ml'lik hücre kültür plaklarına pasajlandı. Hücre pasajından 24 saat sonra hücre DMEM'i plazmitte bulunan direnç genine uygun olan puromisin eklenen DMEM ile değiştirildi. 3-4 günde bir arayla DMEM'ler değiştirilerek 20-30 gün içerisinde farklı hücre klonlarının oluşması

beklendi. Doksasiklin varlığında en iyi  $\Delta p63\beta$  ifade eden klonların seçimi için hücreler, iki set olarak 12'lik hücre plakalarına  $4 \times 10^4$  sayıda pasajlandı. Kontrol olarak 1 kuyucuğa sadece rtTA ifade eden T98G hücresi pasajlandı. İki gün boyunca her 24 saatte bir hücre DMEM'leri değiştirildi. Birinci setin DMEM'i 1ml'ye 1 $\mu$ l olacak şekilde 2 $\mu$ g/ $\mu$ l doksasiklin ile ikinci set doksasiklin eklenmeden değiştirildi. 36. saat sonunda hücrelerden önce RNA ardından cDNA ve PZR yapıldı ve hücrelerin  $\Delta p63\beta$  ifade analizlerine bakıldı. En iyi  $\Delta p63\beta$  ifade eden stabil hücre seçildi (Şekil 5.8.).

#### **4.2.11. Hücre transfeksiyonu**

Hücre sayımı yapıldıktan sonra 24 saat sonunda transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyon için kalsiyum fosfat yöntemi olan 'CalPhos Memeli Transfeksiyon Kiti', üretici firmanın önerdiği şekilde uygulandı.

#### **4.2.12. MTT deneyi**

Deneylerde, canlı hücre sayısının belirlenmesinde spektrofotometrik bir yöntem olan MTT yöntemi kullanıldı. MTT (dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid) canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enziminin formazan kristallerini oluşturması ve oluşan bu kristallerin miktarının ölçülmesine dayalı bir testtir. Hücreler  $1 \times 10^4$  sayıda 96'lık hücre plakalarına pasajlandıktan 24 saat sonra her hücre kuyucuğuna 0.5 mg/ml MTT çözeltisi DMEM ile birlikte eklendi. 2-3 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra renkli formazan kristallerinin çözülmesi ve renk değişikliğinin görülmesi için 100 $\mu$ l lizis solüsyonu ile (izopropilalkol içerisinde %10 Triton X-100 ve 0.1N HCl hazırlandı) hücreler lize edildi. Oluşan renk değişikliği 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü (Şekil 5.9.).

#### **4.2.13. LDH testi**

Hasarlı hücrelerin plazma membranından salınan laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümüne dayalı sitotoksitite ve hücre ölümünü belirleyen bir test olan 'LDH sitotoksitite

ölçüm kiti' kullanıldı. Hücreler  $4 \times 10^4$  sayıda 12'lik hücre plaklarına pasajlandıktan sonra her 24 saatte bir, üç gün boyunca hücelere doksisisiklin eklendi. Üçüncü günün sonunda hücre süpernatantından 100  $\mu$ l 96'lık hücre plakalarına konuldu. Katalizör ve boya karışımı (100 ölçüm için; 11.25 ml boya solüsyonunun içine 250  $\mu$ l katalizör eklendi) süpernatant üzerine eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 490-500nm dalga boyunda ölçüldü (Şekil 5.10.).

#### **4.2.14. Apoptozis testi**

Deneylede apoptozisde önemli rol oynayan kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivitesinin tesbitine dayalı olan 'Kaspaz-3/7 ölçüm kiti' kullanıldı. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 ortak substrat özgünlüğü ve yapıyı paylaşmaktadırlar fakat N terminal bölgelerinin dizilimi tamamen farklılık göstermektedir. Her ikisinde de Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) amino asit dizisi için substrat seçiciliği bulunmaktadır. Kullanılan kitte de bu aminoasit dizisine özgü fluorimetrik indikatör kullanılmıştır. Hücreler  $4 \times 10^4$  sayıda 12'lik hücre plaklarına pasajlandıktan sonra her 24 saatte bir, üç gün boyunca hücelere tetrasiklin eklendi. Üçüncü günün sonunda hücreler 300 lizis solüsyonunda çözüldükten sonra mikro santrifüj tüplerine toplandı. Hücre süspansiyonu 30 dakika 4 °C çalkalandı. 2.500xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant 150 96'lık hücre plaklarına kondu üzerlerine 50 kaspaz-3/7 substrat solüsyonundan (100 örnek için; 50 kaspaz-3/7substrat, 200 1M DTT, 4.75ml ölçüm solüsyonu) eklendi ve pipet yardımıyla karıştırıldı. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Ex/Em=380nm/500nm'de floresans yoğunluğu ölçüldü (Şekil 5.11.).

#### **4.2.15. Western blotting**

Protein düzeyinde ifade analizi için western blot yapıldı. Hücreler  $4 \times 10^4$  sayıda 10 ml'lik hücre kültürü plakalarına pasajlandıktan sonra her 24 saatte bir, üç gün boyunca hücelere tetrasiklin eklendi. Üçüncü günün sonunda proteinler protein lizis solüsyonu (50 mM pH:8 tris, 5 mM EDTA, 150mM NaCl, % 0.5 NP40) ile hücrelerden ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen protein miktarları BCA protein ölçüm yöntemiyle ölçülerek eşitlendi. Proteinler  $\beta$  merkaptotanol ve SDS içeren tamponla (0.25 M pH:6.8 tris, % 40 gliserol, % 8 SDS, %

10  $\beta$  merkaptoetanol) 1:1 oranında karıştırılıp 95 °C'de 4 dk. bekletilerek denatüre edildi. % 1 SDS içeren % 10'luk poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra nitroseliloz membrana elektro-transfer yöntemiyle transfer edildi. Proteinlerin transferini takiben membrana, özgül olmayan bağlanmaları engellemek için % 0.1 tween 20 içeren PBS içerisinde % 5 yağsız süt tozu ile 1.5 saat çalkalayıcıda bloklama işlemi yapıldı. Membran, ifade düzeyi araştırılmak istenen antikor eklenerek 16 saat bekletildi. 16 saat sonunda membran HRP (horseradish peroxidase) ile konjuge edilmiş anti antikor ile 1.5 saat çalkalayıcıda bekletildikten sonra protein bantları HRP substratı kullanılarak röntgen filmi ile görüntülendi (Şekil 5.37-45.).

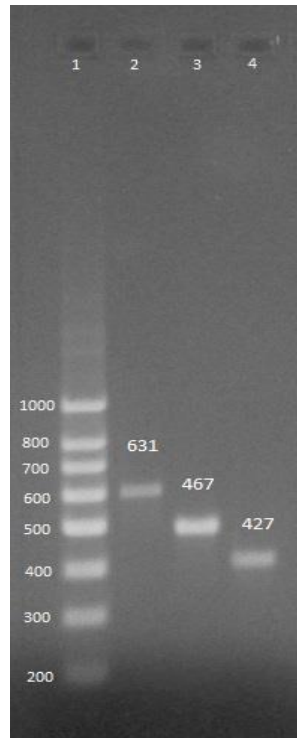
#### **4.2.16. İstatiksel analiz**

Gen ifadelerinin rölatif analizleri için National Institute of Health tarafından sunulan ImageJ 1.45s adlı program kullanıldı. Sayısal veriye dönüştürülen gen ifadelerinin istatiksel analizi için Student's t test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0.05 kullanıldı. Gen ifadelerinin p değerlerinin 0.05'ten küçük olması durumunda anlamlı olduğu, p değerlerinin 0.05'ten büyük olması durumunda ise anlamlı olmadığı belirlendi.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. $\Delta Np63\beta$ Transkript Ürününün Parsiyel Olarak PZR Yöntemiyle Çoğaltılması

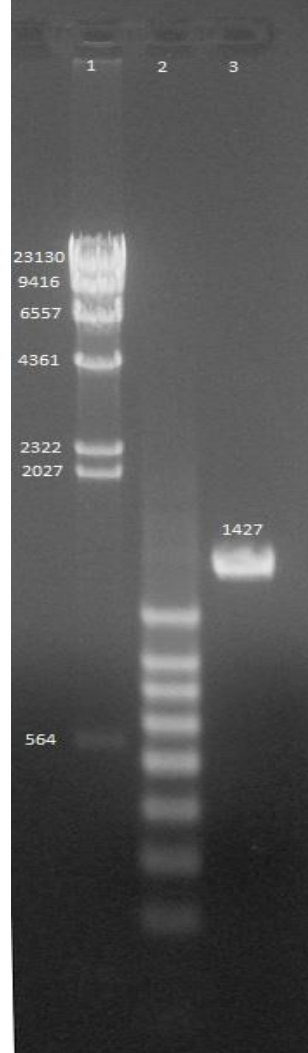
$\Delta Np63\beta$  transkript ürününün parsiyel olarak çoğaltmak üzere HTB-33 hücresinden elde edilen cDNA ile 4-5-6 F ve KPN1 R primerleri, KPN F ve MFE1 R primerleri ve MFE1 F ve 2-5 R primerleri kullanılarak yapılan PZR ürünleri % 1.5'luk agoroz jelde 120V'da yürütüldü ve görüntüledi (Şekil 5.1).



**Şekil 5.1.**  $\Delta Np63\beta$  transkript ürününün parsiyel olarak çoğaltılan PZR ürünlerinin görüntülenmesi

1: DNA merdiveni (1000bç-200bç), 2: 4-5-6 F ve KPN1 R primerleri ile yapılan PZR ürünü, 3: KPN F ve MFE1 R primerleri ile yapılan PZR ürünü, 4: MFE1 F ve 2-5 R primerleri ile yapılan PZR ürünü

HTB-33 hücresinden elde edilen cDNA ile 4-5-6 F ve KPN1 R primerleri, KPN F ve MFE1 R primerleri ve MFE1 F ve 2-5 R primerleri kullanılarak yapılan PZR ürünleri ve 4-5-6 F ve 2-5 R primerleri ile yapılan PZR sonucunda istenilen ürünün tamamı % 1.5'luk agaroz jelde 120V'da yürütüldü (Şekil 5.2).



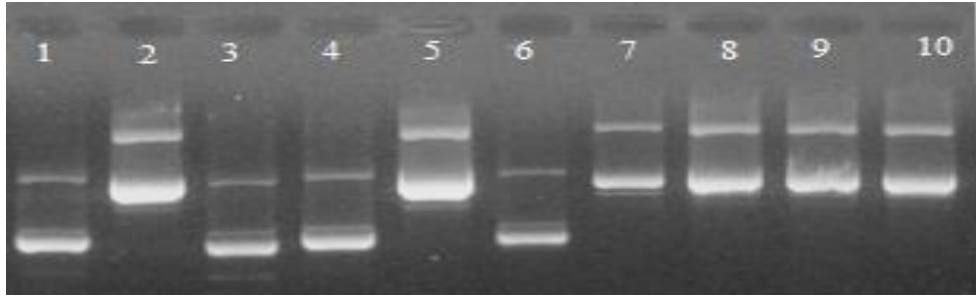
**Şekil 5.2.**  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nın PZR ürününün görüntülenmesi

1:  $\lambda$  DNA/HindIII 2: DNA merdiveni (1000bç-200bç), 3: 4-5-6 F ve 2-5 R primerleri ile yapılan PZR ürünü

## 5.2. $\Delta Np63\beta$ PZR Ürününün Klonlanması

### 5.2.1. pBSK-T içerisine klonlanması ve restriksiyon enzimiyle doğrulanması

Elde edilen  $\Delta Np63\beta$  PZR ürünü klonlama vektörü pBSK-T içerisine klonlandı, yapılan plazmid ekstraksiyonları %1'lik agoroz jelde 120V'da yürütüldü ve içerisinde  $\Delta Np63\beta$  bulunduran pBSK plazmitler belirlendi (Şekil 5.3).

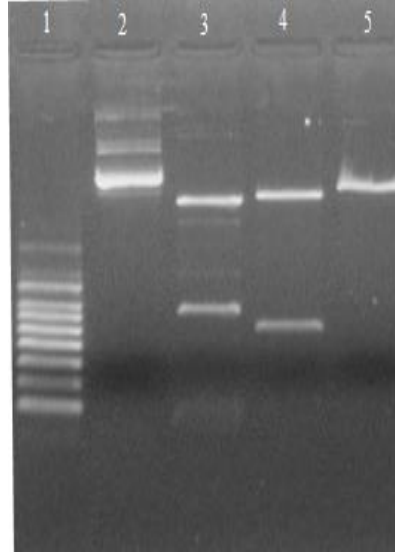


Şekil 5.3.  $\Delta Np63\beta$ 'nın pBSK vektörü içerisine klonlanması

1: pBSK, 2: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 1, 3: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 2, 4: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 3, 5: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 4, 6: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 5, 7: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 6, 8: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 7, 9: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 8, 10: pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 9

Plazmit ekstraksiyonundan sonra elde edilen pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 1 doğrulanmak üzere EcoRI, KpnI ve MfeI restriksiyon enzimleriyle kesildi. % 1'lik agoroz jelde 120V'da yürütüldü ve görüntüledi. İstenilen boylarda bantlar görüldü ve büyük volümde elde edilmek üzere pBSK-  $\Delta Np63\beta$  klon 1 çoğaltıldı (Şekil 5.4.).



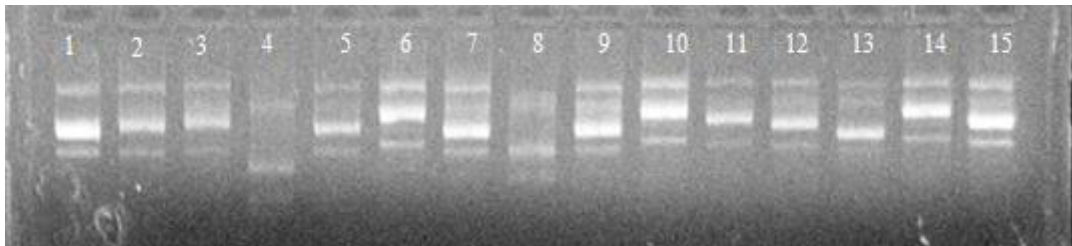


**Şekil 5.4.** pBSK-  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 1'in restriksiyon enzimleriyle doğrulanması

1: DNA merdiveni (1000bç-200bç), 2: pBSK-  $\Delta$ Np63 $\beta$  kesilmemiş plasmid, 3: pBSK-  $\Delta$ Np63 $\beta$  EcoRI, 4: pBSK-  $\Delta$ Np63 $\beta$  KpnI, 5: pBSK-  $\Delta$ Np63 $\beta$  MfeI

### 5.2.2. pRetroX-Tight-pur vektörü içerisine $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nın klonlanması ve restriksiyon enzimiyle doğrulanması

pBSK-  $\Delta$ Np63 $\beta$ ' dan restriksiyon enzimleri yardımıyla  $\Delta$ Np63 $\beta$  çıkartılarak pRetroX-Tight-pur vektörü içerisine klonlandı, yapılan plazmid ekstraksiyonları % 1'lik agoroz jelde 120V'da yürütüldü ve içersinde  $\Delta$ Np63 $\beta$  bulundurması muhtemel pRetroX-Tight-pur plazmitler belirlendi (Şekil 5.5.).

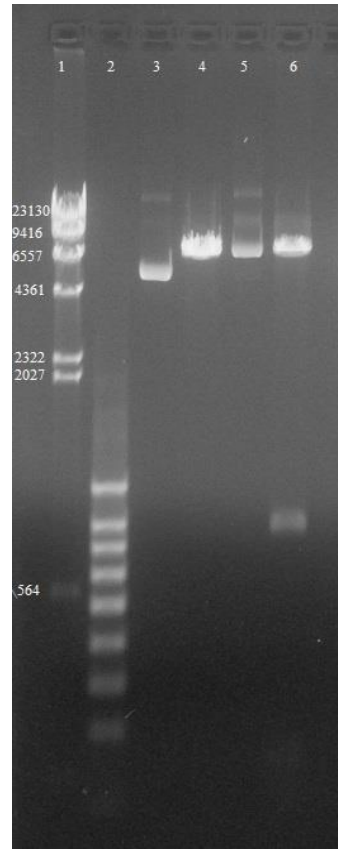


**Şekil 5.5.**  $\Delta$ Np63 $\beta$ 'nın pRetroX-Tight-pur vektörü içerisine klonlanması

1: pRetroX-Tight-pur, 2: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 1, 3: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 2, 4: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 3, 5: pRetroX-Tight-pur -  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 4, 6: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 5, 7: pRetroX-Tight-pur-  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 6, 8: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 7, 9: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 8, 10: pRetroX-

Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 9, 11: pRetroX-Tight-pur-  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 10, 12: pRetroX-Tight-pur  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 11, 13: pRetroX-Tight-pur-  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 12, 14: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 13, 15: pRetroX-Tight-pur-  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 14

Plazmit ekstraksiyonundan sonra elde edilen Retro -  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 10 doğrulanmak üzere pRetroX-Tight-pur plazmidi ile birlikte EcoRI restriksiyon enzimiyle kesildi % 1'lik agoroz jelde 120V'da yürütüldü. İstenilen boylarda bantlar görüldü ve büyük volümde elde edilmek üzere çoğaltıldı (Şekil 5.6).

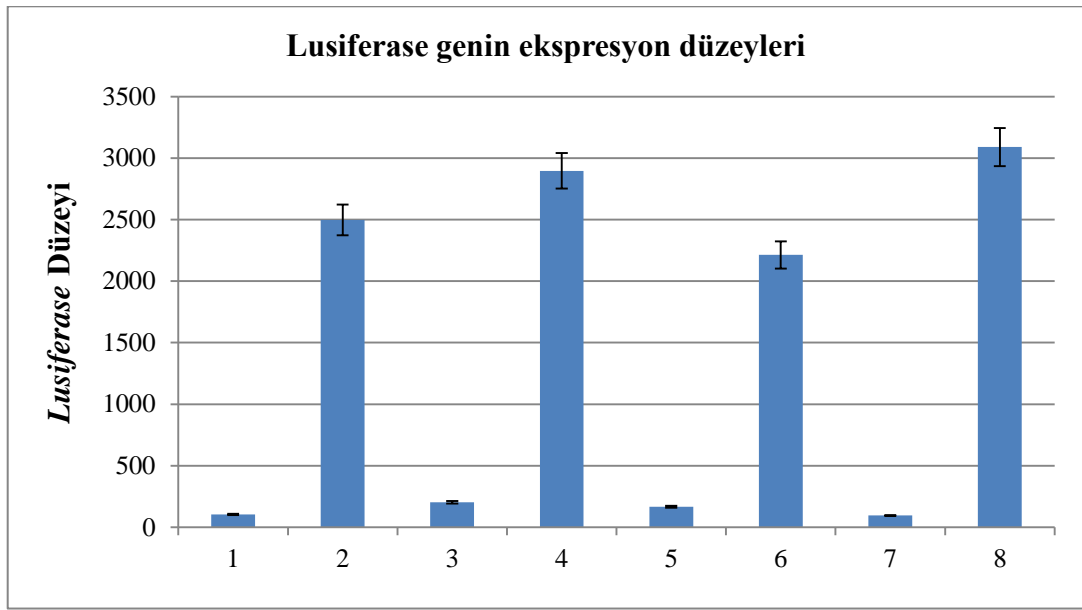


**Şekil 5.6.** Retro -  $\Delta$ Np63 $\beta$  klon 10' un restriksiyon enzimiyle doğrulanması

1:  $\lambda$  DNA/HindIII 2: DNA merdiveni (1000bç-200bç), 3: pRetroX-Tight-pur kesilmemiş plazmid, 4: pRetroX-Tight-pur EcoRI, 5: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  kesilmemiş plazmid, 6: pRetroX-Tight-pur- $\Delta$ Np63 $\beta$  EcoRI

### 5.3. rtTA İfade Eden Stabil TG8G Hücrelerin Hazırlanması

rtTA ifade eden hücreler hazırlamak üzere pRetroX-Tet-On vektörü transfekte edilen hücrelerden elde edilen klonlara en iyi rtTA ifade eden hücreyi bulmak için bu hücrelere pRetroX-Tight-Pur-luc plazmitinin transfeksiyonu yapıldı ve sonrasında *Lusiferase* genin ifade düzeyleri lüminasyon ölçümüyle belirlendi. En iyi rtTA ifade eden T98G hücre hattı olarak pRetroX-Tet-On bulunduran ve doksasiklin ile en yüksek uyarılan dört klon seçildi ve bir havuzda karıştırılarak sonraki çalışmalarda kullanıldı (Şekil 5.7.).

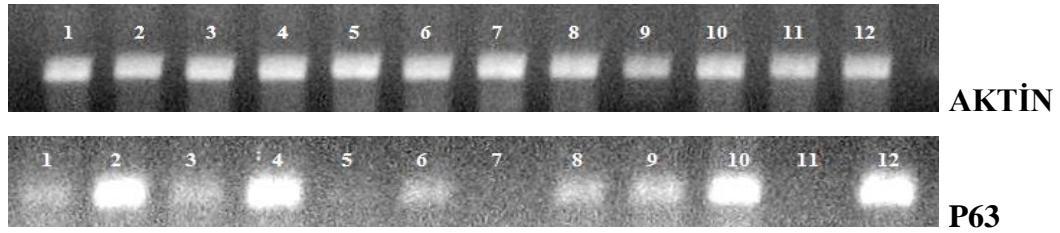


Şekil 5.7. rtTA ifade eden T98G hücrelerinin Lusiferase geni ifade düzeyleri

1: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinsiz klon1, 2: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinli klon1, 3: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinsiz klon2, 4: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinli klon2, 5: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinsiz klon3, 6: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinli klon3, 7: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinsiz klon4, 8: T98G pRetroX-Tet-On doksasiklinli klon4

#### 5.4. pRetroX-pur-P63β bulunduran TAT98G hücrelerinin doksasiklin varlığında ΔNp63β ifadelerinin araştırılması

rtTA ifade eden hücrelerin elde edilmesinden sonra en iyi TA ifade eden hücre belirlendikten sonra bu hücreye pRetroX-pur-P63β plazmitinin transfeksiyonu ile sürekli hücre hatları elde edildi. En iyi klonun seçilmesi için RNA ekstraksiyonu ve hemen ardından cDNA sentez kiti kullanılarak hazırlanan cDNA'lardan kontrol primeri olarak β-aktin, p63 ifadesini göstermek için p63 ifade primeri kullanılarak RT-PZR yapıldı. PZR ürünleri % 1.5'luk agaroz jelde 120V'da yürütüldü ve görüntülendi. En iyi pRetroX-pur-P63β ifadeleyen beş T98G hücresi seçildi ve havuz yapılarak çalışmalarda kullanıldı (Şekil 5.8.).

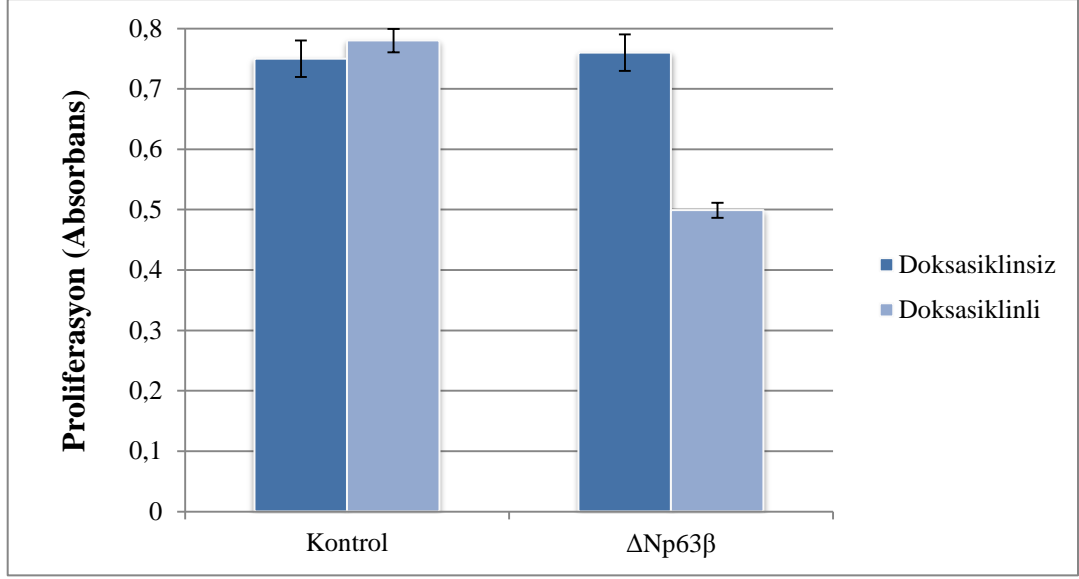


Şekil 5.8. TAT98G retro/p63β ifade eden hücrelerin aktin ve p63 ifade düzeyleri

1:TAT98G retro/p63β doksasiklinsiz klon 1, 2: TAT98G retro/p63β doksasiklinli klon 1, 3: TAT98G retro/p63β doksasiklinsiz klon 2, 4: TAT98G retro/p63β doksasiklinli klon 2, 5: TAT98G retro/p63β doksasiklinsiz klon 3, 6: TAT98G retro/p63β doksasiklinli klon 3, 7: TAT98G retro/p63β t doksasiklinsiz klon 4, 8: TAT98G retro/p63β doksasiklinli klon 4, 9: TAT98G retro/p63β t doksasiklinsiz klon 4; 10: TAT98G retro/p63β doksasiklinli klon 4; 11: TAT98G retro/p63β doksasiklinsiz klon 5; 12: TAT98G retro/p63β doksasiklinli klon 5

#### 5.5. ΔNp63β İzofornunun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin MTT Testi ile Araştırılması

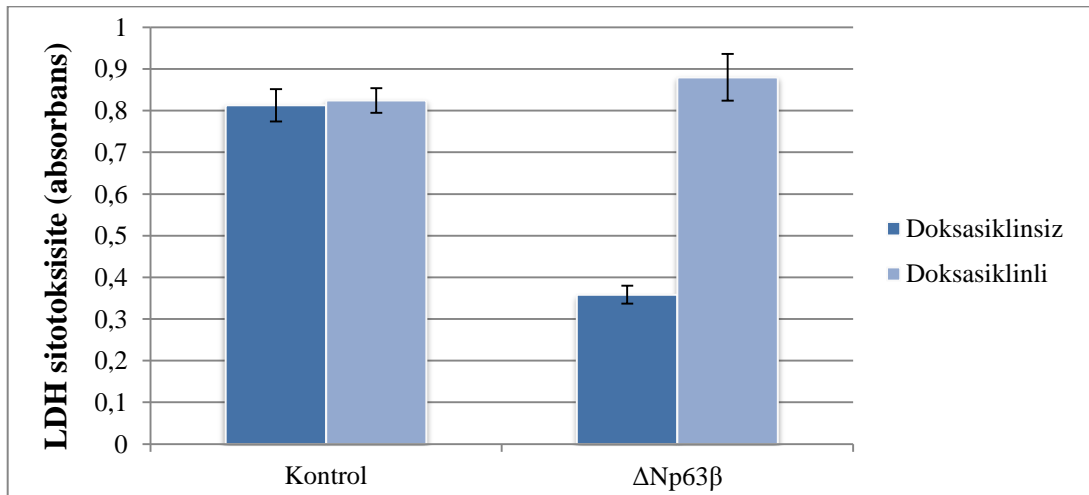
Canlı hücre sayısının belirlenmesinde spektrofotometrik bir yöntem olan MTT yöntemi ΔNp63β izofornunun hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapıldı. ΔNp63β ifade eden T98G hücrelerinde yaklaşık % 50 oranında azalma tesbit edildi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5.9.).



**Şekil 5.9.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımdan 72 saat sonra birbirinden bağımsız 3 kez tekrarlanan MTT testi yapılarak proliferasyon üzerine etkisinin araştırılması

#### 5.6. ΔNp63β İzoformunun Hücre Sitotoksitesi Üzerine Etkisinin LDH Testi ile Araştırılması

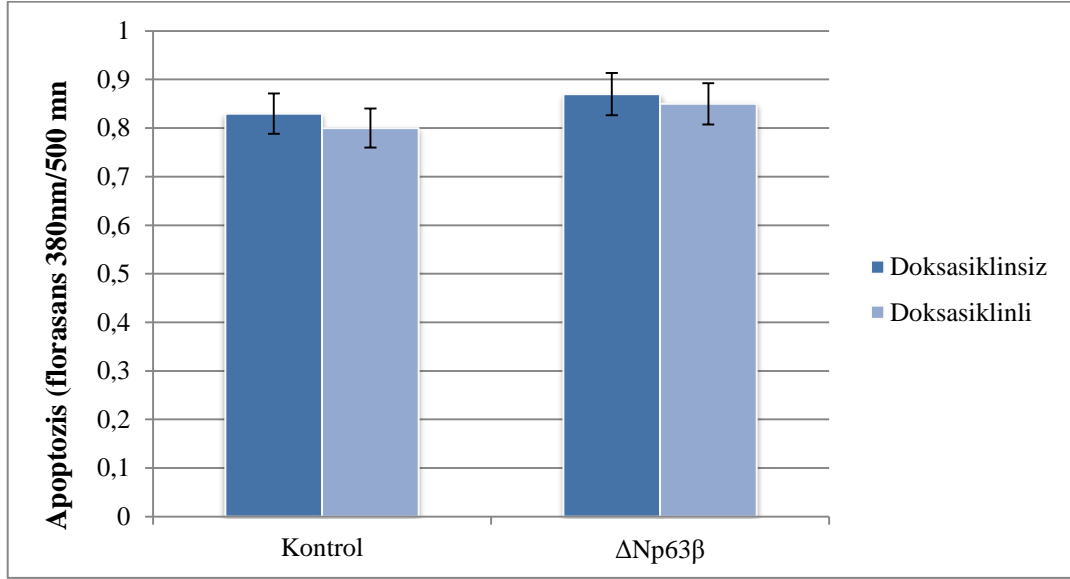
ΔNp63β izoformunun hücreler üzerindeki direkt sitotoksitesini göstermek amacıyla LDH testi yapıldı ΔNp63β ifade eden T98G hücrelerinde şekillenen ölümün yaklaşık % 50 oranında arttığı belirlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5.10.).



**Şekil 5.10.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımdan 72 saat sonra birbirinden bağımsız 3 kez tekrarlanan LDH testi yapılarak hücre üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması

## 5.7. $\Delta$ Np63 $\beta$ İzoformunun Hücre Apoptozisi Üzerine Etkisinin Araştırılması

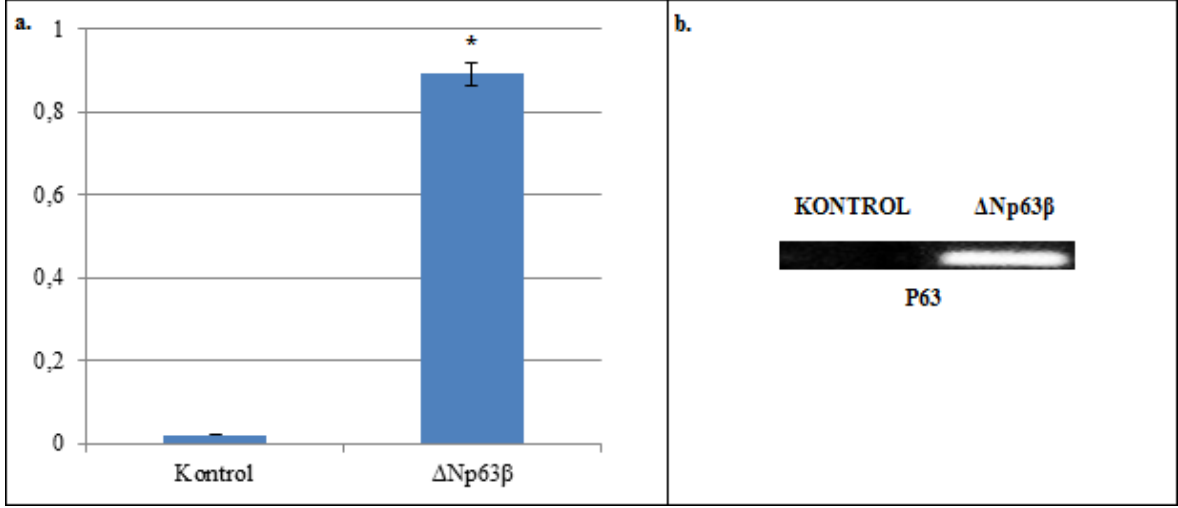
$\Delta$ Np63 $\beta$  izoformunun hücreler üzerindeki direkt apoptozis etkisi apoptozisde önemli rol oynayan kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivitesine bakılarak belirlendi.  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde anlamlı bir değişiklik tesbit edilemedi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5.11.)



**Şekil 5.11.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin tetrasiklin ile uyarımdan 72 saat sonra birbirinden bağımsız 3 kez tekrarlanan apoptozis testi yapılarak hücre üzerindeki apoptotik etkisinin gösterimi

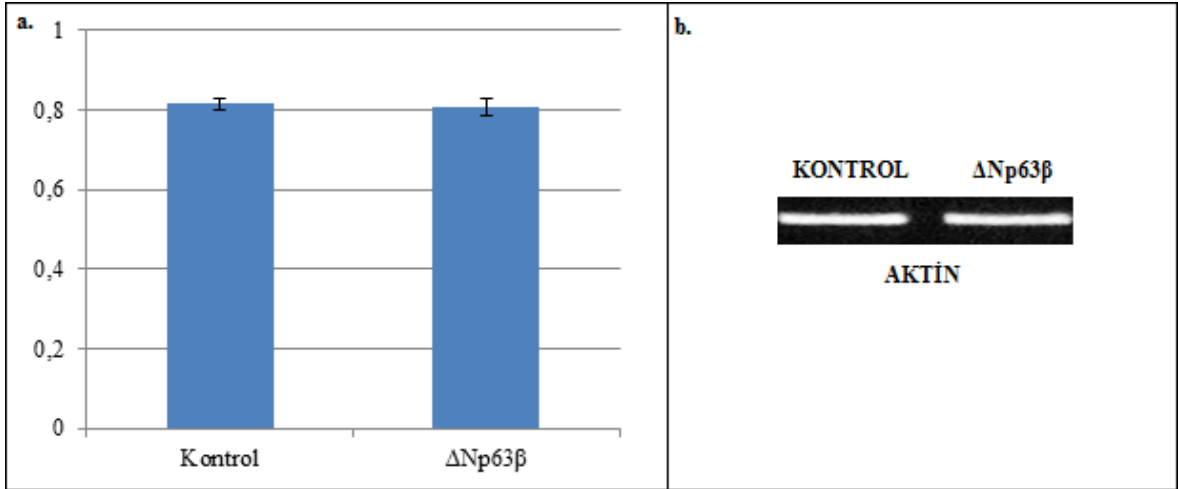
## 5.8. $\Delta$ Np63 $\beta$ izoformunun hedef genleri üzerindeki etkilerinin araştırılması

rtTA ifade eden hücrelerden ve doksasiklin varlığında sürekli  $\Delta$ p63 $\beta$  ifade eden hücrelerden RNA ekstraksiyonu ve hemen ardından cDNA sentez kiti kullanılarak hazırlanan cDNA'lardan, bir 'housekeeping' gen olan  $\beta$ -aktin'i amplifiye eden primerler kullanılarak yapılan RT-PZR ile  $\Delta$ p63 $\beta$  ifade eden ve etmeyen T98G hücrelerinden elde edilen cDNA'ların miktarları eşitlenerek hedef genlerin ifade düzeyleri araştırıldı. PZR ürünleri % 1.5'lük agoroz jelde 120V'da yürütüldü ve görüntüledi. İfade düzeyleri ölçüldükten sonra  $\beta$ -aktin geni ile kıyaslanarak (Şekil 5.13.) artış ve azalmalar grafik ile gösterildi. Doksasiklin varlığında  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin p63 primerleri kullanılarak yapılan RT-PZR sonucunda  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade artışı görülmektedir (Şekil 5.12.).



**Şekil 5.12.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P63 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan p63 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi gösterimi b. p63 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )

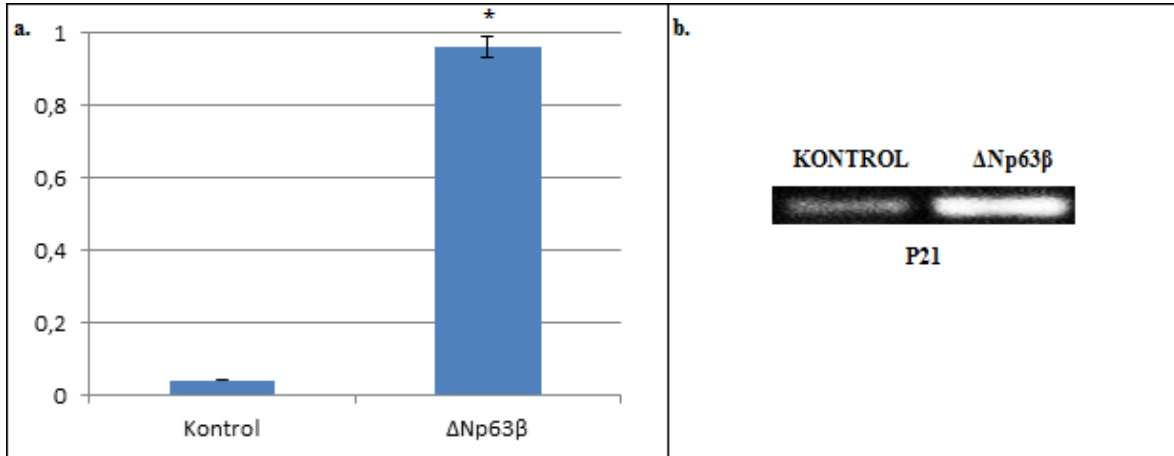


**Şekil 5.13.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra aktin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan aktin genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile gösterimi b. Aktin geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi

### 5.8.1. Hücre döngüsü kontrol mekanizmasından sorumlu genlerin ve proliferasyondan sorumlu genlerin analizi

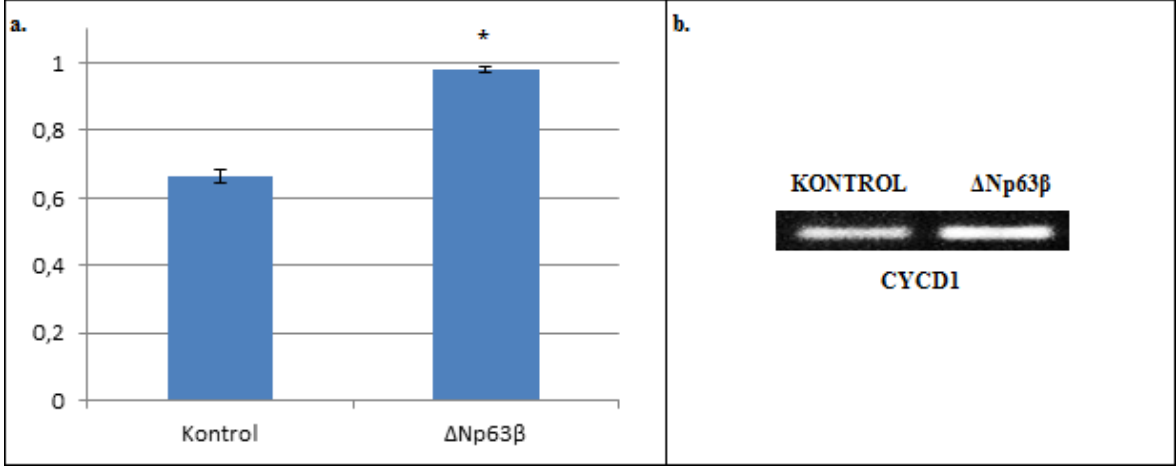
Hücre döngüsü kontrol mekanizmasından sorumlu p21, siklin D1 ve kanser dahil hücre gelişimi, proliferasyonu, hücre sağ kalımından sorumlu p13K, AKT1 genlerinin ifade düzeylerine bakıldı.  $\Delta p63\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde  $\Delta p63\beta$  ifade etmeyenlere oranla, p21'de yaklaşık 90 katlık ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.14.), siklin D1'de yaklaşık % 40'lık bir artış görülmektedir ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.15.). P13K ifade düzeyinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken ( $p > 0,05$ ) (Şekil 5.16.),  $\Delta p63\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde AKT1 mRNA ifadesi düzeyinde yaklaşık % 30 oranında artış gözlenmektedir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5.17.).  $\Delta p63\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde epidermal büyüme faktörlerinden olan TGF $\alpha$ 'da yaklaşık % 80 ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.18.), TGF $\beta 3$ 'de yaklaşık 50 katlık ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.19.), proliferasyonda işlev gören midkinde yaklaşık % 200 ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.20.), insülin benzeri büyüme faktörü olan IGF2'de yaklaşık 25 katlık bir artış gözlenirken ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.21.), IGFBP2, transkripsiyon faktörü ( $p > 0,05$ ) (Şekil 5.22.) HIF1 ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5.23.) ve PAF1'in ifade düzeylerinde ( $p > 0,05$ ) (Şekil 5.24.) herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır.



**Şekil 5.14.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P21 ifade düzeylerinin gösterimi

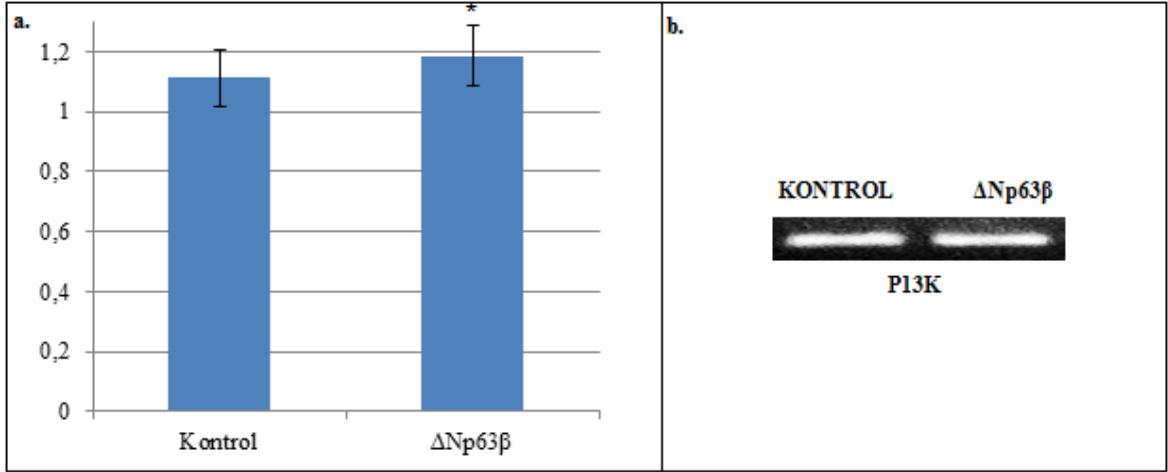
a. Deneyle 3 kez tekrarlanan p21 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. P21 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )





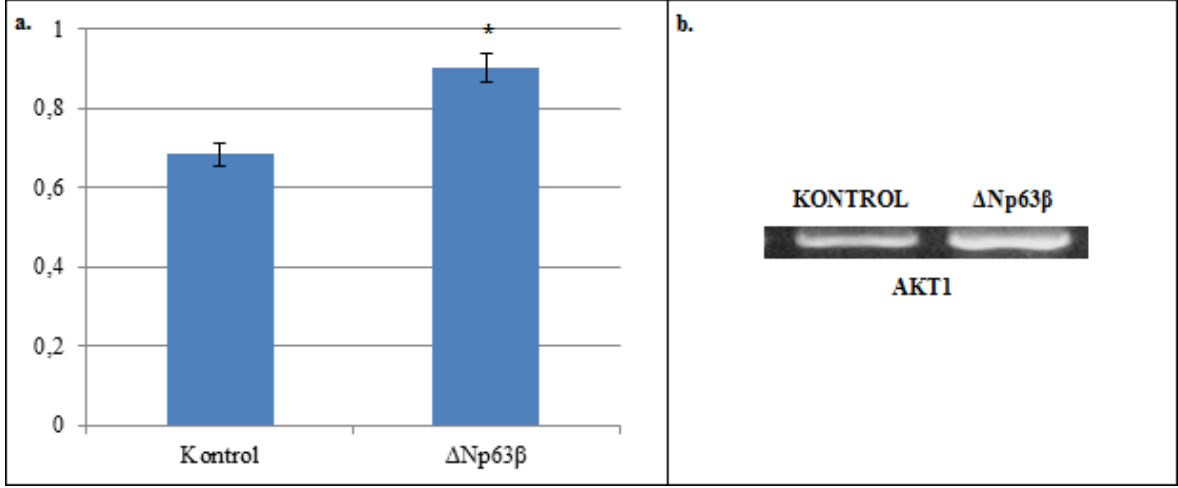
**Şekil 5.15.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CYCD1 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan CYCD1 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. CYCD1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



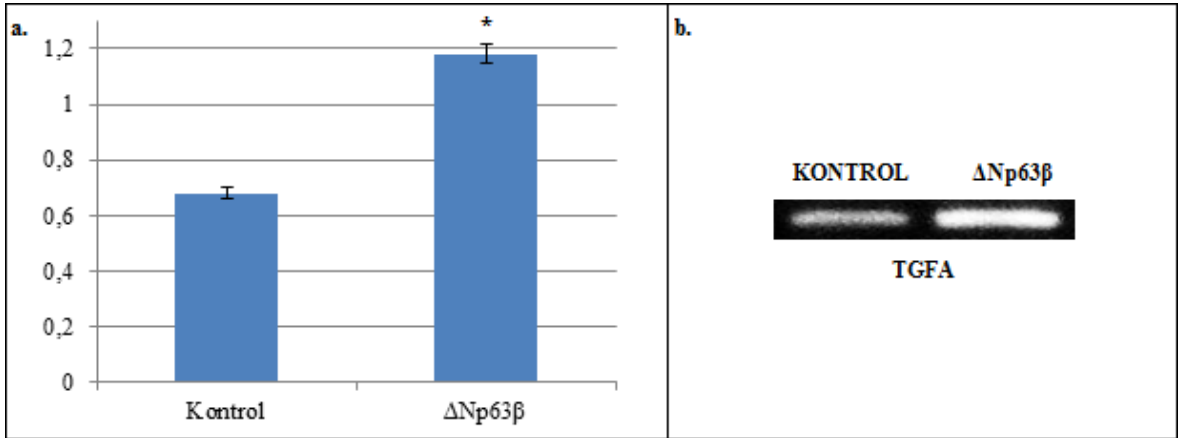
**Şekil 5.16.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra PI3K ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan PI3K genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. PI3K geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p > 0,05$ )



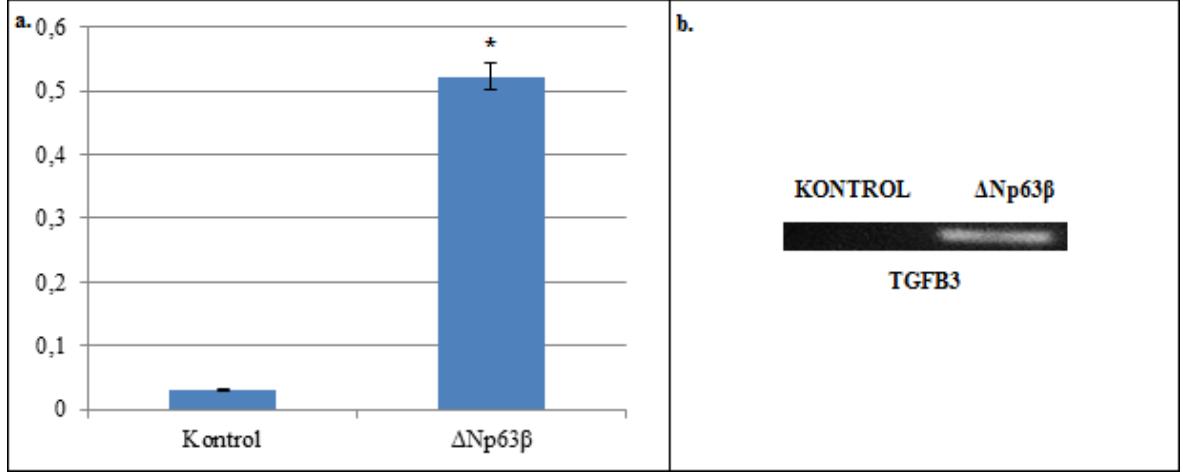
**Şekil 5.17.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra AKT1 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan AKT1 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. AKT1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,05$ )



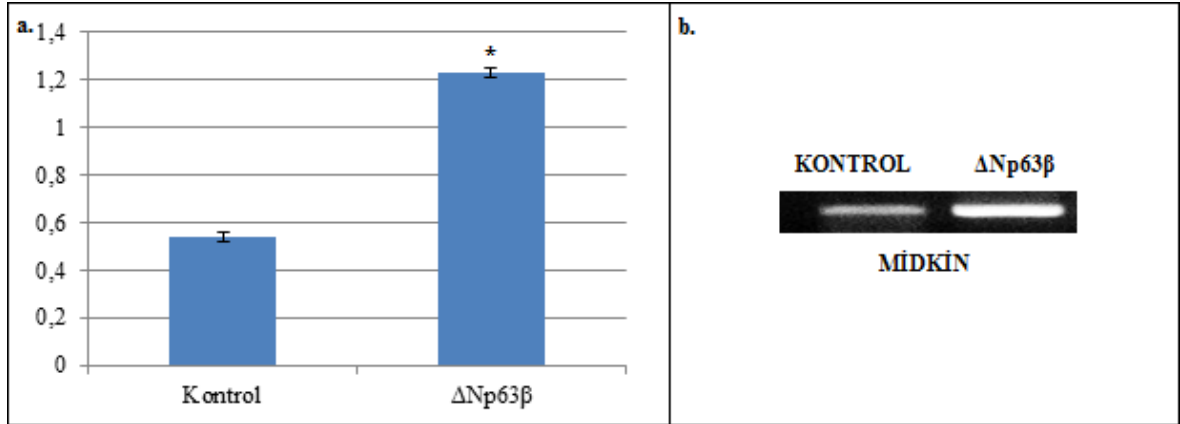
**Şekil 5.18.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra TGFA ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan TGFA genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. TGFA geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



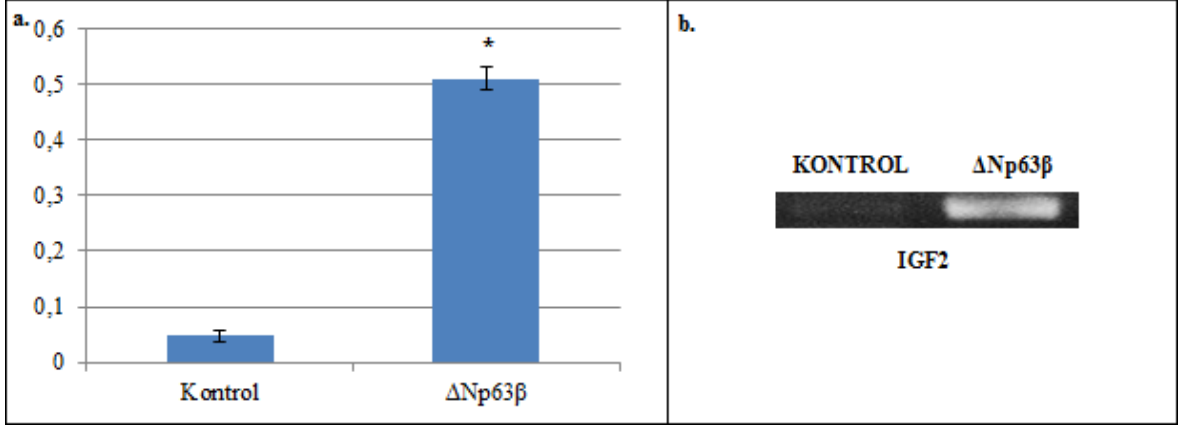
**Şekil 5.19.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra TGFB3 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan TGFB3 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. TGFB3 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p<0,01$ )



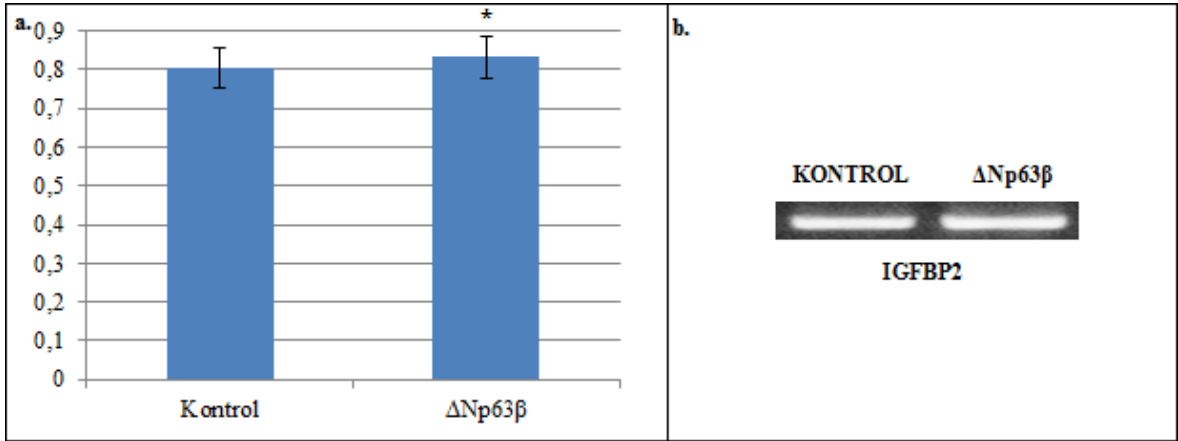
**Şekil 5.20.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra Midkin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan midkin genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. midkin geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p<0,01$ )



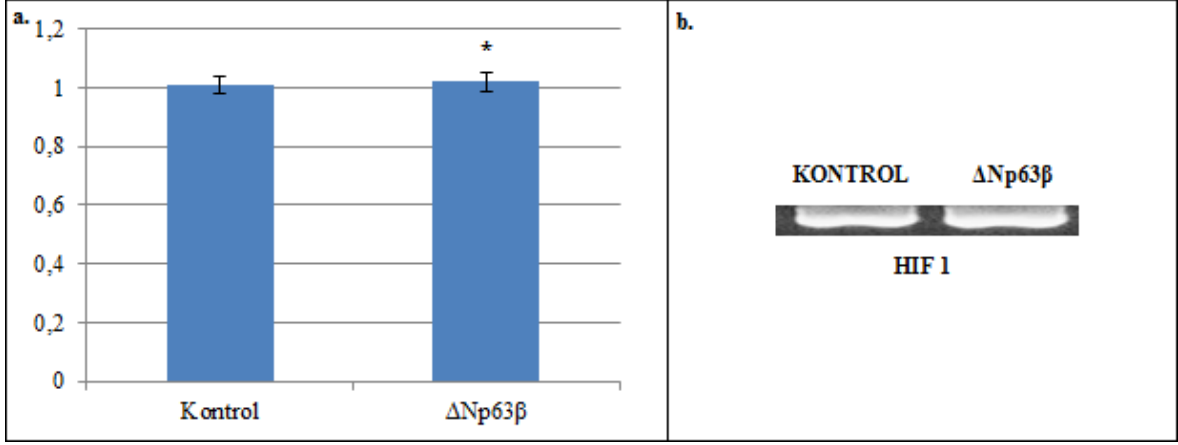
**Şekil 5.21.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IGF2 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan IGF2 genin ifade düzeyinin ± standart sapmaları ile β aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. IGF2 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\*p<0,01)



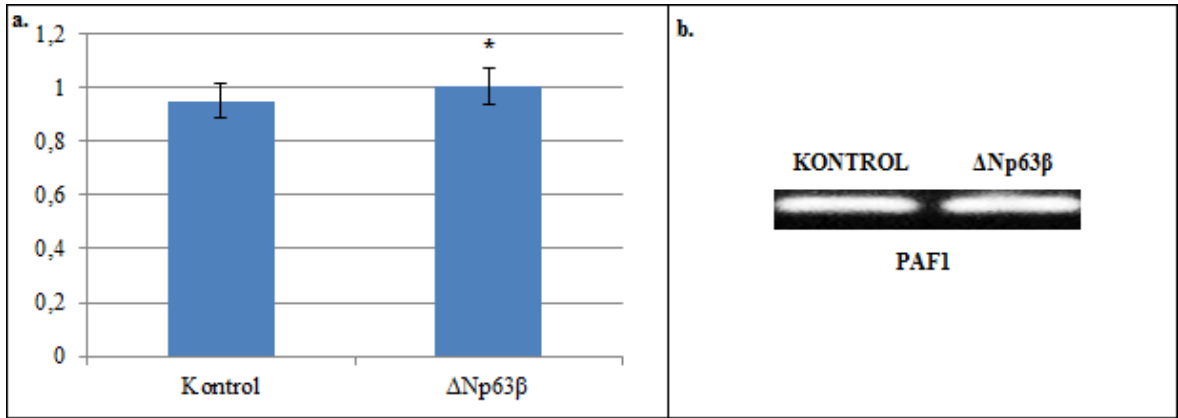
**Şekil 5.22.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IGFBP2 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan IGFBP2 genin ifade düzeyinin ± standart sapmaları ile β aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. IGFBP2 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\*p > 0,05)



**Şekil 5.23.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra HIF1 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan HIF1 genin ifade düzeyinin ± standart sapmaları ile β aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. HIF1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\*p<0,05)

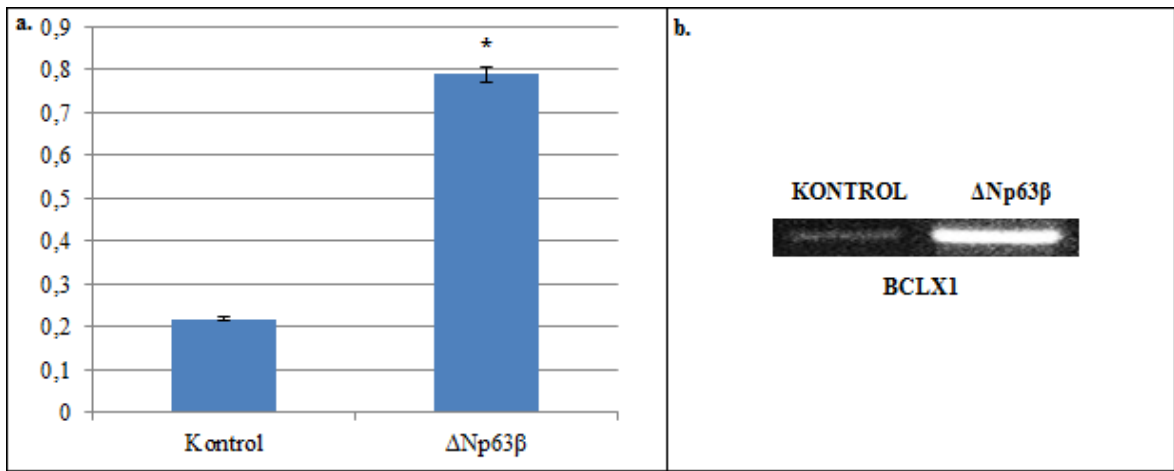


**Şekil 5.24.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra PAF1 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan PAF1 genin ifade düzeyinin ± standart sapmaları ile β aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. PAF1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\*p > 0,05)

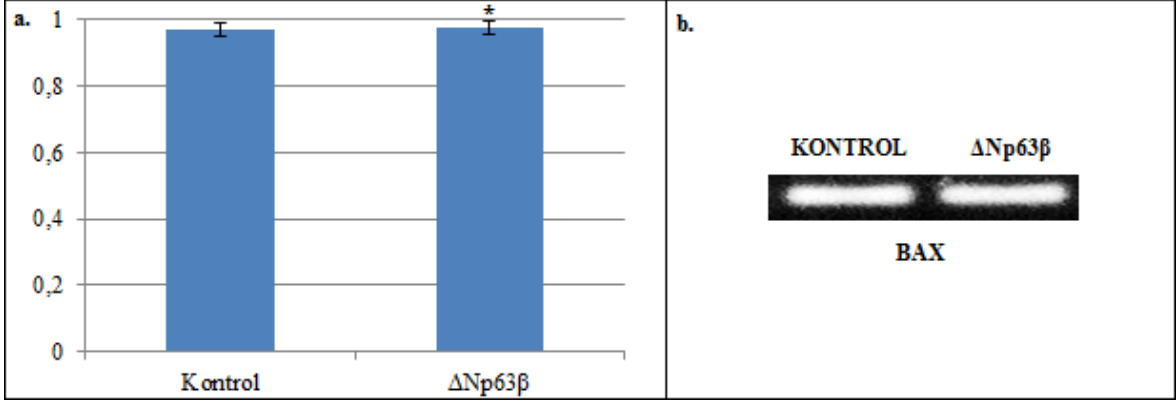
### 5.8.2. Apoptozis ile ilişkili genlerin ifade analizleri

Apoptozis ile ilişkili olarak da, BCLX1, BAX, BAD, BİD, CIAP1, CIAP2, XIAP ifade düzeylerine bakıldı. BAX ( $p<0,01$ ), BAD ( $p<0,05$ ), BİD ( $p<0,05$ ), XIAP ( $p<0,01$ ), ifade düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken (Şekil 5.26-5.28., 5.31.) BCLX1 'de  $\Delta p63\beta$  ifade eden T98G hücrelerde  $\Delta p63\beta$  ifade etmeyen hücrelere oranla yaklaşık % 400 oranında ( $p<0,01$ ) (Şekil 5.25.), CIAP1'de % 100'lük ( $p<0,01$ ) (Şekil 5.29.), CIAP2'de ise yaklaşık % 600 oranında bir artış dikkati çekmektedir ( $p<0,01$ ) (Şekil 5.30.).



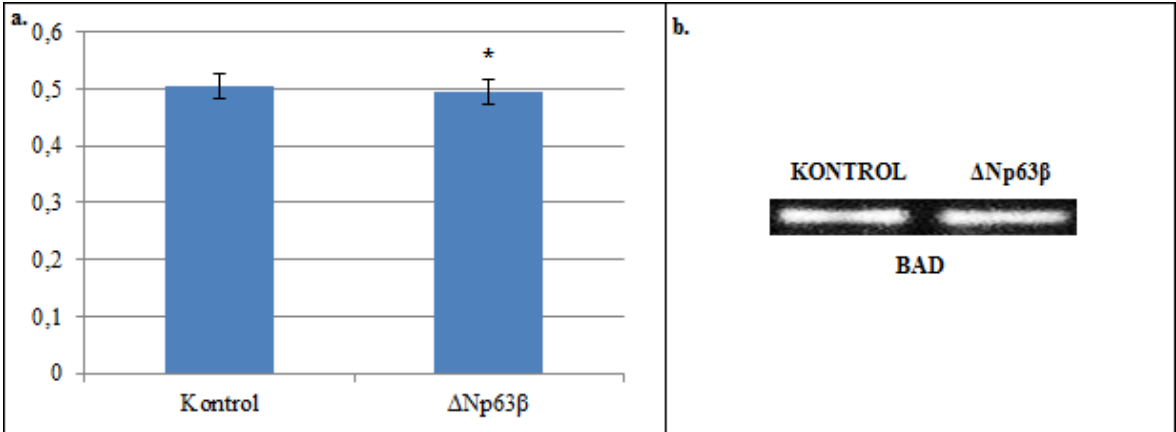
**Şekil 5.25.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BCLX1 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan BCLX1 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. BCLX1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p<0,01$ )



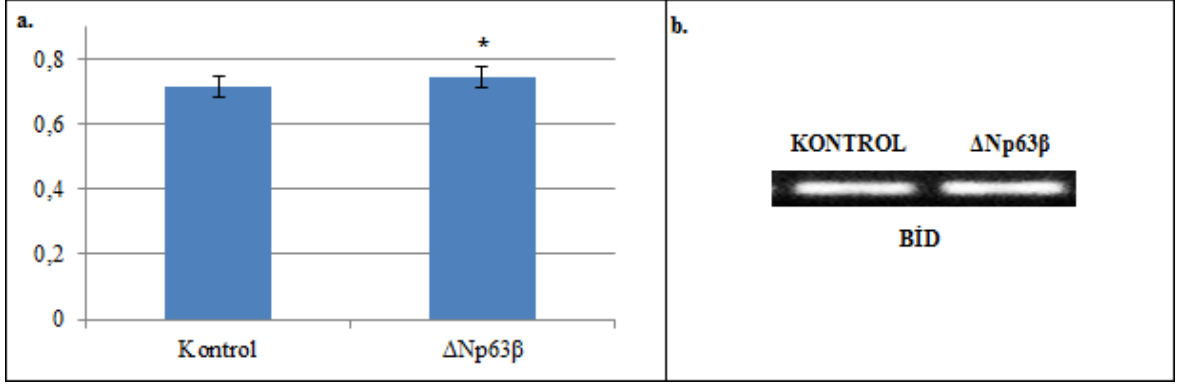
**Şekil 5.26.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BAX ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan BAX genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. BAX geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



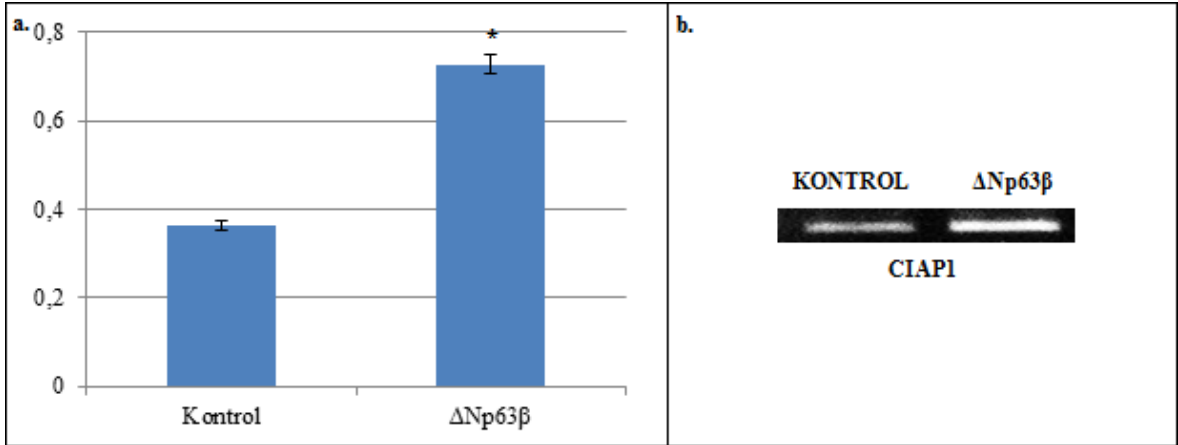
**Şekil 5.27.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BAD ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan BAD genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. BAD geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,05$ )



**Şekil 5.28.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra BİD ifade düzeylerinin gösterimi

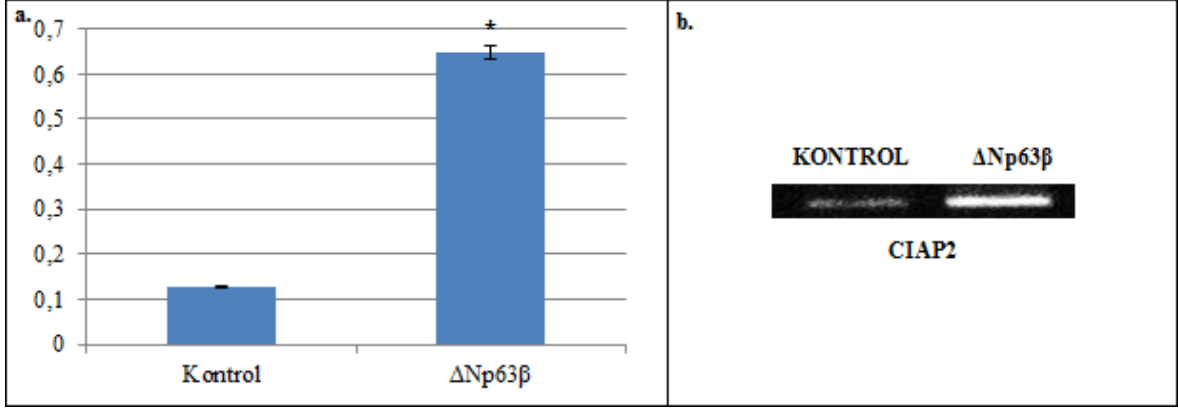
a. Deneyle 3 kez tekrarlanan BİD genin ifade düzeyinin ± standart sapmaları ile β aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. BİD geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\*p<0,05)



**Şekil 5.29.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP1 ifade düzeylerinin gösterimi

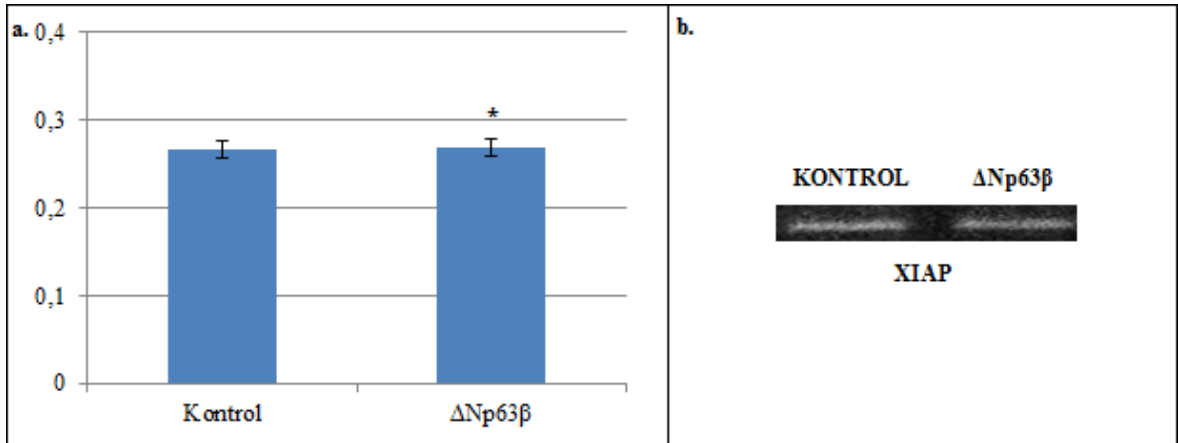
a. Deneyle 3 kez tekrarlanan CIAP1 genin ifade düzeyinin ± standart sapmaları ile β aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. CIAP1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\*p<0,01)





**Şekil 5.30.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP2 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan CIAP2 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. CIAP2 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



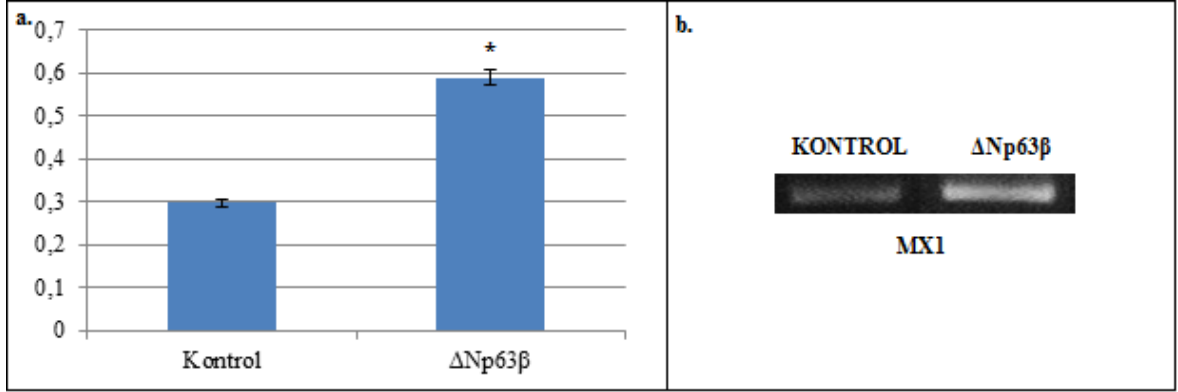
**Şekil 5.31.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra XIAP ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan XIAP genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. XIAP geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )

### 5.5.3. P53 ile ilişkili INF hedef gen ifadesinin analizleri

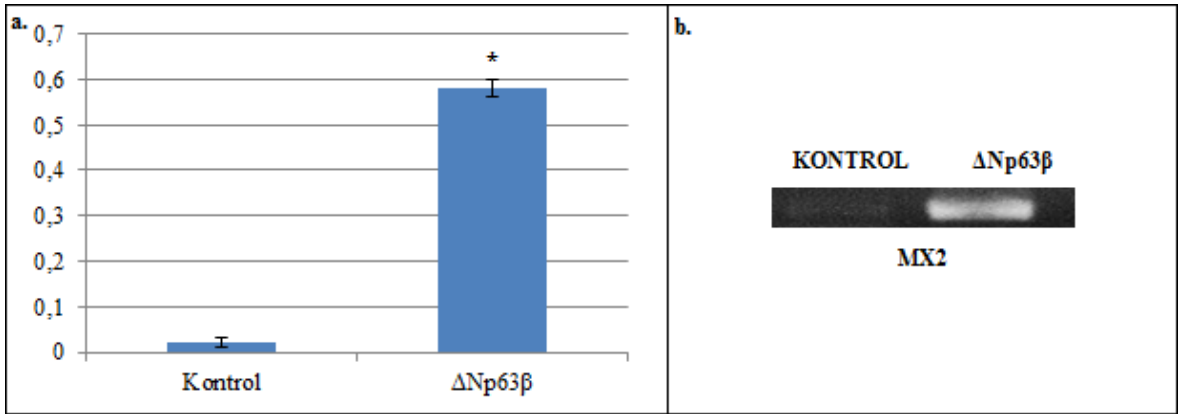
INF'lar tarafından regüle edilen ve p53 fonksiyonları ile ilişkili genlerden, MX1, MX2, OASL, IFI6'ın ifade düzeylerine bakıldı. Δp63β ifade eden T98G hücrelerinde MX1'de yaklaşık % 100'lük ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.32.), MX2'de yaklaşık 60 katlık ( $p < 0,01$ ) (Şekil

5.33.), OASL miktarında yaklaşık % 100 (  $p < 0,01$ ) (Şekil 5.34.), IFI6'da yaklaşık % 20 oranında bir artış gözlemlendi (  $p < 0,05$ ) (Şekil 5.35.). P53'de ise tutarlı bir sonuç elde edilemedi (  $p > 0,05$ ) (Şekil 5.36.).



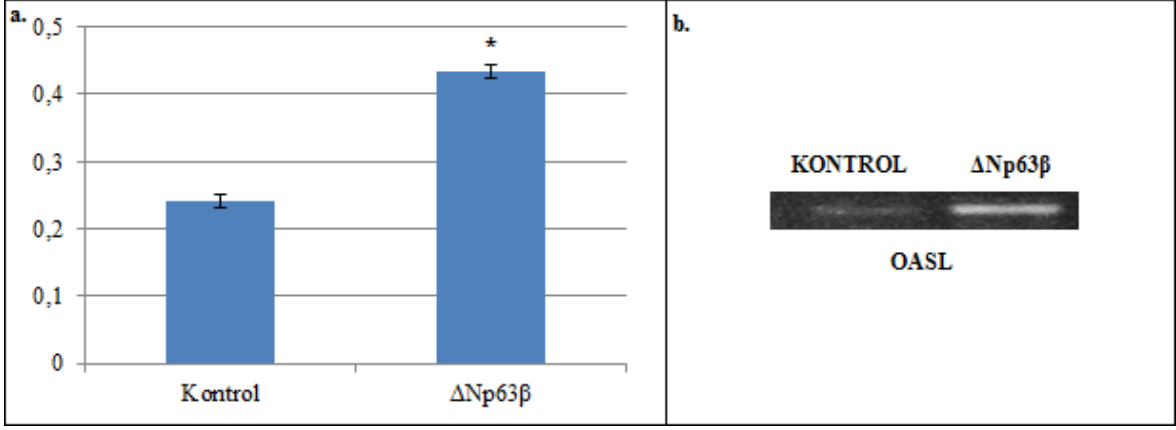
**Şekil 5.32.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra MX1 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneşleri 3 kez tekrarlanan MX1 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. MX1 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



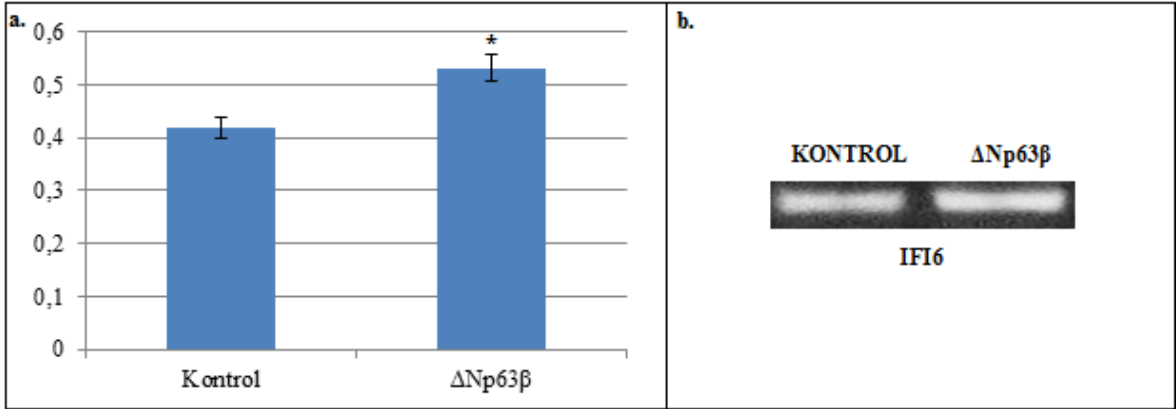
**Şekil 5.33.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra MX2 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneşleri 3 kez tekrarlanan MX2 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. MX2 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



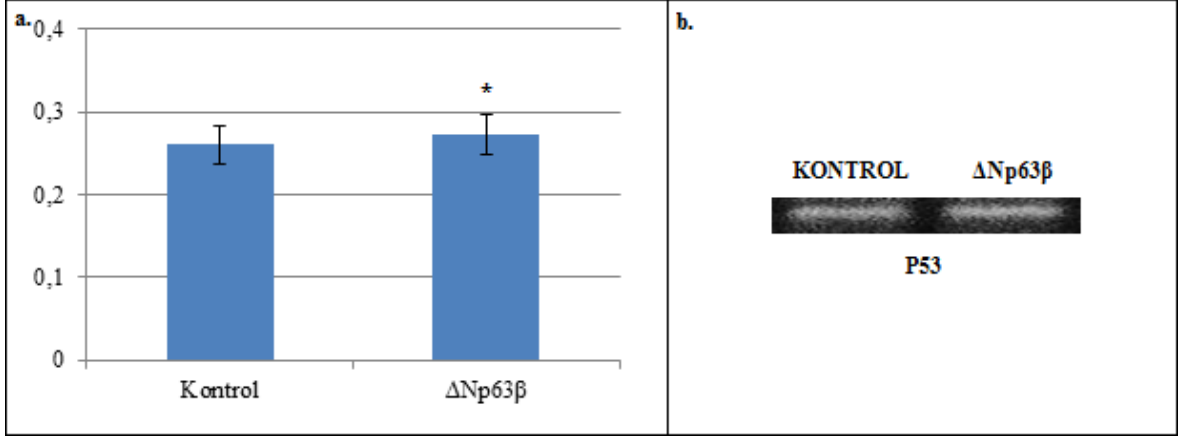
**Şekil 5.34.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra OASL ifade düzeylerinin gösterimi

a. a. Deneyleri 3 kez tekrarlanan OASL genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. OASL geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,01$ )



**Şekil 5.35.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IFI6 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyleri 3 kez tekrarlanan IFI6 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. IFI6 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p < 0,05$ )

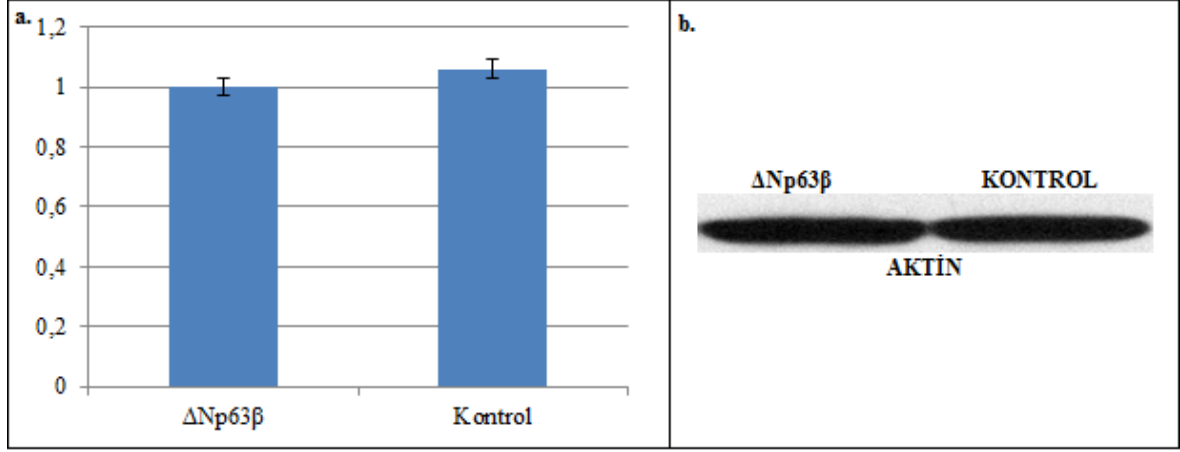


**Şekil 5.36.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra p53 ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan P53 genin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin genin ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. P53 geninin ifade düzeyinin RT-PZR sonrası agaroz jelde gösterimi (\* $p > 0,05$ )

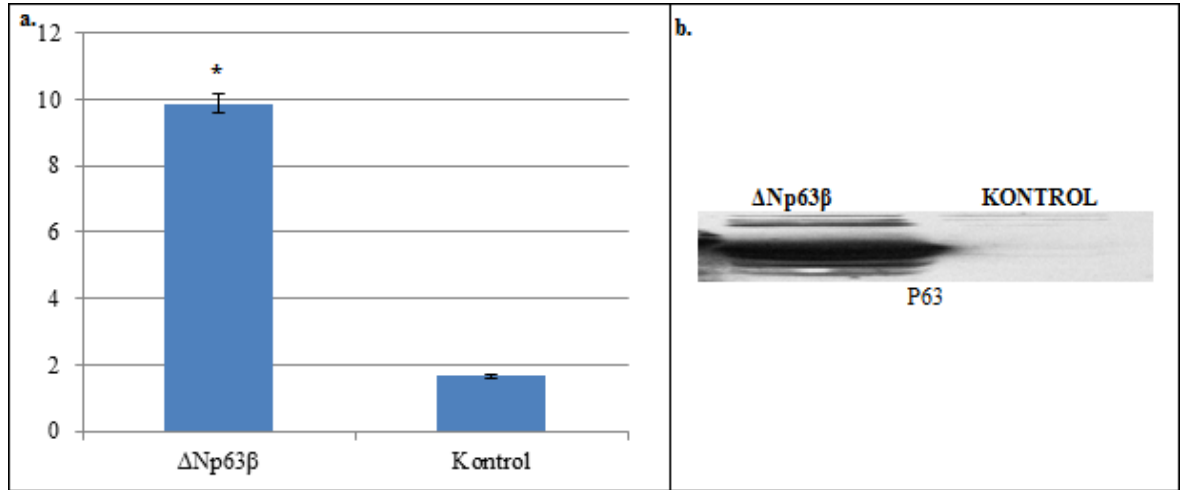
### 5.9. TAT98G ve TAT98G-ΔNp63β Hücrelerinin Protein İfade Düzeylerinin Western Blot İle Gösterilmesi ve Gen İfade Düzeyleriyle Kıyaslanması

rtTA ifade eden hücrelerden ve doksasiklin varlığında sürekli Δp63β ifade eden hücrelerden elde edilen proteinlerin ilgili genlerin antikorları kullanılarak ifade düzeyleri western blot yöntemi ile araştırıldı. Bir 'housekeeping' gen olan  $\beta$ -aktin kullanılarak yapılan western blot (Şekil 5.37.) ile Δp63β ifade eden ve etmeyen T98G hücrelerinden elde edilen proteinlerin miktarları eşitlendikten sonra ifade düzeyleri  $\beta$ -aktin geni ile kıyaslanarak artış ve azalmalar artış ve azalmalar grafik ile gösterildi. Doksasiklin varlığında ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin p63 antikorunu kullanılarak yapılan western blot sonucunda ΔNp63β ifade artışı görülmektedir (Şekil 5.38.).



**Şekil 5. 37.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra aktin proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan aktin proteininin ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile gösterimi b. Aktin geninin ifade düzeyinin western blot yöntemiyle gösterimi

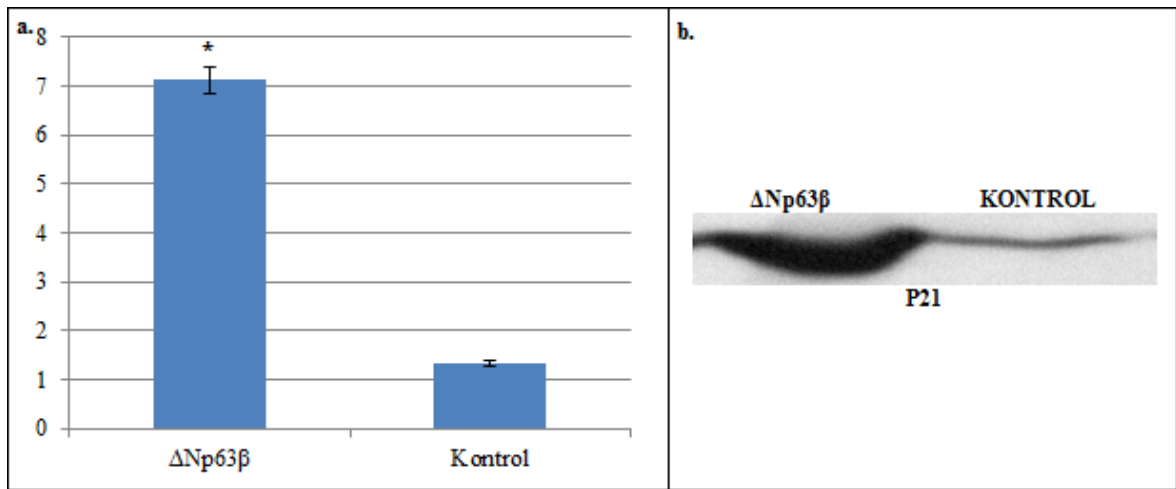


**Şekil 5. 38.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra P63 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan P63 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. P63 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\* $p < 0,01$ )

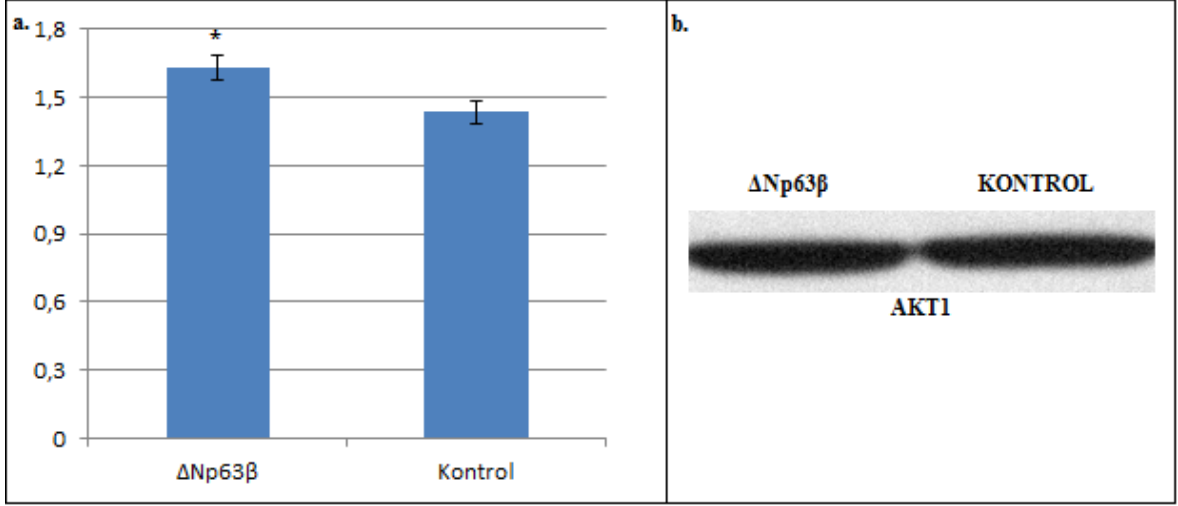
### 5.9.1. Hücre döngüsü kontrol mekanizmasından sorumlu proteinlerin ifade düzeylerinin analizi

$\Delta p63\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde RT-PZR ile elde edilen sonuçlarla tutarlı p21 protein ifade düzeyinde yaklaşık % 700'lük bir artış görüldü ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.39.). Ayrıca protein düzeyinde  $\Delta p63\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde AKT1 proteininde % 15 oranında bir artış görülürken ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.40.) fosforile AKT1 proteinin ifadesinde yaklaşık % 200'lük bir artış göze çarpmaktadır ( $p < 0,01$ ) (5.41.).



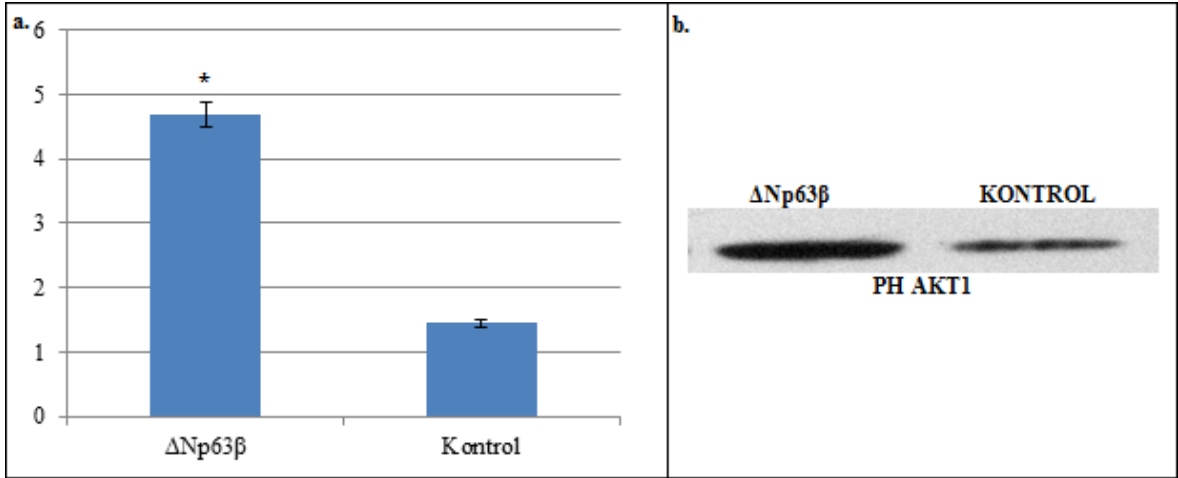
**Şekil 5. 39.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra p21 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan P21 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. P21 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\* $p < 0,01$ )



**Şekil 5. 40.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra AKT1 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan AKT1 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. AKT1 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\*p < 0,05)

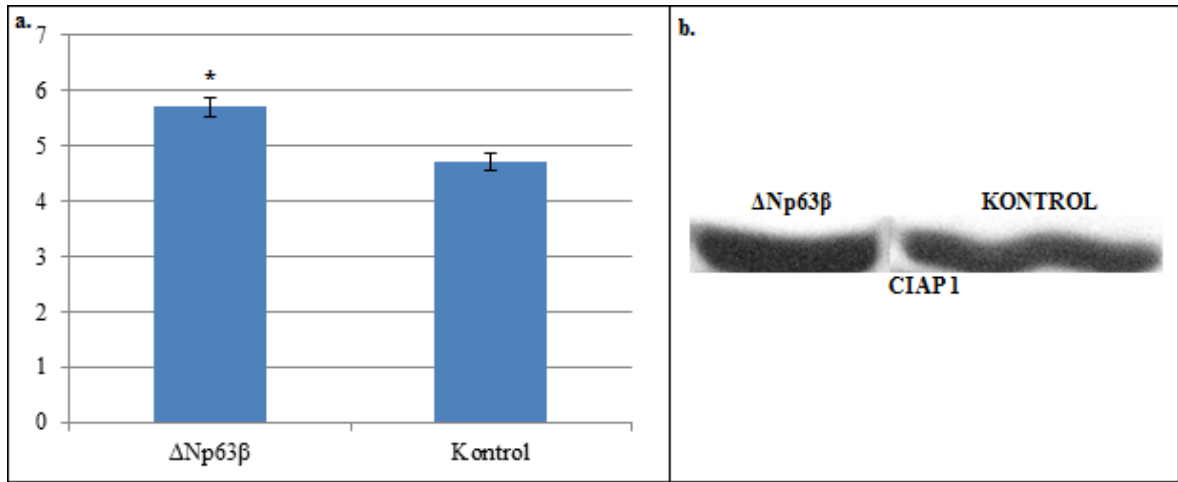


**Şekil 5. 41.** ΔNp63β ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra PH AKT1 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan phAKT1 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. phAKT1 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\*p < 0,01)

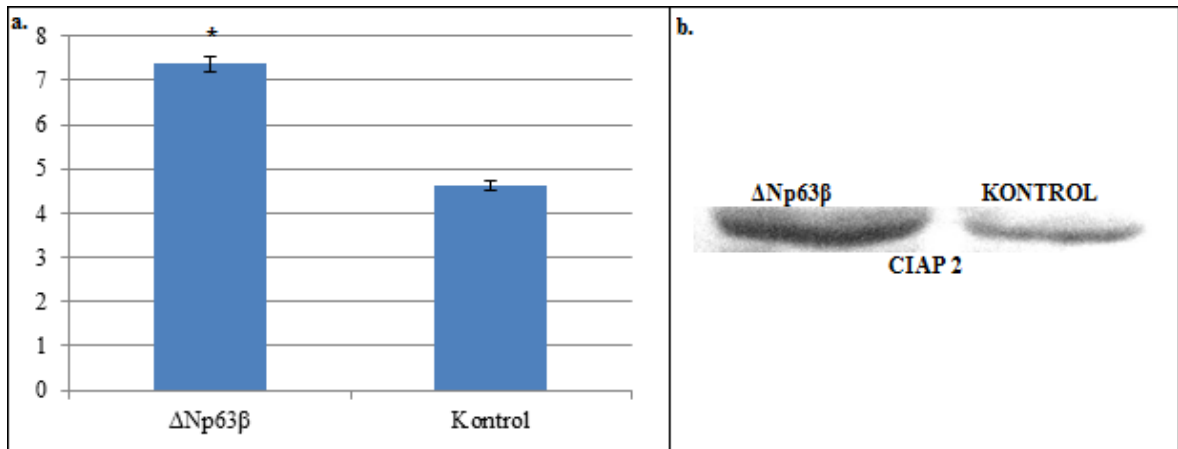
### 5.9.2. Apoptozis ile ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinin analizi

$\Delta$ p63 $\beta$  ifade eden T98G hücrelerinde RT-PZR ile elde edilen sonuçlarla tutarlı Ciap1'de yaklaşık % 20'lik ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.42.), Ciap2'de yaklaşık % 60 oranında bir artış görülürken ( $p < 0,01$ ) (Şekil 5.43.), Xiap'da tutarlı bir sonuç elde edilemedi ( $p > 0,05$ ) (Şekil 5.44.).



**Şekil 5. 42.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP1 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

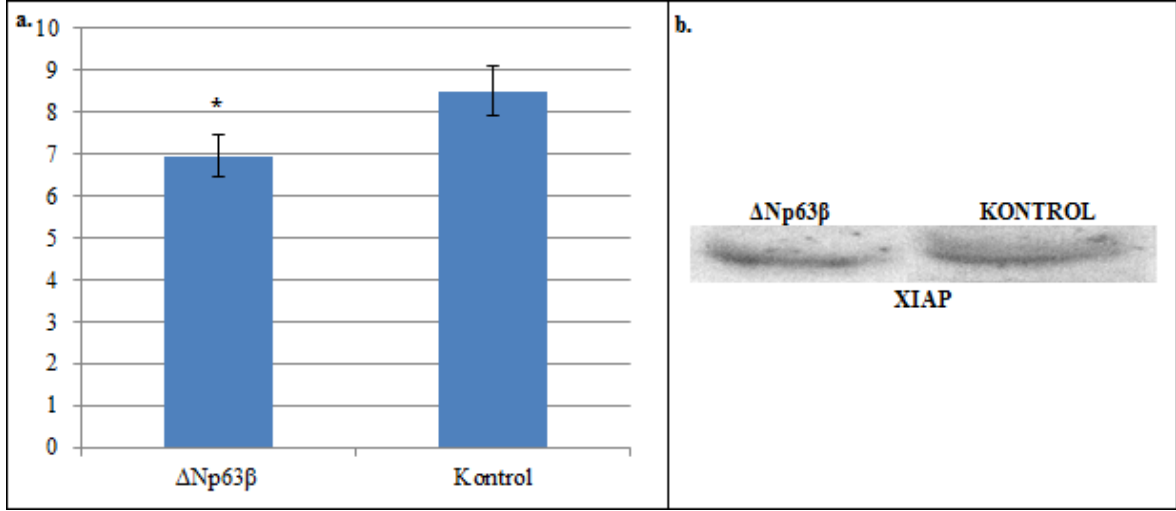
a. Deneyle 3 kez tekrarlanan CIAP1 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. CIAP1 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\* $p < 0,01$ )



**Şekil 5. 43.**  $\Delta$ Np63 $\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra CIAP2 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi



a. Deneyle 3 kez tekrarlanan CIAP2 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. CIAP2 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\*p < 0,01)

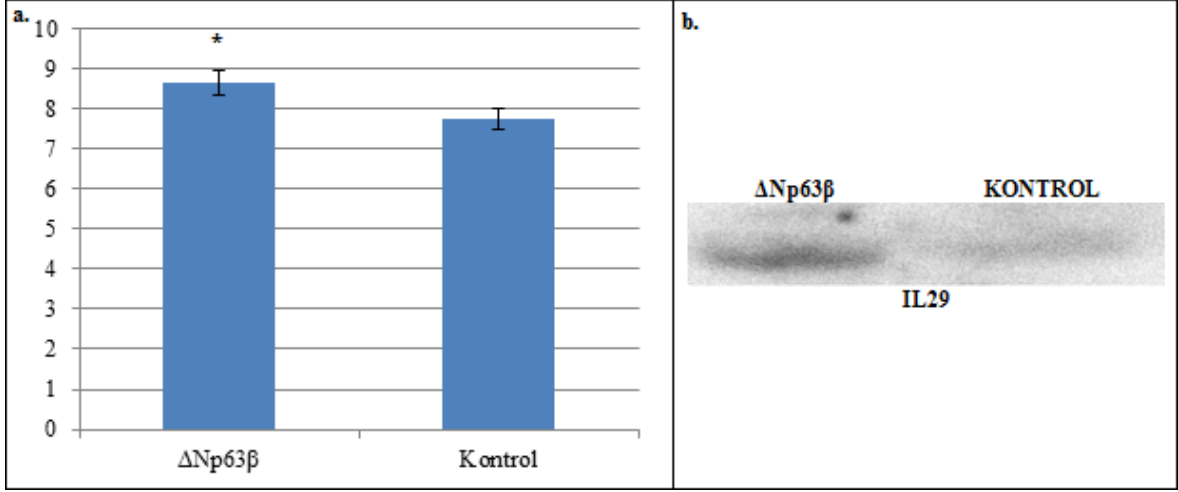


**Şekil 5. 44.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra XIAP proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan XIAP protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. XIAP proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\* p > 0,05)

### 5.9.3. P53 ile ilişkili INF hedef proteinlerinin ifade düzeylerinin analizi

INF'lar tarafından regüle edilen ve p53 fonksiyonları ile ilişkili genlerden bir tanesi olan IL29'un protein ifadesinde yaklaşık % 20 oranında bir artış görülmektedir (Şekil 5.45).



**Şekil 5. 45.**  $\Delta Np63\beta$  ifade eden T98G glioma hücrelerinin doksasiklin ile uyarımından 72 saat sonra IL29 proteininin ifade düzeylerinin gösterimi

a. Deneyle 3 kez tekrarlanan IL29 protein ifade düzeyinin  $\pm$  standart sapmaları ile  $\beta$  aktin protein ifade seviyesine göre farklılığın grafik ile gösterimi b. IL29 proteininin ifade düzeyinin western blot ile gösterimi (\* $p > 0,01$ )

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

P63'ün keşfinden sonra, p63'ün p53 ile aynı özelliklere sahip bir protein olduğu düşünülmüş ancak yapılan çalışmalarda birçok izoforma sahip olan p63'ün, izoformları arasında bile farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Bu izoformların birbirinden farklı ve birbirlerine zıt fonksiyonlar göstermesi p63 genini ilginç hale getirmektedir. Bu tezde bu izoformlardan  $\Delta p63\beta$ 'ın T98G hücreleri üzerindeki fenotipik ve genotipik etkisi incelenmiştir.

Tümör baskılayıcı protein olan p53 hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozisde kritik rol oynamaktadır. P53 ailesi üyeleri tarafından kontrol edilen moleküler yolların bilinmesine rağmen fizyolojik etki mekanizmalarının açıklanması için ek çalışmalar devam etmekte olup, yapılan çalışmalar sonucunda, p63'ün hücre döngüsü kontrolü üzerine etkisinin p53 ile benzer olduğu gösterilmiştir (2). Memeli hücre döngüsünün önemli kontrol mekanizmalarından olan siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21 ( $p21^{WAF1/Cip1}$ ) hücre döngüsünün durdurulmasını stimüle eder. Transkripsiyonel aktivasyonu p53 tarafından kontrol edilen p21, hücre döngüsünün G1 fazında düzenlenmektedir. Dolayısıyla p21'in hücre döngüsünü inhibe edebilmesi p53'e bağlıdır, normalde MDM2'ye bağlı durumda ve inaktif olan p53 aktive olduktan sonra p21 ifadesini tetikler (60). TAp63, p21'in ve p57/Kip2 proteinlerinin transkripsiyonel artışıyla hücre döngüsünün durdurulmasını indüklediği ve  $\Delta N$  izoformlarının ise bu promotörleri baskılayarak hücre döngüsünün devamını desteklediği belirtilmektedir (2). Ancak yaptığımız çalışmada bu bildirim aksine,  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde, p21'in mRNA (Şekil 5.14.) ve protein düzeylerindeki artışı (Şekil 5.39.) dramatik olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca,  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde,  $\Delta p63\beta$  ifade etmeyen hücrelere oranla % 50'lere varan hücre ölümleri, p21'in artışı ile hücrenin G1 fazında durmasına ve hücre replikasyonunun da tamamlanamamasına neden olabileceğini akıllara getirmektedir. Aynı şekilde hücre döngüsünün G1 fazında rol oynayan ve kritik öneme sahip siklin D1,  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde artış göstermektedir (Şekil 5.15.). Siklin D1'in birçok kanser türünde de artış gösterdiği saptanmıştır (61, 62).  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerdeki % 50'lere varan azalma  $\Delta p63\beta$ 'nın hücre siklüsü inhibisyonu ve apoptozis etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

P63'ün p53 ile benzer yapısal özelliklerinin yanında p53 gibi DNA hasarının algılanmasında da etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada p63'ün apoptozisi indüklediği ve hücrede DNA hasarının giderilmesinde rol aldığı gözlenmiştir. Özellikle TAp63 $\gamma$  izoformu p53'e oldukça benzer özelliktedir ve p53 hedef genlerinin en güçlü aktivatörüdür. Alfa izoformlarında bulunan inhibitör domainin olmaması, trasaktivatör domainini bulunduran bu izoformun apoptozisin indüklenmesinde diğerlerine oranla daha fazla potansiyel oluşturmaktadır (31). Onkojenik özellikte olduğu düşünülen  $\Delta$ p63 $\beta$  izoformunu ifade eden hücrelerde apoptozis etkisini araştırmak için yaptığımız çalışmada hücredeki kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitesi ölçümüne dayanan apoptozis testinde  $\Delta$ p63 $\beta$  izoformunu ifade eden hücrelerde herhangi bir değişiklik görünmemektedir (Şekil 5.11.). Ayrıca apoptoz düzenlemede görevli Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik BAX, BAD, BİD ve anti apoptotik BCLXL (63) gen ifadelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlarda BAX, BİD, BAD ifade düzeylerinde değişiklik gözlenmezken (Şekil 5.26-5.28.) BCLXL ifade düzeyinde artış göze çarpmaktadır (Şekil 5.25.). Bu da bize  $\Delta$ p63 $\beta$  izoformunun apoptozisi tetiklemesinin aksine apoptozisin inhibisyonu üzerine etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Apoptozis ile ilgili çıkan sonuçlara bakılarak  $\Delta$ p63 $\beta$  izoformunun apoptozis inhibisyonuna neden olduğunu göstermek için apoptozis inhibitör proteinlerine bakılmıştır. Apoptozis proteinlerinin inhibitör ailesinin (IAPs) kritik öneme sahip üyelerinden apoptozis proteinlerinin hücrel inhibitörü olan cIAP1 ve cIAP2, hem hücre içi hem de hücre dışı ölüm sinyalini azaltma özelliğine sahiptirler (64, 65).  $\Delta$ p63 $\beta$  ifade eden hücrelerde cIAP1 ve cIAP2 hem mRNA düzeyinde (Şekil 5.29, Şekil.5.30.) hem de protein düzeyinde artış göstermektedir (Şekil 5.42., Şekil 5.43.). Yapılan bu deneyler sonucunda  $\Delta$ p63 $\beta$  izoformunun anti apoptotik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan MTT ve LDH testi sonuçlarına bakılarak (Şekil 5.9., Şekil 5.10.) anti apoptotik özellikte olan  $\Delta$ p63 $\beta$  izoformunun, bu izoformu ifade eden hücrelerde gerçekleşen hücre ölümünün  $\Delta$ p63 $\beta$ 'nin sitotoksik etkisinden kaynaklandığını göstermektedir.

TAp63, hücre ölümü ve hücre döngüsünün durdurulması ile tümör supresör özellikteyken,  $\Delta$ Np63 onkojenik özellik göstermekte ve  $\Delta$ Np63'ün birçok kanser olgularında aşırı

salgılandığı bildirilmiştir (6). Yaptığımız çalışmada  $\Delta p63\beta$ 'yi ifade eden hücrelerde, IGF2 (insülin benzeri büyüme faktörü) miktarındaki transkripsiyonel artış (Şekil 5.28.) p13K/AKT yolağının uyarıldığını düşündürmektedir. Bunun üzerine p13K ve AKT ifade düzeyleri incelenmiştir. Kanser hücresi dahil hücre gelişimi, proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi gibi hücre fonksiyonları kapsayan ve birçok görevde rol oynayan enzim ailesinden p13K'nın,  $\Delta p63\alpha$  ifadesini regüle ettiği bildirilmiştir. P13K aktivasyonu ile  $\Delta p63\alpha$ 'nın ifadesinin arttığı gözlenmiştir (66). p13K yolağının özellikle diabet ve kanserde etkin olduğu bilinmektedir (67). Bu çalışmada ise  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde p13K'nın mRNA düzeyindeki ifadesinde farklılık göze çarpmamaktadır (Şekil 5.16.). Hücrenin proliferasyonu, canlılığı, gelişimi ve anjiyogenez gibi hücre metabolizmasının çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesinde rol alan ve kanser hücrelerinde, hücre proliferasyonu ve canlılığının devamını sağlayan önemli proteinlerden biri olan AKT (68),  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde hem mRNA düzeyinde (Şekil 5.17.), hem de fosforile olmuş AKT proteini düzeyinde artış göstermektedir (Şekil 5.40, Şekil 5.41.). Aynı şekilde,  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde, büyüme faktörlerinden olan ve embriyogenezde ve hücre farklılaşmasında rol oynayan aynı zamanda tümör oluşumunda da etkili *TGF- $\beta$ 3* (69) gen ifadesindeki artış, hücre proliferasyonu, gelişimi ve farklılaşmasını aktive eden ve birçok kanser tipiyle ilişkili olan epidermal büyüme faktörü reseptörü *TGF $\alpha$*  gen ifadesindeki artış (Şekil 5.18.), onkojenik özellikte olan AKT1'in % 30 oranındaki artışı,  $\Delta p63\beta$  izoformunun onkojenik özellikte olduğunu destekler nitelikte olsa da  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde şekillenen hücre ölümlerinden dolayı bu proteinin onkojenik özelliği hala tartışmaya açıktır.

Midkin, hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve migrasyonu gibi birçok hücre fonksiyonunun kontrol mekanizmasında görevli bir heparin bağlayıcı büyüme faktörüdür. Bu büyüme faktörü aktiviteleri dışında midkin, kan basıncı ve savunma sistemiyle ilgili diğer süreçlerde de görev almaktadır. Birçok karsinomada midkin ifadesinin arttığı, ayrıca midkinin susturulmasıyla da tümörün oluşumunun ve gelişiminin baskılandığı bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı midkin bir tümör marker olarak ve kanser tedavisinde moleküler hedef protein olarak düşünülmektedir (70-72). Midkinin  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde mRNA düzeyindeki artışı (Şekil 5.20.) bu izoformun onkojen olduğunu destekleyen özelliklerinden bir tanesidir.

Birçok virüsün özellikle de RNA virüslerinin hücre içerisinde replikasyonları sırasında ortaya çıkan çift sarmal RNA'lar, immün sistemde görevli birçok sitokinin gerek ifadelerinin artmasına, gerekse aktive olmalarına neden olmaktadır. Bu kompleks yapı memeli hücrelerinin kendisini yabancı saldırganlara karşı korumak için geliştirdiği bir dizi koruyucu mekanizmadır. Humoral immünite birçok enfeksiyonda rol oynadığı gibi enfeksiyonun sonlanmasında da önemlidir. Bu immüntenin ortaya çıkması için belirli bir süre gerekmektedir. Buna karşın tek hücre yabancı saldırganlara karşı hızlı olarak koruyucu mekanizmaları ortaya çıkarma ihtiyacı içindedir (73). Hücre bu amaçla interferonlar ve sitokinleri kullanmaktadır. Küçük DNA tümör virüsü olarak bilinen simian 40 (SV40) t ve T ('küçük t' ve 'büyük T') antijenleri olarak adlandırılan iki polipeptit kodlar ve büyük T antijeni spesifik hücre proteinleriyle oligometrik bir kompleks oluşturmaktadır (74). SV40 büyük T antijeninin hücre proteinleriyle etkileşiminin mümkün olduğunun keşfedilmesinden bu yana DNA tümör virüslerinden viral onkoproteinlerin p53 proteiniyle bağlantısı çalışılmaktadır. Evrimden bu yana DNA tümör virüsleri, p53 fonksiyonunu ortadan kaldırmak üzere tasarlanmış mekanizmalar geliştirmiş olduğu ortaya konmuştur. SV40 T antijenlerinin yanı sıra HPV E6, adenovirus E1B-55K, hepatitis B virüs HBX, T hücreli lenfoma virüs tip 1 Tax, Epstein-Barr virüs Zta, Kaposi sarkomuyla ilişkili herpes virüs LANA1, k-bZIP ve LANA2 proteinlerinin p53'ü inhibe ederek oluşacak yanıtı bloke ettikleri bildirilmiştir (75). Ayrıca, p53 promotöründe interferonlar (IFN) tarafından uyarılmasını sağlayan elementlerin varlığı gösterilmiştir. IFN'ler birçok hücrede viral enfeksiyonları takiben ortaya çıkmaktadır. Hücrede artış gösteren IFN'ler p53'ün de hücre içinde artışına neden olmakta ve bundan dolayı p53'ün hücrenin antiviral defansında rol aldığı düşünülmektedir (76). IL28B, IL28A, IL29, CCL5, IFI27, OAS1,2,3, PKR ve MX gibi moleküller, antiviral etkileri olan proteinler olarak bilinmektedirler (76-78). P53 fonksiyonları ile ilgili olarak yeni sayılabilecek bu bakış açısını  $\Delta p63\beta$  izoformunun ne ölçüde sağladığı bu çalışmanın diğer bir araştırma konusunu oluşturmaktadır. Bu amaçla temelde IFN'ler tarafından regüle edilen genler olarak adlandırılan bu genlerden bazılarının ifade analizleri yapılmıştır. MX geni balıktan primatlara kadar neredeyse tüm omurgalılarda bulunmakta ve RNA virüslere karşı etki göstermektedir (79, 80). Her virüste aynı mekanizmayla mı çalıştığı açık değildir ancak genel olarak, MX proteini nükleoproteinleri veya kapsid proteinlerini inhibe ederek etki etmektedir (81).  $\Delta p63\beta$  ifade eden hücrelerde yaptığımız çalışmada mRNA düzeyinde MX1 ve MX2 (Şekil 5.32., Şekil 5.33.) ve daha geniş antiviral etkiye sahip OASL ifadelerindeki artış (Şekil 5.34.) ve yine bir interferon olan IL29'un protein düzeyindeki

artış (Şekil 5.45.)  $\Delta p63\beta$  izoformunun IFN tarafından regüle edilen genler üzerinde P53 benzeri bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1 Yao JY, Chen JK. Roles of p63 in epidermal development and tumorigenesis. *Biomedical journal*. 2012 Nov-Dec;**35**(6):457-63.
- 2 Allocati N, Di Ilio C, De Laurenzi V. p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Exp Cell Res*. 2012 Jul 1;**318**(11):1285-90.
- 3 Duffy MJ, Synnott NC, McGowan PM, Crown J, O'Connor D, Gallagher WM. p53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer Treat Rev*. 2014 Oct 22;**40**(10):1153-60.
- 4 Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Cellular & molecular biology letters*. 2011 Jun;**16**(2):296-327.
- 5 Barbieri CE, Pietenpol JA. p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res*. 2006 Apr 1;**312**(6):695-706.
- 6 Melino G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. *Cell Death Differ*. 2011 Sep;**18**(9):1487-99.
- 7 Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell*. 1998 Sep;**2**(3):305-16.
- 8 Li C, Xiao ZX. Regulation of p63 protein stability via ubiquitin-proteasome pathway. *Biomed Res Int*. 2014;**2014**:175721.
- 9 Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Dec;**1**(3):199-207.
- 10 Koster MI, Roop DR. p63 and epithelial appendage development. *Differentiation*. 2004 Oct;**72**(8):364-70.
- 11 Barbieri CE, Pietenpol JA. p53 family members: similar biochemistry, different biology. *Cancer biology & therapy*. 2005 Apr;**4**(4):419-20.
- 12 Mangiulli M, Valletti A, Caratozzolo MF, et al. Identification and functional characterization of two new transcriptional variants of the human p63 gene. *Nucleic acids research*. 2009 Oct;**37**(18):6092-104.
- 13 Serber Z, Lai HC, Yang A, et al. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol Cell Biol*. 2002 Dec;**22**(24):8601-11.
- 14 Thanos CD, Bowie JU. p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci*. 1999 Aug;**8**(8):1708-10.



- 15 Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;**13**(6):962-72.
- 16 Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Molecular cancer research : MCR.* 2004 Jul;**2**(7):371-86.
- 17 Koster MI, Dai D, Roop DR. Conflicting roles for p63 in skin development and carcinogenesis. *Cell Cycle.* 2007 Feb 1;**6**(3):269-73.
- 18 King KE, Weinberg WC. p63: defining roles in morphogenesis, homeostasis, and neoplasia of the epidermis. *Mol Carcinog.* 2007 Aug;**46**(8):716-24.
- 19 Senoo M, Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell.* 2007 May 4;**129**(3):523-36.
- 20 Koster MI, Dai D, Marinari B, et al. p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007 Feb 27;**104**(9):3255-60.
- 21 Sen T, Chang X, Sidransky D, Chatterjee A. Regulation of DeltaNp63alpha by NFkappaBeta. *Cell Cycle.* 2010 Dec 15;**9**(24):4841-7.
- 22 Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, et al. Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet.* 2002 Aug;**39**(8):559-66.
- 23 Brunner HG, Hamel BC, Bokhoven Hv H. P63 gene mutations and human developmental syndromes. *Am J Med Genet.* 2002 Oct 15;**112**(3):284-90.
- 24 van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, et al. p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.* 2001 Sep;**69**(3):481-92.
- 25 Beaudry VG, Attardi LD. SKP-ing TAp63: stem cell depletion, senescence, and premature aging. *Cell Stem Cell.* 2009 Jul 2;**5**(1):1-2.
- 26 Mikkola ML. p63 in skin appendage development. *Cell Cycle.* 2007 Feb 1;**6**(3):285-90.
- 27 Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R, Khavari PA. p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes Dev.* 2006 Nov 15;**20**(22):3185-97.
- 28 Koster MI, Roop DR. Transgenic mouse models provide new insights into the role of p63 in epidermal development. *Cell Cycle.* 2004 Apr;**3**(4):411-3.
- 29 Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, et al. DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Res.* 2010 May 15;**70**(10):4034-44.

- 30 Wu G, Nomoto S, Hoque MO, et al. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res.* 2003 May 15;**63**(10):2351-7.
- 31 Flores ER. The roles of p63 in cancer. *Cell Cycle.* 2007 Feb 1;**6**(3):300-4.
- 32 Su X, Chakravarti D, Flores ER. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013 Feb;**13**(2):136-43.
- 33 Candi E, Agostini M, Melino G, Bernassola F. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat.* 2014 Jun;**35**(6):702-14.
- 34 Tomkova K, Tomka M, Zajac V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma.* 2008;**55**(3):177-81.
- 35 Carroll DK, Carroll JS, Leong CO, et al. p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006 Jun;**8**(6):551-61.
- 36 Osada M, Ohba M, Kawahara C, et al. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med.* 1998 Jul;**4**(7):839-43.
- 37 Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene.* 2001 May 31;**20**(25):3193-205.
- 38 Cheng W, Jacobs WB, Zhang JJ, et al. DeltaNp63 plays an anti-apoptotic role in ventral bladder development. *Development.* 2006 Dec;**133**(23):4783-92.
- 39 Gressner O, Schilling T, Lorenz K, et al. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. *EMBO J.* 2005 Jul 6;**24**(13):2458-71.
- 40 Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 2004 Jan 15;**18**(2):126-31.
- 41 Mao A, Liu Y, Zhang H, Di C, Sun C. microRNA expression and biogenesis in cellular response to ionizing radiation. *DNA Cell Biol.* 2014 Oct;**33**(10):667-79.
- 42 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;**136**(2):215-33.
- 43 Boominathan L. The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Dec;**29**(4):613-39.
- 44 Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, et al. miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* 2008 Jul;**15**(7):1187-95.
- 45 Candi E, Amelio I, Agostini M, Melino G. MicroRNAs and p63 in epithelial stemness. *Cell Death Differ.* 2015 Jan;**22**(1):12-21.

- 46 Tran MN, Choi W, Wszolek MF, et al. The p63 protein isoform DeltaNp63alpha inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder cancer cells: role of MIR-205. *J Biol Chem*. 2013 Feb 1;**288**(5):3275-88.
- 47 Su X, Chakravarti D, Cho MS, et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature*. 2010 Oct 21;**467**(7318):986-90.
- 48 Huang Y, Kesselman D, Kizub D, Guerrero-Preston R, Ratovitski EA. Phospho-DeltaNp63alpha/microRNA feedback regulation in squamous carcinoma cells upon cisplatin exposure. *Cell Cycle*. 2013 Feb 15;**12**(4):684-97.
- 49 Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;**4**(10):793-805.
- 50 Westfall MD, Joyner AS, Barbieri CE, Livingstone M, Pietenpol JA. Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha. *Cell Cycle*. 2005 May;**4**(5):710-6.
- 51 van Bokhoven H, Brunner HG. Splitting p63. *Am J Hum Genet*. 2002 Jul;**71**(1):1-13.
- 52 Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, Knight RA. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci*. 2003 Dec;**28**(12):663-70.
- 53 Candi E, Dinsdale D, Rufini A, et al. TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle*. 2007 Feb 1;**6**(3):274-85.
- 54 Dotsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010 Sep;**2**(9):a004887.
- 55 Orzol P, Holcakova J, Nekulova M, Nenutil R, Vojtesek B, Coates PJ. The diverse oncogenic and tumour suppressor roles of p63 and p73 in cancer: a review by cancer site. *Histol Histopathol*. 2014 Dec 16.
- 56 Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 2007 Aug 9;**26**(36):5169-83.
- 57 Ivan D, Hafeez Diwan A, Prieto VG. Expression of p63 in primary cutaneous adnexal neoplasms and adenocarcinoma metastatic to the skin. *Mod Pathol*. 2005 Jan;**18**(1):137-42.
- 58 Wang X, Mori I, Tang W, et al. p63 expression in normal, hyperplastic and malignant breast tissues. *Breast Cancer*. 2002;**9**(3):216-9.
- 59 Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD, Pietenpol JA. Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2004 Dec;**114**(12):2063-72.
- 60 Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;**9**(6):400-14.

- 61 Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Aug;**11**(8):558-72.
- 62 Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol*. 2013 Jul;**183**(1):3-9.
- 63 Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. 2006 Aug;**13**(8):1351-9.
- 64 Graber TE, Holcik M. Distinct roles for the cellular inhibitors of apoptosis proteins 1 and 2. *Cell Death Dis*. 2011;**2**:e135.
- 65 Labbe K, McIntire CR, Doiron K, Leblanc PM, Saleh M. Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. *Immunity*. 2011 Dec 23;**35**(6):897-907.
- 66 Barbieri CE, Barton CE, Pietenpol JA. Delta Np63 alpha expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;**278**(51):51408-14.
- 67 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;**2**(7):489-501.
- 68 Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R. AKT kinase pathway: a leading target in cancer research. *ScientificWorldJournal*. 2013;**2013**:756134.
- 69 Lavery HG, Wakefield LM, Occleston NL, O'Kane S, Ferguson MW. TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Aug;**20**(4):305-17.
- 70 Jones DR. Measuring midkine: the utility of midkine as a biomarker in cancer and other diseases. *Br J Pharmacol*. 2014 Jun;**171**(12):2925-39.
- 71 Jono H, Ando Y. Midkine: a novel prognostic biomarker for cancer. *Cancers (Basel)*. 2010;**2**(2):624-41.
- 72 Sakamoto K, Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathol Int*. 2012 Jul;**62**(7):445-55.
- 73 Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010 Jan 15;**327**(5963):291-5.
- 74 Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979 Mar 15;**278**(5701):261-3.
- 75 Munoz-Fontela C, Garcia MA, Collado M, et al. Control of virus infection by tumour suppressors. *Carcinogenesis*. 2007 Jun;**28**(6):1140-4.
- 76 Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003 Jul 31;**424**(6948):516-23.

- 77 Sato Y, Tsurumi T. Genome guardian p53 and viral infections. *Rev Med Virol*. 2013 Jul;**23**(4):213-20.
- 78 Soria C, Estermann FE, Espantman KC, O'Shea CC. Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. *Nature*. 2010 Aug 26;**466**(7310):1076-81.
- 79 Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*. 2007 Jun-Jul;**89**(6-7):812-8.
- 80 Haller O, Kochs G, Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Oct-Dec;**18**(5-6):425-33.
- 81 Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2013 Dec;**77**(4):551-66.

## EKLER

### EK1: *ΔNp63β* transkript ürününün dizisi

AGAGAGAGAAAGAGAGAGAGGGACTTGAGTTCTGTTATCTTCTTAAGTAGATTCATAT  
TGTAAGGGTCTCGGGGTGGGGGGGTTGGCAAATCCTGGAGCCAGAAGAAAGGACAG  
CAGCATTGATCAATCTTACAGCTAACATGTTGTACCTGGAAAACAATGCCCAGACTCA  
ATTTAGTGAGCCACAGTACACGAACCTGGGGCTCCTGAACAGCATGGACCAGCAGATT  
CAGAACGGCTCCTCGTCCACCAGTCCCTATAACACAGACCACGCGCAGAACAGCGTCA  
CGGCGCCCTCGCCCTACGCACAGCCCAGTCCACCTTCGATGCTCTCTCTCCATCACCC  
GCCATCCCCTCCAACACCGACTACCCAGGCCCGCACAGTTTCGACGTGTCCTTCCAGC  
AGTCGAGCACCGCCAAGTCGGCCACCTGGACGTATTCCACTGAACTGAAGAACTCTA  
CTGCCAAATTGCAAAGACATGCCCCATCCAGATCAAGGTGATGACCCACCTCCTCAG  
GGAGCTGTTATCCGCGCCATGCCTGTCTACAAAAAGCTGAGCACGTCACGGAGGTGG  
TGAAGCGGTGCCCAACCATGAGCTGAGCCGTGAATTCAACGAGGGACAGATTGCC  
CTCCTAGTCATTTGATTTCGAGTAGAGGGGAACAGCCATGCCCAGTATGTAGAAGATCC  
CATCACAGGAAGACAGAGTGTGCTGGTACCTTATGAGCCACCCAGGTTGGCACTGAA  
TTCACGACAGTCTTGTACAATTTTCATGTGTAACAGCAGTTGTGTTGGAGGGATGAACC  
GCCGTCCAATTTTAATCATTGTTACTCTGGAAACCAGAGATGGGCAAGTCTGGGCCG  
ACGCTGCTTTGAGGCCCGGATCTGTGCTTGCCAGGAAGAGACAGGAAGGCGGATGA  
AGATAGCATCAGAAAGCAGCAAGTTTCGGACAGTACAAAGAACGGTGATGGTACGAA  
GCGCCCGTTTCGTGAGAACACACATGGTATCCAGATGACATCCATCAAGAAACGAAGA  
TCCCCAGATGATGAACTGTTATACTTACCAGTGAGGGGCCGTGAGACTTATGAAATGC  
TGTTGAAGATCAAAGAGTCCCTGGAACATGCAGTACCTTCCTCAGCACACAATTGA  
AACGTACAGGCAACAGCAACAGCAGCAGCACCAGCACTTACTTCAGAAACAGACCTC  
AATACAGTCTCCATCTTCATATGGTAACAGCTCCCCACCTCTGAACAAAATGAACAGC  
ATGAACAAGCTGCCTTCTGTGAGCCAGCTTATCAACCCTCAGCAGCGCAACGCCCTCA  
CTCCTACAACCATTCCCTGATGGCATGGGAGCCAACATTCCCATGATGGGCACCCACAT  
GCCAATGGCTGGAGACATGAATGGACTCAGCCCCACCCAGGCACTCCCTCCCCACTC  
TCCATGCCATCCACCTCCCACTGCACACCCCCACCTCCGTATCCCACAGATTGCAGCAT  
TGTCAGGATCTGGCAAGTCTGAAAATCCCTGAGCAATTTTCGACATGCGATCTGGAAGG  
GCATCCTGGACCACCGGCAGCTCCACGAATTCTCCTCCCCTTCTCATCTCCTGCGGACC  
CCAAGCAGTGCCTCTACAGTCAGTGTGGGCTCCAGTGAGACCCGGGGTGAGCGTGTTA  
TTGATGCTGTGCGATTACCCCTCCGCCAGACCATCTCTTTCCACCCCGAGATGAGTGG  
AATGACTTCAACTTTGACATGGATGCTCGCCGCAATAAGCAACAGCGCATCAAAGAGG  
AGGGGGAGTGAGCCTCACCATGTGAGCTCTTCCTATCCCTCTCCTAACTGCCAGCCCC  
TAAAAGCACTCCTGCTTAATCTTCAAAGCCTTCTCCCTAGCTCCTCCCCTTCTCTTGTC  
TGATTTCTTAGGGGAAGGAGAAGTAAGAGGCTACCTCTTACCTAACATCTGACCTGGC  
ATCTAATTCTGATTCTGGCTTTAAGCCTTCAAACTATAGCTTGCAGAACTGTAGCTGC  
CATGGCTAGGTAGAAGTGAGCAAAAAAGAGTTGGGTGTCTCCTTAAGCTGCAGAGATT

TCTCATTGACTTTTATAAAGCATGTTACCCCTTATAGTCTAAGACTATATATATAAATG  
TATAAATATACAGTATAGATTTTTGGGTGGGGGCATTGAGTATTGTTTAAAATGTAAT  
TTAAATGAAAGAAAATTGAGTTGCACTTATTGACCATTTTTTAATTTACTTGTTTTGA  
TGGCTTGTCTATACTCCTCCCTTAAGGGGTATCATGTATGGTGATAGGTATCTAGAGC  
TTAATGCTACATGTGAGTGACGATGATGTACAGATTCTTTTCAGTTCTTTGGATTCTAAA  
TACATGCCACATCAAACCTTTGAGTAGATCCATTTCCATTGCTTATTATGTAGGTAAGA  
CTGTAGATATGTATTCTTTTCTCAGTGTGGTATATTTTATATTACTGACATTTCTTCTA  
GTGATGATGGTTCACGTTGGGGTGATTTAATCCAGTTATAAGAAGAAGTTCATGTCCA  
AACGTCCTCTTTAGTTTTTGGTTGGGAATGAGGAAAATTCTTAAAAGGCCCATAGCAG  
CCAGTTCAAAAACACCCGACGTCATGATTTGAGCATATCAGTAACCCCTTAAATTT  
AATACCAGATACCTTATCTTACAATATTGATTGGGAAAACATTTGCTGCCATTACAGA  
GGTATTAAACTAAATTTCACTACTAGATTGACTAACTCAAATACACATTTGCTACTGT  
TGTAAGAATTCTGATTGATTTGATTGGGATGAATGCCATCTATCTAGTTCTAACAGTGA  
AGTTTTACTGTCTATTAATATTCAGGGTAAATAGGAATCATTAGAAATGTTGAGTCTG  
TACTAAACAGTAAGATATCTCAATGAACCATAAATTCAACTTTGTAAAAATCTTTTGA  
AGCATAGATAATATTGTTTGGTAAATGTTTCTTTTGTGGTAAATGTTTCTTTTAAAGA  
CCCTCCTATTCTATAAACTCTGCATGTAGAGGCTTGTTTACCTTTCTCTCTAAGGTT  
TACAATAGGAGTGGTGATTTGAAAAATATAAAATTATGAGATTGGTTTTCTGTGGCA  
TAAATTGCATCACTGTATCATTTTCTTTTTTAACCGTAAGAGTTTCAGTTTGTGGAA  
AGTAACTGTGAGAACCAGTTTCCCGTCCATCTCCCTTAGGGACTACCCATAGACATG  
AAAGGTCCCCACAGAGCAAGAGATAAGTCTTTCATGGCTGCTGTTGCTTAAACCACTT  
AAACGAAGAGTTCCTTGAAACTTTGGGAAAACATGTTAATGACAATATTCCAGATCT  
TTCAGAAATATAACACATTTTTTTGCATGCATGCAAATGAGCTCTGAAATCTTCCCATG  
CATTCTGGTCAAGGGCTGTCATTGCACATAAGCTTCCATTTTAATTTTAAAGTGCAAAA  
GGGCCAGCGTGGCTCTAAAAGGTAATGTGTGGATTGCCTCTGAAAAGTGTGTATATAT  
TTTGTGTGAAATTGCATACTTTGTATTTTGATTATTTTTTTTTTCTTCTTGGGATAGTGG  
GATTTCCAGAACCACACTTGAAACCTTTTTTTATCGTTTTTTGTATTTTCATGAAAATACC  
ATTTAGTAAGAATACCACATCAAATAAGAAATAATGCTACAATTTTAAAGAGGGGAGG  
GAAGGGAAAGTTTTTTTTTATTATTTTTTTAAAATTTTGTATGTTAAAGAGAATGAGTC  
CTTGATTTCAAAGTTTTGTTGTACTTAAATGGTAATAAGCACTGTAAACTTCTGCAACA  
AGCATGCAGCTTTGCAAACCCATTAAGGGGAAGAATGAAAGCTGTTCCCTGGTCCCTAG  
TAAGAAGACAAACTGCTTCCCTTACTTTGCTGAGGGTTTGAATAAACCTAGGACTTCC  
GAGCTATGTCAGTACTATTCAGGTAACACTAGGGCCTTGGAAATTCCTGTACTGTGTCT  
CATGGATTTGGCACTAGCCAAAGCGAGGCACCCTTACTGGCTTACCTCCTCATGGCAG  
CCTACTCTCCTTGAGTGTATGAGTAGCCAGGGTAAGGGGTAAAAGGATAGTAAGCATA  
GAAACCACTAGAAAGTGGGCTTAATGGAGTTCTTGTGGCCTCAGCTCAATGCAGTTAG  
CTGAAGAATTGAAAAGTTTTTGTTTGGAGACGTTTATAAACAGAAATGGAAAGCAGAG  
TTTTCATTAATCCTTTTACCTTTTTTTTTTCTTGGTAATCCCCTAAAATAACAGTATGT  
GGGATATTGAATGTTAAAGGGATATTTTTTTCTATTATTTTTATAATTGTACAAAATTA  
AGCAAATGTTAAAAGTTTTATATGCTTTATTAATGTTTTTCAAAGGTATTATACATGTG  
ATACATTTTTTAAAGCTTTCAGTTGCTTGTCTTCTGGTACTTTCTGTTATGGGCTTTTGGGG  
AGCCAGAAGCCAATCTACAATCTTTTTTGTGGCCAGGACATGCAATAAAATTTAAA  
AAATAAATAAAAATAAATAAAGAAATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Buse TÜREGÜN ATASOY

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 20.08.1984

**Medeni Hali:** Evli

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** Çankaya 50. Yıl Lisesi, Ankara, 1998-2002

**Lisans:** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, 2002-2007

### **İş Tecrübesi**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Araştırma Asistanı, Eylül 2007 - Haziran 2008.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Araştırma Asistanı, Eylül 2008 - devam ediyor.

### **Projeler**

HBV ve HCV tedavisinde p63 proteinin etkisinin araştırılması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (proje no: 109S446), Araştırmacı, 2010-2013

P73 Proteininin HSV1 Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması, Ankara Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Koordinatörlüğü (BAP) (proje no: 12B33300159), Araştırma Uzmanı, 2013-devam ediyor.



**Yayınlar:****SCI'da Yer Alan Makaleler:**

1. Identification of Malassezia Species from Pityriasis Versicolor Lesions with a New Multiplex PCR Method, Mycopathologia (2014) 177:41–49
2. HHV-6 is ubiquitously found using Western blotin tonsils and adenoid tissues of healthy people, New Microbiologica, (2013), 36: 251-256,
3. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates and reference strains, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (2013) 76: 291–297
4. Beş Yaş Altı Çocuklarda Gastroenterite Neden Olan Yedi Farklı RNA Virusunun Araştırılması, Mikrobiyoloji Bülteni (2014) 48(2): 233-241

**Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

Western Blot; An Alternative to The Plaque Reduction Assay For İn Vitro Determination of HSV Susceptibility to Acyclovir, '25th ECCMID Copenhagen 25-28 April 2015' kongrede poster olarak sunulmak üzere kabul edilmiştir.

## YAYINLAR

1. Çalgın M.K, Şahin F, Türegün B, Gerçek D, Atasever M, Köksal D, Karasartova D, Kıyan M. Expression analysis of efflux pump genes among drug-susceptible and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates and reference strains, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (2013) 76: 291–297
2. Taşpınar M, Çetin N, Gerçek D, Karasartova D, Türegün D, Öztürk S, Şahin F. HHV-6 is ubiquitously found using Western blot in tonsils and adenoid tissues of healthy people, *New Microbiologica*, (2013), 36: 251-256,
3. Vuran E, Karaarslan A, Karasartova D, Türegün B, Şahin F. Identification of *Malassezia* Species from Pityriasis Versicolor Lesions with a New Multiplex PCR Method, *Mycopathologia* (2014) 177:41–49
4. Akhter S, Türegün B, Kıyan M, Gerçek D, Güriz H, Şahin F. Beş Yaş Altı Çocuklarda Gastroenterite Neden Olan Yedi Farklı RNA Virusunun Araştırılması, *Mikrobiyoloji Bülteni* (2014) 48(2): 233-241
5. Atasoy Türegün B, Akhter S, Yari Bostanabad S, Şahin F. Western Blot; An Alternative to The Plaque Reduction Assay For In Vitro Determination of HSV Susceptibility to Acyclovir, '25th ECCMID Copenhagen 25-28 April 2015' kongrede poster olarak sunulmak üzere kabul edilmiştir.