

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GEN SUSTURULMASINDA PLAZMİT-siRNA İLE LENTİVİRÜS-siRNA TEMELLİ
SİSTEMLERİN ETKİNLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Semih Zafer YILMAZ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Fikret ŞAHİN

2010 – ANKARA

Doç. Dr. Fikret ŞAHİN danışmanlığında Semih Zafer YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 29/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Anabilimdalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Fikret ŞAHİN

Üye : Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Üye : Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Enstitü Müdürü

Gen Susturulmasında Plazmit-siRNA ile Lentivirüs-siRNA Temelli Sistemlerin Etkinliklerinin Karşılaştırılması

ÖZET

Memeli genlerinin kalıcı ve stabil olarak susturulmasında endojen siRNA eksprese eden vektörlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Genlerin fonksiyonlarını öğrenmek ve hastalıklarla ilişkili genlerin hastalığındaki rollerini belirlemek için uygun siRNA ekspresyon sisteminin belirlenmesi önemlidir. Bu çalışmada siRNA eksprese eden lentivirüs pFIV-H1/U6 ve plazmit pPK-H1 vektör sistemlerinin hedef *MDK* geninin memeli kültür hücre hatlarında ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinlikleri revers-transkriptaz PZR tekniği kullanılarak analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda lentivirüs sisteminin hedef gen üzerinde etkisinin olmadığı buna rağmen plazmit vektörün etkin bir şekilde hedef geni susturduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: siRNA, gen susturulması, plazmit temelli RNAi, lentivirüs temelli RNAi, siRNA vektörü

Comparison of Effectiveness of Plasmid-siRNA and Lentivirus-siRNA Based Systems for Gene Silencing

ABSTRACT

Use of vectors expressing endogenously siRNAs that allows permanent and stable silencing of mammalian genes is becoming widespread. It is essential to determine appropriate siRNA expression system to understand the functions of genes and determine their roles associated with diseases. In this study, efficacies of siRNA expressing lentivirus pFIV-H1/U6 and plasmid pPK-H1 vectors systems on target gene *MDK* expression levels in cultured mammalian cell lines is analyzed and compared by reverse-transcriptase PCR assay. As a result of analysis it has been determined that lentivirus system has no effect on the target gene expression nevertheless the plasmid system effectively silenced the target gene.

*Keywords: Lentivirus based RNAi, plasmid based RNAi, gene silencing, siRNA, siRNA
vector*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım için bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan ve her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Fikret ŞAHİN'e, tez çalışmamın deneysel aşaması için bünyesindeki her türlü imkan ve olanakları sağlayan başta Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bölüm başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ve tüm çalışanlarına, yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve önerilerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a, tez dönemine geçiş aşamamda önerileri ve yönlendirmesi sayesinde bana çok büyük yardımları olan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, laboratuvar çalışmalarım esnasında eşsiz tecrübesi ve bilgisiyle kendisinden çok şey öğrendiğim Sayın Dr. Djursun KARASARTOVA'ya ve tez çalışmam esnasında yardımlarını asla ödeyemeyeceğim Sayın Vet. Hek. Buse TÜREGÜN'e, tez çalışmamın deneysel aşaması için gerekli olan Hek293 hücrelerini bizimle paylaşan değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY'a, yüksek lisans öğrenimim boyunca bitmek bilmeyen sorularımı sabırla cevaplayan öğretim programları ofisi sorumlusu Sayın Asuman ERZİNCAN'a ve ayrıca bugünlere gelmemde en sıkıntılı zamanlarda bile esirgemedikleri maddi , manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Semih Zafer YILMAZ

Ankara, Haziran 2010

Bu çalışma “siRNA eksprese eden Lentivirus sistemi kullanarak PI3K sinyal iletim yolundaki moleküllerin inhibisyonu (kanser tedavisinde bir alternatif)” adlı proje kapsamında, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü (BAP), Proje no:2005-0809-223)desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. RNA İnterferans Tekniği.....	3
2.2. RNA İnterferans Tarihçe.....	4
2.3. RNAi Mekanizması ve Bileşenleri.....	7
2.4. Memelilerde RNA İnterferans.....	13
2.5. siRNA Tasarımının Temel Kuralları.....	18
2.5.1. Etkin siRNA Tasarımı.....	19
2.6. siRNA Oluşturma Yöntemleri.....	21
2.6.1. <i>In vitro</i> /Kimyasal Yöntemler.....	21
2.6.1.1. siRNA'ların Kimyasal Sentezi.....	21
2.6.1.2. <i>In vitro</i> Transkripsiyon.....	22
2.6.1.3. Uzun dsRNA'nın Enzimatik Yıkımı ile siRNA Elde Edilmesi.....	23
2.6.1.4. Ekspresyon Vektörleri.....	25
2.6.1.4.1. Promotorlar.....	25
2.7. Plazmit Temelli RNAi.....	27
2.7.1. shRNA Eksprese Eden Elazmit Vektörler.....	27
2.8. Lentivirüs Temelli RNAi.....	30
2.8.1. Lentivirüslerden Lentivirüs Vektörlere.....	31
2.8.2. Viral Genomun Yapısı.....	31
2.8.3. Lentivirüs Hayat Döngüsü.....	35
2.8.4. Uygun Paketleyici Hücre Tiplerinin Seçimi ve Kullanımı.....	36
2.8.5. Rekombinant Lentivirüs Partiküllerinin Elde Edilmesi.....	38
2.8.6. Lentiviral RNAi Vektör.....	39
2.8.7. shRNA/siRNA Virüsün Üretimi ve Kullanımı.....	41
2.8.9. Gen Susturulmasının Test Edilmesi.....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Vektörler.....	42
3.1.1.1. Plazmit siRNA Vektörü.....	42
3.1.1.2. Lentiviral siRNA Vektörü.....	43
3.1.1.3. Memeli Ekspresyon Vektörü.....	45
3.1.2. Memeli Hücre Hatları.....	46
3.1.3. Primerler ve Amplifikasyon Bölgeleri.....	46
3.1.3.1. <i>ACTB</i> (β -Actin).....	46
3.1.3.2. <i>MDK</i> (Midkine).....	46
3.1.3.3. pPKH1 Plazmitinde Bulunan H1 Ekspresyon Kaseti.....	47
3.1.4 siRNA Olarak Eksprese Edilen Oligonükleotidler ve <i>MDK</i> cDNA'daki Konumları.....	47
3.1.4.1. Mid1.....	47

3.1.4.2. Mid2.....	48
3.2. Memeli hücre hatlarında MDK Geninin Plazmit-siRNA ve Lentivirüs-siRNA Vektör Sistemleri Kullanılarak Susturulması.....	49
3.2.1. Ligasyon.....	53
3.2.2. Transformasyon.....	53
3.2.3. Alkalın Lizis Yöntemi İle Plazmit DNA İzolasyonu (Mini/Maxi Prep).....	53
3.2.4 R. Endonükleaz enzimleri ile kesilen DNA'ların 5' - Uçlarının Defosforilasyonu.....	54
3.2.5. DNA Pürifikasyonu.....	54
3.2.6. DNA Miktar ve Saflık Tayini.....	55
3.2.7. Vektör ve Paketleyici Plazmitlerin Büyük Hacimlerde Üretilmesi.....	55
3.2.8. Hücre kültürü.....	55
3.2.9. Hücre Hatlarına Plazmit DNA Transfeksiyonu.....	56
3.2.10. Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu.....	56
3.2.11. RNA Miktarının Hesaplanması.....	57
3.2.12. cDNA Sentezi.....	57
3.2.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	57
3.2.14. Agaroz Jel Elektroforezi.....	58
3.2.15. Plazmit Vektörün Hazırlanması.....	58
3.2.15.1. shRNA İçin Oligo Tasarımı.....	58
3.2.15.2. Oligoların Birbirleri ile Bağlanması.....	59
3.2.15.3. Bağlanan Oligoların shRNA Ekspresyon Plazmitine Ligasyonu.....	59
3.2.15.4. Mini Prep ve Pozitif Klonların Seçimi.....	60
3.2.15.5. Mid1 ve Mid2 shRNA'ları Birlikte Eksprese Eden Plazmit Vektörün Oluşturulması.....	60
3.2.15.5.1. pPKH1-Mid1 Plazmitin EcoRI Enzimi İle Kesilmesi.....	60
3.2.15.5.2. EcoRI ile Kesilen Plazmit DNA'nın 5' - Fosfat Gruplarının Uzaklaştırılması.....	61
3.2.15.5.3. pPKH1-Mid1 plazmitin H1 Promotoru ve shRNA Eksprese Eden 300 bp'lik Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu	61
3.2.15.5.4. Amplifiye PZR Ürününün EcoRI Enzimi İle Kesilmesi.....	61
3.2.15.5.5. Ligasyon.....	62
3.2.15.5.6. Mini Prep ve Pozitif Klonların Seçimi.....	62
3.2.16. Lentivirüs Vektörün Hazırlanması.....	63
3.2.16.1. siRNA İçin Oligo Tasarımı.....	63
3.2.16.2. shRNA İçin Oligo Tasarımı.....	64
3.2.16.3. Oligoların Birbirleri ile Bağlanması.....	65
3.2.16.4. Bağlanan Oligoların siRNA Ekspresyon Plazmitine Ligasyonu.....	65
3.2.16.5. Mini Prep ve Pozitif Klonların Seçilmesi.....	65
3.2.16.6. pPKH1-Mid2 Vektör Plazmitte Yer Alan H1-Mid2 Ekspresyon Kasetinin pFIV Lentiviral Vektör Plazmitine Klonlanması.....	66
3.2.16.7. İnfektif Virüs Partiküllerinin Oluşturulması.....	66
3.2.16.8. Gen Ekspresyon Analizi.....	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	68
4.1. Plazmit Vektörün Hazırlanması.....	68
4.2. Lentivirüs Vektörün Hazırlanması.....	72
4.3. Gen Ekspresyon Analizi.....	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	82
6. KAYNAKLAR.....	85
EK.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa No:

Çizelge 2.1. Etkin siRNA tasarımında Khrorova ve ekibi tarafından hazırlanan kriterler..20

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil No

Sayfa No:

Şekil 2.1. RNA interferans mekanizması.....	8
Şekil 2.2. RNA interferans mekanizması temel alınarak geliştirilmiş 3 farklı RNAi yaklaşımını gösteren şema.....	9
Şekil 2.3. 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA.....	11
Şekil 2.4. Memelilerde dsRNA ve interferon cevabı mekanizması.....	14
Şekil 2.5. RNA polimeraz III promotörü ile shRNA ekspresyonu.....	26
Şekil 2.6. RNA polimeraz II promotörü ile RNA ekspresyonu.....	26
Şekil 2.7. pSUPER.puro shRNA ekspresyon vektörünün klonlama haritası.....	28
Şekil 2.8. shRNA ekspresyon vektörüne klonlanacak taslak DNA oligonükleotidi ve ekspresyon sonrası oluşan shRNA.....	28
Şekil 2.9. HIV-1, SIV/HIV2 ve FIV virüslerinin genom yapıları.....	34
Şekil 3.1. pPK-H1 plazmit vektörün genel yapısı.....	42
Şekil 3.2. pPK-H1 plazmit vektörün siRNA klonlama bölgesine yerleştirilecek olan 62 nükleotid uzunluğundaki kalıp oligonükleotid dizilimi ve yerleşim bölgesi.....	43
Şekil 3.3. pFIV-H1/U6-Puro™ lentiviral vektörün genel yapısı.....	44
Şekil 3.4 pFIV-H1/U6-Puro™ lentiviral vektörün siRNA klonlama bölgesine yerleştirilecek olan 23 nükleotid uzunluğundaki kalıp oligonükleotid dizilimi ve yerleşim bölgesi.....	44
Şekil 3.5. pcDNA 3.1 memeli ekspresyon vektörün genel yapısı.....	45
Şekil 4.1. pPKH1-Mid1 ve Mid2 mini prep jel görüntüsü.....	68
Şekil 4.2 pPKH1-Mid2-2 mini prep jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.3 HindIII ile kesilmiş pPKH1 mini prep plazmit DNA'ların jel görüntüsü.....	69
Şekil 4.4 EcoRI ile kesilmiş pPKH1-Mid2 plazmit DNA'nın jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.5 pPKH1-Mid1 H1 ekspresyon kaseti PZR jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.6 pPKH1-Mid(1+2) mini prep plazmit DNA'ların jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.7 HindIII enzimi ile kesilmiş pPKH1-Mid(1+2) plazmit DNA'ların jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.8 pFIV-Mid1 mini prep plazmit DNA'ların jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.9 pFIV-Mid2 mini prep plazmit DNA'ların jel görüntüsü.....	73
Şekil 4.10 pFIV-d-Mid1 mini prep plazmit DNA'ların jel görüntüsü.....	73
Şekil 4.11 pFIV-d-Mid2 mini prep plazmit DNA'ları.....	74
Şekil 4.12 pFIV plazmitlerden yapılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	74
Şekil 4.13 EcoRI ile kesilmiş pFIV lentiviral vektör plazmit DNA'nın jel görüntüsü.....	74
Şekil 4.14 H1-Mid1 ve H1-Mid2 ekspresyon kasetleri PZR jel görüntüsü.....	75
Şekil 4.15 pFIV vektör ile H1-Mid1/Mid2 ekspresyon kasetinin ligasyon sonrası elde edilen mini prep plazmit DNA'lardan 300 bçlik ekspresyon kasetine spesifik primerler ile yapılan PZR sonuçları.....	76
Şekil 4.16 EcoRI enzimi ile kesilmiş H1-Mid2 ekspresyon kaseti klonlanan pFIV lentiviral vektör plazmit DNA.....	77
Şekil 4.17 Lentivirüs infeksiyonundan sonra HepG2 hücrelerindeki <i>ACTB</i> ve <i>MDK</i> ekspresyon seviyelerini gösteren PZR jel görüntüsü.....	78
Şekil 4.18 <i>MDK</i> geninin lentivirüs ile infekte edilen HepG2 hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	78
Şekil 4.19 Lentiviral plazmit vektör transfeksiyonundan sonra Hek293 hücrelerindeki <i>ACTB</i> ve <i>MDK</i> ekspresyon seviyelerini gösteren PZR jel görüntüsü.....	79

Şekil 4.20 <i>MDK</i> geninin lentiviral plazmit vektör ile transfekte edilen Hek293 hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	79
Şekil 4.21 plazmit transfeksiyonundan sonra <i>ACTB</i> ve <i>MDK</i> geninin PancI hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini gösteren jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.22 <i>MDK</i> geninin plazmit ile transfekte edilen PancI hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	80
Şekil 4.23 plazmit transfeksiyonu ve lentivirüs infeksiyonundan sonra <i>ACTB</i> ve <i>MDK</i> geninin PancI hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini gösteren jel görüntüsü.....	81
Şekil 4.24 plazmit transfeksiyonu ve lentivirüs infeksiyonundan sonra <i>MDK</i> geninin PancI hücrelerindeki ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.....	81

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMD	: Age Related Macular Degeneration
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovine Serum Albumin
ddH ₂ O	: Double Distilled Water
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsRNA	: double stranded RNA
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
esiRNA	: Endoribonuclease-prepared siRNA
FIV	: Feline Immunodeficiency Virus
g	: Gram
GFP	: Green Fluorescence Protein
GST	: Glutatyon S Transferaz
GTP	: Guanozin trifosfat
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IFN- α	: Interferon α
kDa	: Kilo dalton

L	: Litre
LB	: Luria Bertani
LTR	: Long terminal repeats
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
miRNA	: Micro RNA
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: messenger RNA
Nef	: NEgative Factor
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
ORF	: Open Reading Frame
PBS	: phosphate-buffered saline
PKR	: Protein Kinaz R
pmol	: Pikomol
PTGS	: Post Transcriptional Gene Silencing
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RC	: Replication Competent
RdRP	: Ribosome dependent RNA Polymerase
Rev	: REgulatory Viral protein
RISC	: RNA Induced Silencing Complex

RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA İnterferans
RNaz	: Ribonükleaz
rpm	: round per minute
RSV	: Rauss Sarcoma Virus
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
shRNA	: short hairpin RNA
SIV	: Simian immunodeficiency virus
siRNA	: small interfering RNA
sn	: Saniye
snRNA	: Small nuclear RNA
Tat	: TrAnscripTion factor
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
tRNA	: transfer RNA
UV	: Ultra Violette
Vif	: Viral Infectivity Factor
Vpr	: Viral Protein R
Vpu	: Viral Protein U
Vpx	: Viral Protein X
VSV-G	: Veziküler somatitis virüs G glikoproteini
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

1. GİRİŞ ve AMAÇ

DNA'nın kalıtım materyali olduğunun keşfedilmesinden bu yana, biyolojik bilimlerdeki ana tema, genlerin hücrel süreçlerde ve yolaklarda oynadıkları rolü göstermek amacıyla onları uzaklaştırmak ya da mutasyona uğratmak olmuştur. Model sistemlerde genetik manipülasyon yapılabilmesi de sayısız buluşun önünü açmıştır (Paddison 2008). Ancak bu zamana kadar moleküler yolakların altında yatan temel sorular memelilerde yanıtızsız kalmış, bu genetik engel özellikle de kanser araştırmalarını olumsuz yönde etkilemiştir. Araştırmacılar kanser hücrelerinin zayıf yanlarını ortaya çıkartacak güvenilir araçlardan yoksun kalmıştır.

siRNA temelli gen susturulması tekniği olarak bilinen RNA interferans, moleküler biyolojide son on yılın en önemli tekniklerinden biri haline gelmiştir. Genlerin transkripsiyon sonrası aşamada susturularak fonksiyonlarının ortaya çıkartılmasında ve hedefteki istenmeyen genetik aktivitenin durdurulması yoluyla hastalık tedavisinde özgün bir yaklaşım sunmaktadır (Schepers 2005). İnsan Genom Projesi'nin tamamlanması çok büyük bir devrim olmasına karşın yarattığı heyecan çok uzun sürmemiştir. Aynı yıl memeli hücrelerinde RNAi'nin keşfedilmesi Science dergisi tarafından yılın devrimi (Couzin 2002) olarak adlandırılmıştır. RNA interferans teknolojisi, temel olarak ilgilenilen bir genin fonksiyonunu çalışmak ya da hastalıklarda patojenik gen ifadesini engellemek için araştırmacılara oldukça işlevsel bir araç sunmaktadır (Schmitz and Schepers 2004). RNAi'nin memeli sistemlerinde keşfedilmesi ile birer çift iplikli RNA olan siRNA ya da shRNA'lar kullanılarak insan ya da fare genomundaki herhangi bir gen güvenilir bir şekilde susturulabilmektedir. Bundan sonraki 10 yıl içerisinde biyomedikal bilimlerde siRNA'lar ve shRNA'lar *in vivo* rodent ve primat sistemlerinde ve *in vitro* hücre temelli sistemlerdeki hastalık sistemlerinin valide edilmesi, şüphelenilen hedeflerin ortadan kaldırılmasıyla ilaç aktivitelerinin valide edilmesi, genom ebadında fonksiyonel genomik çalışmalarla yeni ilaç adaylarının tanımlanması ve son olarak klinikte tedavi amaçlı moleküller olarak hastalıklarla mücadele edilmesinde kullanılmaları söz konusudur (Paddison 2008).

Her ne kadar klasik gen knock-out sistemlerinde olduğu gibi gen ifadesini tamamen ve sürekli olarak ortadan kaldırmak RNA interferans teknolojisi ile mümkün olmasa da, bu sistemin en

etkin ve kalıcı şekilde çalıştığı platformun tayin edilmesi gerekmektedir. Kullanım alanı açısından özellikle kanserde rol alan moleküllerin fonksiyonlarının araştırılmasında ve diğer hastalıklarda da etken molekülün tanımlanmasında kullanılan bir yöntem olan siRNA sisteminin etkinliği artırılarak tedavi amaçlı kullanımı için yoğun çalışmalar vardır. Ayrıca son yıllarda bu sistem kullanılarak farklı virüslerin inaktif hale getirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu hedefleri en etkin şekilde sağlayan tekniğin belirlenmesi önemlidir.

siRNA/shRNA'ların kullanımıyla ilgili olarak iki ana sınırlama karşımıza çıkmaktadır;

- Susturmanın etkinliği, yıkılan mRNA miktarı,
- Susturma süresinin uzunluğu.

Bu iki sınırlamanın üstesinden gelebilmek amacıyla shRNA/siRNA ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir. Bu vektörler genellikle RNA polimeraz III promotorları olan insan H1 ya da fare U6 promotorlarını kullanarak hedef mRNA'yı yıkacak siRNA/shRNA'ları eksprese ederler. En sık kullanılan vektör sistemleri olarak da plazmitler ve lentiviral vektörler karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada ileride *in vivo* çalışmalarda kullanılacak olan lentivirüs temelli siRNA ekspresyon vektörünün *in vitro* hücre kültürü ortamında plazmit temelli siRNA vektörü ile etkinlik bakımından karşılaştırılması amaçlanmıştır. Lentivirüs temelli siRNA sistemi için daha önceki çalışmalarda henüz denenememiş olan çift RNA polimeraz III promotorlu pFIV-H1/U6 sistemi kullanılmıştır. pFIV-paketleyici vektörü ile birlikte Hek293 hücre hattında istenen gen bölgesini bulduran lentivirüs sistemi izole edilmiş ve hedef hücrede infeksiyonu sağlanarak hedeflenen *MDK* geni ekspresyon seviyesindeki değişimler revers transkriptaz PZR ile mRNA ekspresyon analizi yapılarak araştırılmıştır. Plazmit temelli siRNA sistemi için pPK-H1 vektör sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde lentivirüs sisteminde kullanılan olan nükleotid dizileri plazmit vektörüne klonlandıktan sonra hedef hücreye transfekte edilerek ve gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. Bu analizlerin sonunda plazmit ve lentivirüs temelli RNAi platformlarının etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. RNA İnterferans Tekniği

RNA interferans (RNAi), evrimsel olarak büyük oranda korunmuş, çift iplikli RNA (dsRNA)'nın hücreye girişiyle birlikte homolog mRNA'ların dizi-spesifik yıkımına yol açan bir post-transkripsiyonel gen susturma mekanizmasıdır. İlk defa 1998 yılında Andrew Fire ve Craig Mello tarafından bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* adlı kurtçukta keşfedilmiştir (The RNAi Web, 2004-2008).

Dışarıdan verilen dsRNA hedefi ile mükemmel homoloji gösteriyorsa hedef mRNA'nın yıkılmasında büyük oranda seçicidir. Genin transkripsiyonu normal seyrindeyken, protein translasyonu onu kodlayan mRNA'nın spesifik yıkımı ile engellenir. Dahası, DNA dizisi içinde bulunan intronlarla veya promotor bölge dizileriyle homoloji gösteren dsRNA'ların herhangi bir etkisi bulunmadığı gösterilmiştir. Bu da susturmanın post-transkripsiyonel düzeyde cereyan ettiğine işaret etmektedir (Fire et al. 1998, Montgomery and Fire 1998, Montgomery et al. 1998).

Çokça çalışılan model organizmaların ve insan genomunun tamamen sekanslanmasıyla "loss-of-function" fenotipe sahip canlıyı elde etmek üzere diğer genleri etkilemeden yalnızca ilgilenilen genin mRNA'sını spesifik olarak yıkacak dsRNA'ları seçmek mümkündür. Homolog mRNA, substokiyometrik miktardaki dsRNA ile 2-3 saat içinde büyük oranda yıkılır. Bazı canlı türlerinde RNAi fenotipi hücre sınırlarını aşır organizmanın progenilerine kalıtılabilir (Zamore et al. 2000). Dahası, dsRNA'larla transfekte edilmiş kültür hücreleri 9 bölünmeye kadar RNAi fenotipi devam ettirebilir (Tabara et al. 1998).

Bugün, RNAi adı verilen post-transkripsiyonel RNA susturulması, ökaryotik hücrelerin RNA virüsleri ve konak genomuna dahil olabilen parazitik hareketli DNA parçacıkları olarak bilinen transpozonların infeksiyonuna karşı eski bir savunma mekanizması olarak değerlendirilmektedir (Ketting et al. 1999, Tabara et al. 1999).

2.2. RNA interferans Tarihçe

Çift iplikli ds-RNA ile indüklenmiş gen susturulmasının etkileri ilk defa bitkilerde (Napoli et al. 1990) gözlemlenmiştir. Jorgensen ve arkadaşları genetik transformasyon çalışmaları ile petunyada pigmentasyonu katalizleyen bir enzim olan chalcone syntase (chs)'ın ekspresyonundan sorumlu olan bir genin aktivitesini düzenleyerek daha mor petunyalar elde etmeye çalışmışlardır. Ancak petunya bitkisine ekzojenik transgenin aktarılması, beklenildiği gibi çiçek rengini daha koyulaştırmak yerine alacalı pigmentasyon ile daha beyaz petunyanın elde edilmesine neden olmuştur. Petunya bitkisine *chs* geninin ekstra kopyasının aktarılması, onun ekspresyonunda beklenen artışın aksine azalmaya neden olmuştur. Yapılan çalışmalar bu azalmanın sitozolik *chs* mRNA'sının transkripsiyonunun azalması ile ilgili olmadığını ve izole edilen nukleusta transkripsiyonun devam ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla bu durum transkripsiyon sonrası RNA parçalanmasını ifade eden transkripsiyon sonrası gen baskılama (post-transcriptional gene silencing, PTGS) olarak tanımlanmıştır. (Napoli et al. 1990).

1995 yılında Guo ve Kempfues adlı araştırmacılar *C. elegans*'ta Ser/Thr Kinaz enzimini kodlayan *par-1*'in fonksiyonlarını ortaya çıkartmaya çalıştıkları makalelerinde genin embriyo polaritesinden sorumlu olduğunu keşfetmişler, ayrıca sens RNA'nın da en az antisens RNA kadar gen ekspresyonunu baskılamada etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Her 100 kurtçuk embriyosundan 52 tanesi *par-1* antisens RNA, 54 tanesi de *par-1* sens RNA injekte edildiğinde ölmüştür (Guo and Kempfues 1995).

RNAi'nin asıl keşfi ise *C. elegans*'ta sens kontrol RNA'nın beklenmedik şekilde antisens RNA kadar yüksek susturma aktivitesi göstermesi deneyini (Guo and Kempfues 1995) açıklamaya çalışan A. Fire ve C. Mello tarafından 1998 yılında yapılmıştır. Sens ve antisens RNA'nın beraber injeksiyonunun yalnızca antisens ya da sens RNA'nın injeksiyonuna nazaran 10 kat daha etkin olan bir susturma mekanizmasını tetiklediğini ve eksojen dsRNA'nın hedef mRNA'nın mevcut miktarını belirgin bir şekilde azalttığını göstermişlerdir (Fire et al. 1998). Bu yeni keşfedilen fenomen RNA interferans ya da RNAi olarak terimleşmiştir.

2000 yılında Zamore ve arkadaşları daha önceden geliştirmiş oldukları *in vitro Drosophila* sisteminde RNAi'nin altında yatan moleküler mekanizmayı keşfetmeye çalışmışlar ve uzun dsRNA ipliğinin RNaz III (Dicer) tarafından 21-23 nükleotidlik fragmentlere işlendiğini bildirmişlerdir (Zamore et al. 2000)

İlk başta RNAi'nin nematodlara has bir özellik olduğu düşünülse de, dsRNA temelli gen susturulmasının memelilerde de bulunduğu gösterilmesi geçen yılların en büyük sürprizi olmuştur. RNAi'nin altında yatan çekirdek sistem tüm deneysel ökaryotik organizmalarda korunmuştur. RNAi tekniğini memeli fonksiyonel genomu üzerine uygulamalarıyla Tuschl ve arkadaşları bir devrim yaratmıştır (Elbashir et al. 2001a). Bu grup, 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA'ların memeli kültür hücrelerinde interferon cevabına yol açmadan RNA interferans mekanizmasını harekete geçirebileceklerini keşfetmiştir. Bu siRNA'lar büyük olasılıkla interferon cevabını tetiklemek için çok kısa ve homolog mRNA'ların dizi spesifik yıkımını yönlendirecek potansiyele sahiptir (Hutvagner et al. 2000).

2002 yılında Paddison ve arkadaşları kısa saç tokası RNA'ların (shRNA) memeli hücrelerinde dizi spesifik gen susturulmasını indükleyebileceğini göstermişlerdir. Daha önce de endojen olarak eksprese edilen yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki small temporal RNA'lar olarak bilinen shRNA öncüllerinin Dicer tarafından 21-23 nükleotidlik aktif RNA'lara işlendikten sonra hedef mRNA'ları komplementerlik esasına göre bulmakta olduğunu gözlemleyen araştırmacılar aynı esasa göre işleyen bir sistem geliştirmişlerdir. RNA Polimeraz III promotörlerini kullanarak endojen shRNA eksprese eden sistem dizayn etmişler ve hedeflenen genin ekspresyonunu baskılamayı başarmışlardır. Böylece stabil ve kalıtılabilir RNAi fenotipi sergileyen hücre hatları ve hayvan modelleri oluşturulabilmesinin önünü açmışlardır (Paddison et al. 2002).

2003 yılında ise Van Parijs ve arkadaşları, shRNA ekspresyon vektörleri ve retrovirüslerle yapılan uygulamalara karşı önemli hücre tiplerinin *in vivo* ve *in vitro* ortamda direnç göstermesinin RNAi'yi sınırladığını görmüşler ve bu sınırlamaları aşabilmek için bölünen ve bölünmeyen memeli hücreleri, kök hücreler, zigotlar ve onların farklılaşmış progenilerinde shRNA eksprese eden lentiviral bir sistem tanımlamışlardır. Bu sistemi kullanarak çeşitli

hücre tiplerinde ve transgenik farelerde gen ekspresyonunu spesifik, yüksek oranda stabil ve fonsiyonel olarak susturmayı başarmışlardır (Rubinson et al. 2003).

Bu gelişmeler ışığında araştırmacılar RNAi sistemini terapötik amaçlar için kullanılabilir hale getirme çalışmalarına yönelmişlerdir. Liebermann ve arkadaşları siRNA'ların ilk defa hayvanlarda tedavi amaçlı olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. *Fas* temelli apoptozis birçok karaciğer hastalığı ile yakından ilişkilidir ve hepatosit hücrelerinin ölümüne yol açar. Farelerde iki model otoimmün hepatiti hastalığında karaciğeri iflas etmekten ve fibrozisten korumak için, *Fas* reseptörünü kodlayan *Fas* genini hedef alan siRNA'lar oluşturup *in vivo* etkilerini araştırmışlardır. *Fas* siRNA'ların intravenöz enjeksiyonu neticesinde *Fas* proteini kodlayan mRNA'larda büyük miktarda azalma gözlemlenmiş ve etkileri 10 gün boyunca sürmüştür. Kontrol grubu farelerin tamamı ölüirken *Fas* siRNA uygulanan farelerin %82'si iyileşmiştir (Song et al. 2003).

Nihayet 2004 yılında insanlarda RNAi temelli hastalık tedavisinde ilk defa bir ilaç geliştirilmiştir, Acuity Pharmaceuticals adlı bir şirket gözlerde oluşan yaşlanmayla ilişkili maküler dejenerasyon (AMD) hastalığının tedavisi için Bevasiranib adlı siRNA ilacın faz I klinik denemelerine başlamıştır.

Bu gibi gelişmelerin ardından RNAi teknolojisini temel alan çalışmaların sayısı hızla artmış ve kayda değer başarılar sağlanmıştır. Bunlara aşağıdaki örnekler verilebilir;

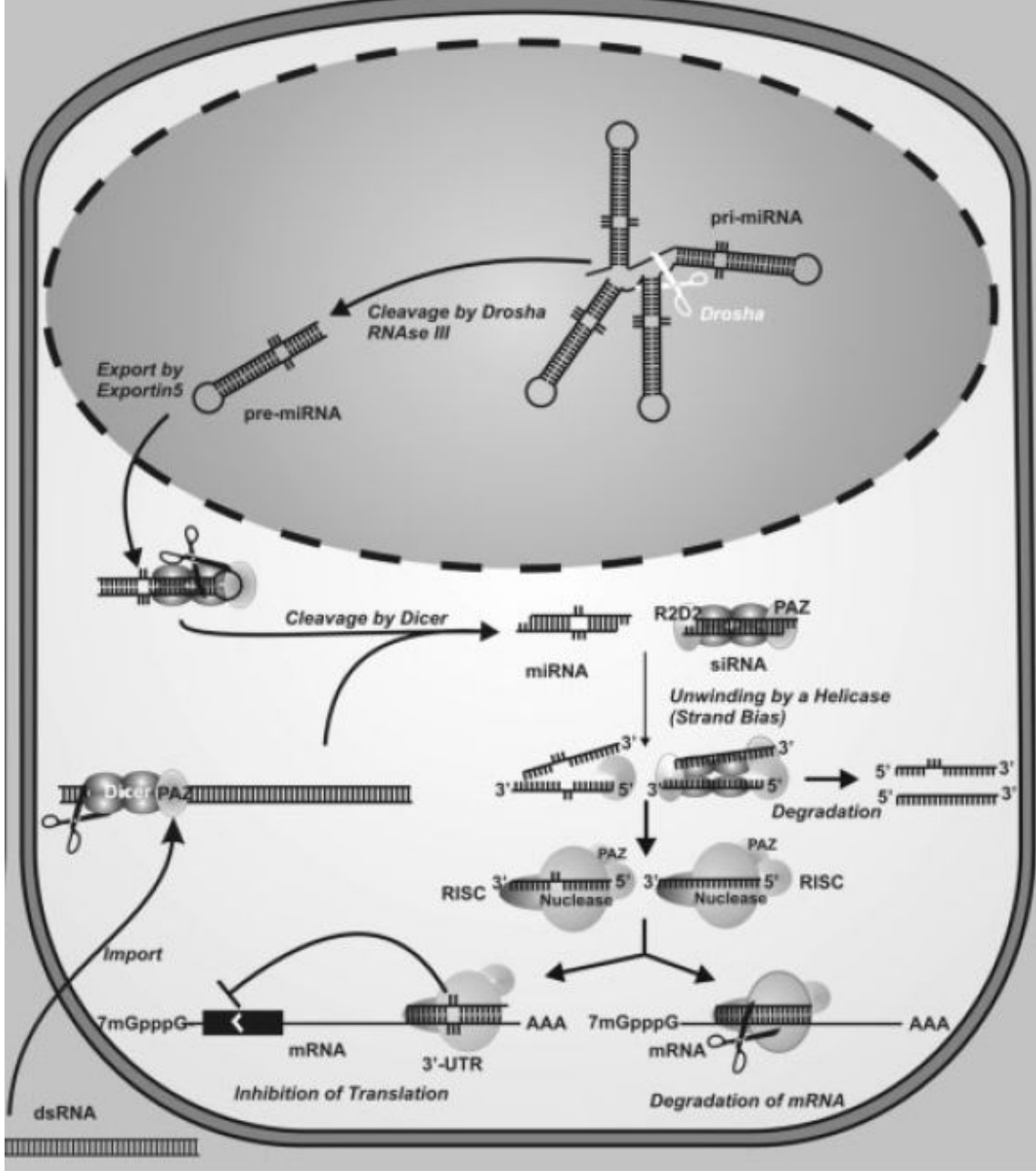
- Deli Dana hastalığına neden olan katlanmış PrPsc proteininin nöronlarda birikmesi RNAi yoluyla büyük oranda geciktirilmiştir (Pfeifer et al. 2006)
- Meme kanseri metastazında etkili *SATB1* geninin RNAi ile susturulması tümör gelişimini durdurmuş ve süreci tersine döndürmüştür (Han et al. 2008)
- Farelerde hepatoselüler karsinoma hastalığında *STAT3* geninin RNAi ile susturulması *in vivo* tümör gelişimini engellemiştir (Sun et al. 2009)

- Anylam Pharmacaeticals adlı şirket RSV, Karaciger kanserleri, , Huntington hastalığı, Hiperkolesterolomia hastalıklarının tedavisinde keşif ve geliştirme aşamasını tamamlamıştır.
- Acuity Pharmacaeticals adlı şirket AMD hastalığına karşı geliştirdiği Bevasiranib adlı ilacın faz II deneylerini tamamlamıştır.

2.3. RNAi Mekanizması ve Bileşenleri

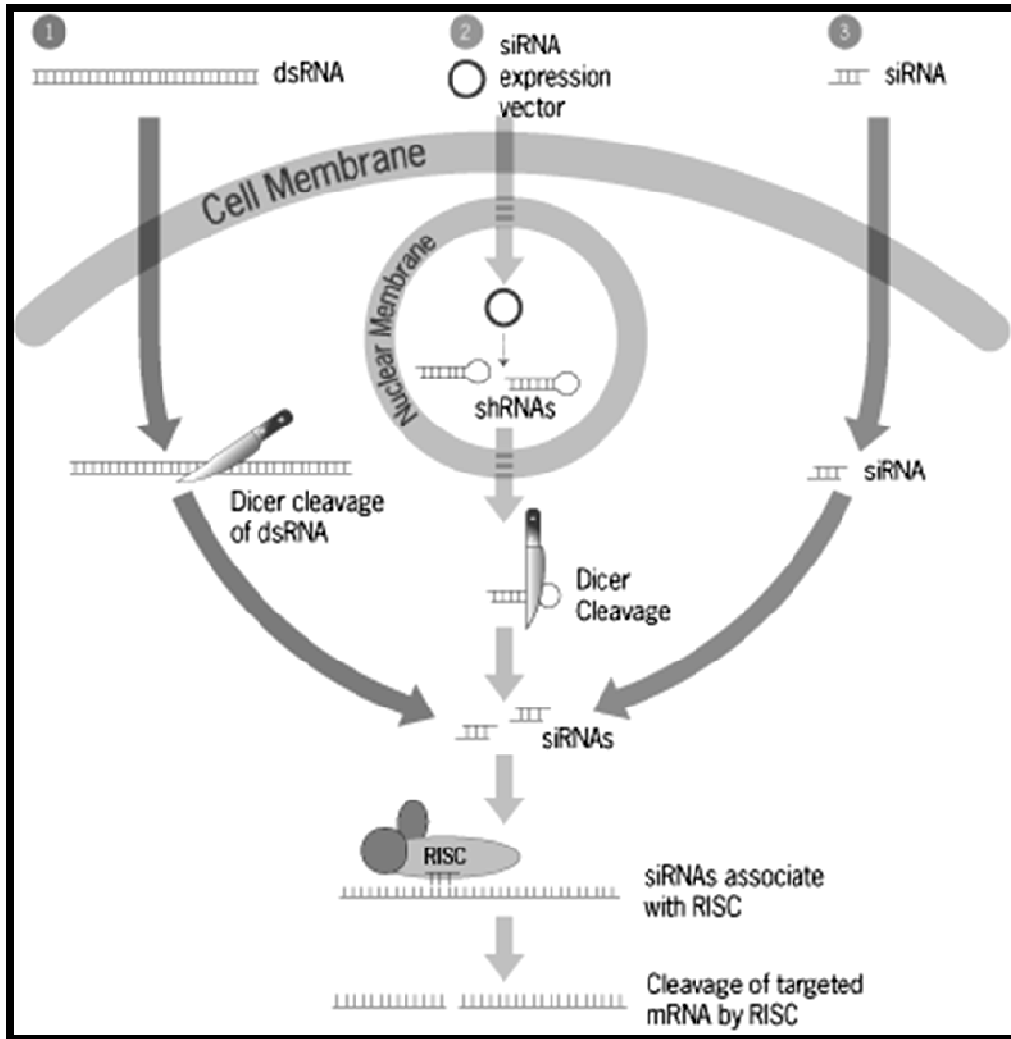
Keşfinden bu yana, *C. elegans* (Qiao et al. 1995, Smardon et al. 2000) , *Arabidopsis* (Mourrain et al. 2000) , *N. crassa* (Cogoni and Macino 1997, 1999), *Drosophila* ve memelilerdeki RNAi olaylarıyla ilişkili genlerin tanımlanması ve karakterize edilmesine yönelik büyük aşama kaydedilmiştir. En önemli mekanistik basamaklar ve moleküler bileşenler *C. elegans*, *D. melanogaster* ve bitkilerde keşfedilmiş, RNAi'nin birçok farklı proteinle ve küçük RNA'larla ilişkili oldukça kompleks bir mekanizmaya sahip olduğu anlaşılmıştır (Schepers 2005). RNAi defektli mutantları olan *Arabidopsis*, *N. crassa*, ve *C. elegans* ile yapılan genetik çalışmalar RNaz III ilişkili nükleazları, Argonat ailesinin elemanlarını ve RNA bağımlı RNA polimerazları (RdRP) gün ışığına çıkarmıştır. Omurgasız sistemlerinde RNAi'nin bileşenlerinin ve biyokimyasal karar vericilerinin ortaya çıkarılması ve karakterize edilmesi (Hannon 2002), RNAi'nin memelilerde genetik bir araç olarak kullanılmasına ön ayak olmuştur (Paddison 2008).

C. elegans'taki mekanistik çalışmalar esnasında lin-4, let-7 miRNA'lar yaklaşık 70 nükleotidlik öncül saç tokası RNAdan işlendikten sonra oluşan 22 nükleotidlik RNA'lardan elde edilmiştir. Buna ek olarak Dicer-1 defektli (Dcr-1) *C. elegans* mutantların gelişiminde, üremede ve RNAi fonksiyonlarında bozukluklar meydana gelmiştir (Grishok et al. 2001, Ketting et al. 2001a, Knight 2001). Çekirdekte yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda tek saç tokasına sahip RNA'lar olan pre-miRNAları kodlayan daha uzun öncül pri-miRNA'lar vardır. Kendi üzerine katlanmış olan bu yapı RNazIII ailesinden bir enzim olan Drosha tarafından pre-miRNA'lara parçalanır. Bu pre-miRNA'lar nükleusta bulunan Exportin-5 adı verilen bir transferaz tarafından sitozole taşınır (Lund et al. 2003).



Şekil 2.1. RNA interferans mekanizması (Schepers 2005).

RNAi ile ilgili olarak Drosha ilk defa “pre-miRNA” ların Dicer ile işlenmesinden önce çekirdekte, birden fazla pre-miRNA içeren birincil yapılar olan pri-miRNA’ların tekli pre-miRNA’lara dönüştürülmesinde vurgulanmıştır. Drosha’nın, insan nükleus ekstraktlarında bulunan pri-miRNA’ların yıkımından sorumlu olduğu bulunmuştur (Lee et al. 2003b). Drosha



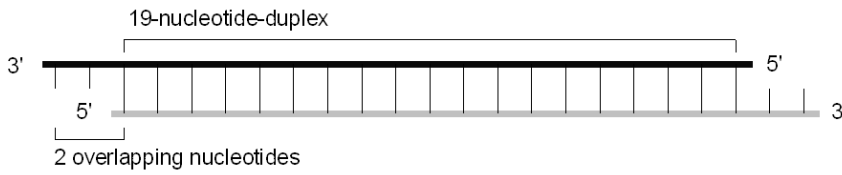
Şekil 2.2. RNA interferans mekanizması temel alınarak geliştirilmiş 3 farklı RNAi yaklaşımını gösteren şema. (<http://www.ambion.com/techlib/resources/RNAi/overview/gfx/fig1.3.gif>)

500-600 kDa ağırlığında bir “mikroişlemci” olan geniş bir nükleer komplekstir (Denli et al. 2004, Gregory et al. 2004, Han et al. 2004). Kofaktörü olan DGCR8/Pasha ile interaksiyona girerek, pri-miRNA'lara bağlanmasını ve aktivitesini sağlar (Denli et al. 2004, Gregory et al. 2004, Han et al. 2004, Landthaler et al. 2004). pri-miRNA'ların yıkımına ssRNA-dsRNA ayrımı ile karar verilir, miRNA'nın tabanındaki saç tokasından sonraki 11 nükleotidlik kısımdan itibaren pri-miRNA kesilir (Han et al. 2002). Sonuçta oluşan pre-miRNA 3' uçlarında 2 nükleotid bulunduran bir saç tokasıdır. Drosha yıkımından sonra pre-miRNA 3'-2 nükleotidlik overhang yapılarına bağlanan Exportin-5 ile nükleusu terkeder (Li et al. 2003, Bohnsack et al. 2004, Lund et al. 2004). Drosha sadece hayvanlarda korunmuştur (Filippov et al. 2002, Wu et al. 2000, Fortin et al. 2002). Her ne kadar bitkiler geniş bir çeşitlilikteki miRNA'ları ekspres etselerde Drosha homoloğu barındırmazlar. Bunun yerine bu basamak bir Dicer homoloğu olan Dicer-like 1 proteini ile yürütülür (Kurihara and Watanabe 2004).

Farklı canlı türlerindeki tüm farklılık ve benzerliklerine rağmen RNA susturma mekanizmasının ortak bir başlangıç basamağı vardır. Uzun dsRNA (sentetik dsRNAlar ya da nükleus kaynaklı pre-miRNA, shRNA), kısa dsRNA fragmentlerine parçalanır (siRNA) ve efektör basamakta bu fragmentler bir protein kompleksine dahil olduktan sonra açılarak homolog mRNA'nın tanınması ve yıkılması için rehber dizi olarak kullanılırlar (Schmitz and Schepers 2004). Tüm RNA susturma yollarının ortak karakteristik özelliği dsRNA tarafından başlatılması, uzun dsRNA'nın çift iplik spesifik RNaz olarak adlandırılan “Dicer” tarafından yıkılmasıdır (Bernstein et al. 2001). Dicer, dsRNA'yı 21-25 nükleotid uzunluğundaki “short interfering RNA” ya da kısaca siRNA dublekslerine ayırır. Önceki çalışmalar siRNA'ların kendilerine has 3' uçlarında 2 nükleotidlik overhang yapılarının olduğunu (Hamilton and Baulcombe 1999, Parrish et al 2000), fosforile olmamış hidroksil gruplarının bulunduğunu (Elbashir et al. 2001b), ve bunların da diğer RNAi bileşenlerini tanımada hayati rol oynadıklarını ortaya koymuştur (Schepers 2005). Çeşitli çalışmalar bu işlemin sitozole özgü olduğunu göstermiştir (Zeng and Cullen 2002).

siRNA'lara benzer şekilde endojen miRNA'lar da Dicer-spesifik kesim sonucu 5' monofosfat ve 3' hidroksil gruplarına sahiptirler (Elbashir et al. 2001a-b , Hutvagner et al. 2001). Ancak miRNA'lar hedeflerini mükemmel olmayan eşleşme ile bulmaktadırlar. Bu mükemmel

olmayan eşleşmeden dolayı hayvanlarda miRNA'ların olası hedeflerini ve fonksiyonlarını tahmin etmek güçleşmektedir (Schepers 2005). siRNA ve miRNA'ların fonksiyonel olarak değişken olabildikleri bulunmuştur. Eğer sentetik siRNA'lar düşük komplementerlik yüzdesine sahipse hedef translasyon, degradasyon yerine inhibisyona uğrarken (Ambros et al. 2003b) miRNA'lar mükemmel eşleşme gösterdikleri zaman mRNA yıkımına neden olurlar (Hutvagner and Zamore 2002a, Zeng and Cullen 2003, Doench et al. 2003).



Şekil 2.3. 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA

Dicer tarafından 21-23 nükleotidlik siRNA'lara işlendikten sonra RISC adı verilen RNA indüklü sessizleştirme kompleksi bu siRNA'ları tanır ve helikaz aktivitesi yardımıyla çift ipliği birbirinden ayırır, serbest kalan antisens iplikçiği kendine bağlar. Kompleks, mRNA'nın komplementer ipliğini tanıyabilme yeteneğindedir ve bu mRNA'yı yapısında barındırdığı Ago2 proteini aktivitesiyle yıkar (Liu et al. 2004, Song et al. 2004).

RNAi ile yapılan ilk mekanistik çalışmalarda yeni oluşmuş siRNA'ların bazı bilinmeyen proteinlerle ribonükleotid kompleksleri oluşturduğu varsayılıyordu. Bu, RNA dubleksinin açılmasını ATP bağımlı bir şekilde sağlıyor ve "RISC" adı verilen RNA indüklü sessizleştirme kompleksinin final aktivasyonuna yönlendiriyordu. Sonunda bu kompleks de siRNA'nın antisens ipliğini alıp hedef mRNA'ya gidiyordu (Zamore et al. 2000). Son çalışmalar Dicer ile RISC'in bazı bileşenlerinin birlikte saflaştırılabildiğini, bunun da başlangıç ve efektör kompleksi arasında bir ilişki bulunduğunu, Dicer'in de final hedef yıkımında gerekli olmadığını ortaya koymaktadır. Bu iki reaksiyon basamağı arasındaki bağlantı siRNA'nın transferi kısmıdır, çünkü siRNA sitoplazma içinde serbestçe kendi başına hareket edemez (Schepers 2005). Protein kompleksi ile ilgili son çalışmalar RISC'in DEAD-box helikaz ve nükleaz içerdiğini göstermiştir. RISC kompleksinin anahtar bileşeni Ago

proteinleridir. Ago ailesi proteinleri küçük RNA'ların rehber olarak kullanılıp gen hedeflerinin susturulduğu efektör basamakta sürece dahil olurlar. Ago ailesi proteinleri yüksek oranda korunmuş, PAZ ve PIWI adında fonksiyonları için çok önemli iki adet domain içerir. PAZ domaini rehber antisens RNA'nın 3'- ucuna bağlanılmasını sağlar (Song et al. 2003b). PIWI domain ise DDH motifi içeren RNaz H enzimlerinin çekirdek domainine yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu üç amino asidin varlığı, Ago ailesi üyelerinin içsel slicer aktivitesini sağlar. Ne var ki slicer aktivitesi, mRNA hedefine rehber RNA'nın komplementerliği ile belirlenir. Eğer rehber RNA ve hedef mRNA tam olarak uyuşuyorsa, RISC, hedef mRNA'ya bağlanan RNA'nın 5'- ucundan itibaren 10 nükleotid ilerisine denk gelen noktadan mRNA'yı keser (Elbashir et al. 2001). Eğer komplemeterlik yüksek ökaryotlardaki bir çok miRNA gibi mükemmel değilse birkaç durum mevcuttur; translasyonel başlangıç ya da uzamanın inhibisyonu, deadenilasyon, nükleaz degradasyonu için sitoplazmik P cisimciklerine transferi ya da bu üç durumun kombinasyonu gerçekleşir (Valencia – Sanchez et al. 2006).

Kimyasal olarak sentezlenmiş kısa dsRNA'larla yapılan çalışmalar sadece 21-23 baz çifti uzunluğundaki siRNA'ların RISC'e integrasyon yapabilme yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Hammond et al. 2000). Ayrıca 19-29 nükleotidlik tek iplikçikli antisens RNA da daha az etkili bir şekilde RNAi yolağına katılabilir (Martinez et al. 2002, Schwarz et al. 2002).

Memeli Ago protein ailesi 8 üyeden meydana gelir. 4 tanesi ubikutöz eksprese olan Ago alt ailesi, ve 4 tanesi de germ hücrelerinde eksprese olan Piwi ailesidir (Hall et al. 2005). Ago alt ailesine mensup her bir Ago proteini ; Ago1, Ago2, Ago3 ve Ago4, miRNA'lar ile ilişki kurar ve translasyonel represyonla ilgilidir (Liu et al. 2004, Meister et al. 2004, Pillai et al. 2004). Ne var ki, sadece Ago2 antisens RNA ile baz çifti oluşturan mRNA'yı bu dubleksin ortasından yıkabilmektedir (Liu et al. 2004, Meister et al. 2004, Song et al. 2004).

miRNA ve siRNA temelli post-transkripsiyonel gen susturulması (PTGS)'ye ek olarak Ago proteinleri transkripsiyonel gen susturulmasında da efektör olabilir. Mekanizması bitkilerde ve *Schizosaccharomyces pombe*'de karakterize edilmiş olan özelleşmiş Ago kompleksleri

nükleusa girer ve kromatin yapısını etkiler, baskılayıcı histon modifikasyonları gerçekleştirir (Irvine et al. 2006).

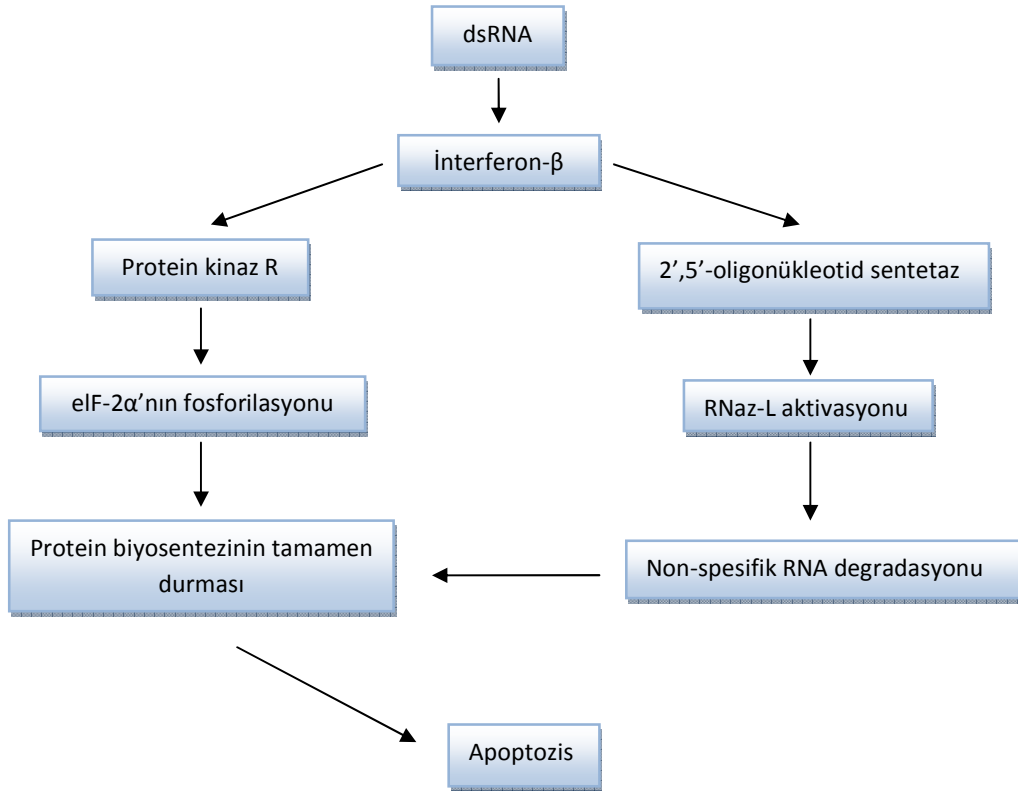
siRNA'nın hangi iplikçığının RISC'e entegre olacağını ve hangi iplikçığın yıkılacağını 5'-uçların stabilitesi belirler (Schwarz et al. 2003). A-U baz eşleşmesi ile başlayan 5'-uçlar, G-C baz eşleşmesi ile başlayan 5'- uçlara tercih edilmektedir, yani daha az stabil 5'- ucuna sahip olan iplikçik RISC tarafından tercih edilir. Doğal ve sentetik siRNA'lar üzerinde yapılan çalışmalara dayanılarak , fonksiyonel iplikçiklerin 5'- uçtan itibaren 9-14 bazlık bölgelerin daha az stabil olduğu ortaya çıkmıştır (Khorova 2003). 5'- instabilitesinin, sarmalın DEAD-box helikaz tarafından birbirinden ayrılması için gerekli olduğu da düşünülmektedir (Nykänen et al. 2001).

Bir miktar siRNA ipliğinin hücreye girişiyle nasıl olupta büyük miktardaki hedef mRNA'nın yıkımını sağlayabildiği araştırılmıştır. RNAi'nin antisens yaklaşımdan neden çok daha etkin olduğu sorusu araştırmacıları RNA-bağımlı RNA polimerazlar , "RdRp"ler üzerinde çalışmaya yöneltmiştir. RdRp'ler karakteristik olarak RNA-virus replikasyonunda RNA'yı kalıp olarak kullanarak komplementer RNA'lar sentezlenmesiyle ilişkilendirilmiştir (Schepers 2005). RdRp'ler hedef mRNA'yı kalıp, yıkılmış birincil siRNA'ları ise primer olarak kullanır. Bu da ikincil siRNA popülasyonu oluşturur, bu durum daha fazla sayıda aktif RISC kompleksine ve dolayısıyla daha fazla mRNA'nın yıkımına yol açar (Lipardi et al. 2001, Sijen et al. 2001). RdRp ailesinin üyeleri *C. elegans* (Smardon et al. 2000,Sijen et al. 2001, Simmer et al. 2002) , *Arabidopsis* (Dalmay et al. 2001, Mourrain et al. 2000), *Neurospora*'da (Cogoni ve Macino 1999) tanımlanmış ancak *Drosophila* ve insanlarda ikincil siRNA'ların oluşumu için hücrel RdRp'ler tanımlanmamıştır (Stein et al. 2003). Bu yüzden RNAi'nin yüksek verimde gerçekleşmesi RISC kompleksinin katalitik doğasıyla mümkün olmaktadır.

2.4. Memelilerde RNA İnterferans

C. elegans ve *Drosophila*'da gözlemlenen RNAi tekniğinin uygulamaya yönelik merak uyandırıcı özellikleri bu tekniğin memelilere ve dolayısı ile insan hücrelerine adapte edilmesine yönelik araştırmalara odaklanılmasına yol açmıştır. Memelilerin parazitik ve viral

dsRNA'larla başa çıkabilmek için omurgasız hayvanlar ve bitkilerden farklı yollar geliştirmiş olması bu canlı grubunda RNAi'nin uygulanmasını bir süre için engellemiştir. Çünkü memeli hücrelerinde dsRNA interferon cevabına yol açmaktadır. Bunun sonucunda RNaz L aktive olup ayırım gözetmeksizin tüm mRNA transkriptlerini degrade eder. Aynı anda γ -interferon, protein kinaz R (PKR)'nin aktivasyonunu tetikler, bu da transkripsiyon faktörü EIF2 α 'nın fosforilasyonuna dolayısıyla inaktivasyonuna neden olur. Sonuçta protein sentezi global olarak durur ve apoptozis, yani programlı hücre ölümü meydana gelir (Clemens 1997, Clemens and Elia 1997). Bu sebepten ötürü memeli hücrelerinde RNAi'nin indüklenemeyeceği düşünülmüştür.



Şekil 2.4. Memelilerde dsRNA ve interferon cevabı mekanizması

RNAi'nin memeli hücrelerinde uygulanamayacağına ilişkin tartışmalara rağmen birkaç bağımsız grup, interferon makinesinden yoksun hücre hatlarına dsRNA girişiyle ya da dsRNA üreten vektörlerle memeli hücrelerinde RNAi yolağının varlığını göstermiştir. Bu gruplar fare oositleri ya da embriyonik fare kanser hücre hatları ile çalışmışlardır (Wianny and Zernicka-

Goetz 2000, Billy et al. 2001). Ne varki çoğu somatik memeli hücresi bu yaklaşıma çok güçlü bir sitotoksik cevap göstermiştir. Bitki ve nematodların aksine, memeli hücre hatlarında RNAi'nin çok güçlü sınırlamaları vardır ve çoğu memeli hücre tipine büyük dsRNA girişi yaklaşımı mümkün değildir.

Memelilerde dsRNA'nın gen susturulmasını tetikleyebileceğine ilişkin ilk kanıt fare oostileri, pre-implantasyon embriyoları (Svoboda et al. 2000, Wianny and Zernicka-Goetz 2000) ve embriyonik hücre hatları (Billy et al. 2001, Yang et al. 2001, Paddison et al. 2002a). Bu hücre tiplerinde çoğu somatik hücre hattında bulunan antiviral cevaplar bulunmaz. Bu tür cevaplar protein kinaz R (PKR) ve RNaz L yolaklarını içerir, 30 baz çiftinden uzun dsRNA tarafından tetiklenir ve sonuçta non-spesifik translasyonel represyon ve apoptozis gerçekleşir. Bu bilgiler ışığında gen susturmanın, RNAi yolağının anahtar oyuncuları olan Dicer ve Ago'nun güçlü korunmuşluğu göze alındığında ve somatik hücre tiplerinde non-spesifik dsRNA cevabının kaldırılması durumunda mümkün olabileceği düşünülmüştür. Ne var ki, non-spesifik dsRNA cevapları hücrelerden uzaklaştırıldığında bile, viral inhibitörler ya da uzun dsRNA, gen ekspresyonunun non-spesifik represyonunu tetiklemiştir (Abraham et al. 1999, Paddison et al. 2002a). Bu tip non-spesifik dsRNA cevaplarının aşılmasında bir yol olarak, 30 baz çiftinden kısa dsRNA kullanımı önerilmiştir. Bu uzunluktaki dsRNA'lar PKR ve Rnaz L'yi harekete geçirilmeden RNAi'yi tetikleyebilirler.

RNAi tekniğini memeli fonksiyonel genomüne uygulamalarıyla Tuschl ve arkadaşları bir devrim yaratmıştır (Elbashir et al. 2001a). Bu grup, 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA'ların memeli kültür hücrelerinde programlanmış hücre ölümü cevabına yol açmadan RNA interferans mekanizmasını harekete geçirebileceklerini keşfetmiştir. Bu siRNA'lar büyük olasılıkla interferon cevabını tetiklemek için çok kısa ve homolog mRNA'ların dizi spesifik yıkımını yönlendirecek potansiyele sahiptir (Hutvagner et al. 2000). Daha sonra Tuschl ve ekibi tarafından yapılan çalışmalar 21 baz çiftinden kısa ve 25 baz çiftinden uzun dsRNA'ların ve küt uçlu siRNA'ların RNAi mekanizmasını başlatmakta yetersiz olduğunu ortaya koymuştur (Elbashir et al. 2001c).

Memeli hücrelerinde dizi spesifik gen susturulmasını antiviral cevapları aktive etmeden harekete geçirebilecek iki kısa dsRNA yapısı bildirilmiştir, bunlar siRNA'lar ve shRNA'lardır. Küçük dsRNA'ların memelilerde RNAi'yi tetikleyebileceğine ilişkin ilk basılan makale (Elbashir et al. 2001) ve shRNA'ların Dicer tarafından işlenmiş ürünlerinin memeli hücrelerinde dizi spesifik gen susturulmasını tetikleyebileceği (Caplen et al. 2001) Tuschl ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. siRNA'lar homolog mRNA hedeflerini tanımlayabilmek için 19 nükleotidlik çift zincir RNA ve 3'- uçlarında 2 nükleotidlik overhang yapısı bulunduran 21-23 nükleotid uzunluğundaki yapılardır ve bu yapılar Dicer işlenmesini es geçip Ago içeren komplekslere direkt inkorpore olarak susturma yolağına katılabilirler. Aynı zamanda alternatif bir strateji olarak, çeşitli gruplar memeli hücrelerinde küçük dsRNA'ların *in vivo* ekspresyon yapılarını geliştirmişlerdir, bunlar endojen olarak eksprese olan kısa saçtokası RNA'lar yani shRNA'lardır (Paddison et al. 2002b, Brummelkamp et al. 2002a, McManus et al. 2002, Paul et al. 2002, Sui et al. 2002, Yu et al. 2002, Zeng et al. 2002). Bu yapılar siRNA'lardan farklı olarak, saçtokası yapısı bulundururlar, optimal olarak 23-29 nükleotidlik RNA dubleksini oluştururlar ve RNAi yolağına katılabilmek için Dicer tarafından işlenmeleri gerekir. Sadece 3'- yapışkan ucunda 2 nükleotid bulunan dsRNA'lar, Dicer'in doğal olarak aktif ürünleridir ve RNAi'nin etkin elemanlarıdır. Bu teknoloji ile memelilerde somatik primer nöronlar bile RNAi fenotipleri oluşturulmasında başarılı sonuçlar vermiştir (Krichevsky and Kosik 2002).

shRNA'lar, hangi RNA polimeraz tarafından eksprese edildiklerine göre kategorize edilebilirler. En popüler strateji, 19-25 baz çiftlik basit saç tokaları, RNA polimeraz III tarafından; insan/fare U6-snrRNA ya da insan RNazP (H1) RNA promotorları ile eksprese ettirilir ve sonuç olarak 3' uçlarında 2 nükleotidlik overhang yapısı barındırırlar. İkinci shRNA ekspresyon stratejisi ise RNA polimeraz II promotorlarının kullanımınıdır. Ne var ki, basit saç tokasının yerine, bu shRNA'lar RNA polimeraz II promotorlarınca eksprese edilen endojen miRNA'lar incelendikten sonra modellenmiştir. miRNA temelli shRNA'ların basit saçtokası yapılarına karşı bazı üstünlükleri vardır. İlki, shRNA ekspresyon platformlarına büyük bir esneklik sağlar, iyi karakterize edilmiş olan örneğin tet-regüle ya da doku spesifik promotora sahip Pol II ekspresyon sistemlerinden eksprese ettirilebilirler (Yu et al. 2002, Dickins et al. 2005, Stegmeier et al. 2005, Shin et al. 2006). İkincisi, tam 22 nükleotidlik dizi Drosha ve

Dicer işlenmesi olmadan direkt RISC ile bütünleşir. Eksprese shRNA'lara ek olarak, kimyasal ya da *in vitro* sentezlenmiş olan shRNA'ların kullanımı da oldukça efektiftir (Siolas et al. 2005). Kimyasal olarak sentezlenmiş 25-29 nükleotidlik dsRNA'lar ve 2 nükleotidlik 3'-overhang yapıları aynı hedef diziyeye yönelik siRNA'lardan 5- 10 kat daha az konsantrasyonda bile daha etkindir (Paddison 2008). siRNA'lardan daha etkin olmasının sebebi, direkt RISC ile bütünleşmektense Dicer ile yolağa girerek RNAi'yi tetiklemek olabilir.

siRNA, shRNA ve geçici olarak transfekte shRNA vektörlerin asıl kısıtlayıcı yönleri, memelilerde stabil ya da indüklenabilir gen susturulmasını sağlayamamalarıdır. Memeli hücre sistemlerinde, geçici RNAi tetikleyicilerinin transfeksiyonu, örneğin uzun dsRNA, siRNA ve shRNA'ların geçici etkileri vardır. Memeliler ve *Drosophila* dışındaki sistemlerde var olan amplifikasyon basamaklarından yoksun olmaları sebebiyle bu etki 2-7 gün sürer. Bu yüzden, siRNA'ların belirli yarı ömürleri ve her bir hücre bölünmesiyle ve RISC kompleksinden geçmeleri dolayısıyla dilüe olmaları söz konusudur. Ne var ki, iyi karakterize stabil ekspresyon teknolojileri sayesinde, shRNA ekspresyonu ile kombine olarak memelilerde *in vitro* ve *in vivo* olarak stabil gen susturulmasını sağlanabilmektedir. Son raporlar doğrultusunda, stabil RNAi, plazmit integrasyonu, (Brummelkamp et al. 2002a, Paddison et al. 2002b, Carmell et al. 2003), epizomal plazmit girişi (Miyagishi and Taira 2002) ve retroviral taşınım (Paddison and Hannon 2002, Brummelkamp et al. 2002b, Devroe and Silver 2002, Barton and Medzhitov 2002, Qin et al. 2003, Tiscornia et al. 2003, Hemann et al. 2003) kullanılarak bildirilmiştir. Özellikle retrovirüsleri; adenovirüsleri ya da adeno-ilişkili virüsleri kapsayan taşınma stratejileri RNAi'yi *in vitro* olarak manipüle edilmesi zor olan primer hücrelerde çalıştırmak için cazip araçlardır.

Eksprese shRNA kullanarak somatik hücrelerde RNAi'yi tetikleme yeteneği, bu RNAi yapılarının hayvanlarda hedef genin baskın transgen supresörü olarak kullanılabileceğini akıllara getirmiştir. Çeşitli gruplar bu doğrultuda transgenik farede (Carmell et al. 2003, Rubinson et al. 2003), transplante fare hematopoietik kök hücrelerinde (Hemann et al. 2003, Qin et al. 2003) ve erişkin fare karaciğerinde (McCaffrey et al. 2002, Song et al. 2003a) shRNA-temelli gen susturulmasını bildirmişlerdir.

2.5. siRNA Tasarımının Temel Kuralları

Memeli hücrelerinde RNAi'yi tetiklemedeki ilk başarılı denemede kısa dsRNA'lar, RNAi yolağındaki siRNA ara basamağını taklit etmek için kullanıldılar (Elbashir 2001). Ne var ki *in vitro* oluşturulan siRNA, RISC tarafından tanınabilmek ve etkin bir şekilde RNAi'yi yürütebilmek için bir takım niteliklere sahip olmalıdır;

- 21-23 nükleotidlik olan siRNA'lar en etkin olanlardır.
- 21 baz çiftinden küçük, 25 baz çiftinden büyük dsRNA'ların etkinliği çok azdır.
- 30 baz çiftinden büyük dsRNA'lar interferon cevabına neden olurlar.
- Ekzojen siRNA'ların çift iplik olan 19 nükleotidlik kısmı ve 3'- uçlarında 2 nükleotidlik overhang yapıları bulunur. Bu durum siRNA'ların tip III RNazlar tarafından tanınmaları için elzemdir.
- Tuschl ve ark. tarafından belirtildiği üzere 3'-UU uçları ya da DNA'daki karşılıkları 3'-TT, siRNA'ların stabilitesini artırır ve genelde diğer dizilere tercih edilir (Elbashir et al. 2001a).
- Sens iplikçikteki uçlarda yapılan kimyasal modifikasyonlar (floresan proplar eklenmesi gibi) genelde tolere edilirken, antisens iplikçikteki en ufak değişimler bile etkinlikte dramatik düşümlere yol açmaktadır. (Chiu and Rana 2002).

Hedef tanınması süreci fazlasıyla dizi spesifiktir, fakat siRNA'nın tüm dizilimleri eşit hedef tanımlanmasına yol açmaz. siRNA dupleksinin merkezindeki yanlış eşleşmeler hedef mRNA yıkımını engelleyebilir (Elbashir et. al. 2001c).

Diğer çalışmalar da nokta mutasyonlarının susturma potansiyelinde çok küçük etkisinin olduğunu, bunun da susturma makinesinin mükemmel eşleşmeye ihtiyacı olmadığını desteklemektedir (Boutla et al. 2001, Holen et al. 2002). Antisens iplikçığın yarısının 5'- tarafının integrasyonu RNAi için önemlidir, bu da ipliklerin ayrılmasının başlatılmasında siRNA'nın tanınmasının asimetrik doğasına işaret eder (Chiu and Rana 2003). Detaylı mutasyon taramaları 5'- uçtan itibaren ilk 10 nükleotidte oluşabilecek yanlış eşleşmelerin

RISC-temelli hedef mRNA yıkımında çok daha önemli olduğunu ortaya koymuştur (Elbashir et al. 2001c, Chiu and Rana 2003). 3'- uçtaki yanlış eşleşmelerin etkileri çok hayati değildir (Amarzguioi et al. 2003). siRNA'nın sadece antisens değil sens iplikçığının 11 tane uyuşan nükleotidi olsa bile hedeflenmemiş genlerin susturulmasına yol açabildiği bildirilmiştir (Jackson et al. 2003). Bu susturma etkisine "off-target effect" yani yanlış hedef etkisi adı verilir. Etkin bir RNAi deneyi yürütebilmek için, yanlış hedef etkisi hesap edilmeli ve siRNA'lar buna göre tasarlanmalıdır. Tasarlanan siRNA'lar olası başka hedefler için BLAST analizinden geçirilmelidir. 5'- ucu komplementer iplikçığıne zayıf bağlanan iplikçik RISC ile daha kolay inkorpore olur. Bu yüzden 5'- ucunda A/U bulunan iplikçığının antisens iplikçik olmasına dikkat edilmelidir (Schepers 2005).

2.5.1. Etkin siRNA Tasarımı

En etkin siRNA'yı tasarlamak için birçok kural mevcuttur ve bunlar matematik algoritmalarından ziyade siRNA validasyon deneylerinden elde edilen tecrübelerle dayalıdır. Bu algoritmaların büyük bir bölümü web'de araştırmacıların hizmetindedir ve %70-90 oranında verimle çalışan siRNA'lar oluşturacaklarını garanti etmektedirler. Eksojen siRNA'lar tipik olarak 19 baz çiftlik, çift iplikçikli kısımdan ve 3' uçlarında 2 nükleotidlik overhang yapılarından oluşurlar.

1. mRNA içinde %45-50 oranında G/C içeriği bulunan bir bölge seçilir.

Not: Eğer hedef bölge AA ile başlamıyorsa, % G/C oranını bulabilmek için genin kodlama bölgesinden 23 nükleotidlik bir dizi seçin.

Not: %50 G/C oranına sahip bir siRNA genelde iyi sonuç verir, ancak daha yüksek oranlara çıkıldıkça susturma aktivitesinde azalmaya neden olur.

2. Üstüste çoklu baz tekrarlarından kaçınılmalıdır, 3'ten fazla Guanozin, Sitozin ve 4'ten fazla Adenozin aynı sırada yer almamalıdır.

Not: Çoklu G ve C dizileri siRNA susturma mekanizmasını engelleyebilecek aglomeratlar oluşturabilir, poliA dizileri de prematüre transkripsiyon terminasyonuna yol açarak shRNA sentezini engelleyebilir.

3. 5'-UTR bölgelerinden kaçınılmalıdır, çünkü protein bağlanma bölgeleri içerebilirler ve bunun sonucunda hedef tanınmasını bloke edebilirler, bu yüzden AUG kodonundan en az 100 nükleotid ilerdeki bölgelerden araştırmaya başlanılmalıdır.

Not: 3'-UTR bölgeleri uygun hedef dizileridir ve korunmuş genlerin istenmeyen knock- down edilmesini önlemek için çok özgül bölgeler olabilir.

4. Çoklu gen hedeflenmesini engellemek için seçilen siRNA'nın sens dizisine BLAST (nucleotide BLASTN) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ya da Smith-Waterman algoritmasını kullanan <http://www.paralign.org/> internet sitelerinde kapsamlı bir homoloji araştırması yapılmalıdır.

Not: BLAST kullanımı kolay ve %100 başarılı bir şekilde sonucu garanti etmektedir.

5. İstenmeyen yanlış gen hedeflenmesi riskini azaltmak için aynı homoloji araştırması antisens iplikçik için de yapılmalıdır.

6. Farklı siRNA'ların susturma etkisinin spesifikliğini kontrol etmek için aynı hedefe yönelik en az iki tane siRNA tasarlanmalıdır (Schepers 2005).

Ayrıca Khvorova ve ekibince (Reynolds et al. 2004) hazırlanan kriterler de etkin siRNA tasarımında araştırmacılara yardımcı olabilir (Tablo 2.1.)

Kriter I.	G/C yüzdesi = 30-52 %
Kriter II.	15-19 pozisyonunda 3 ya da daha fazla A/U (sens iplikçik) olmamalı
Kriter III.	Saç tokası tahmini (internal tekrarlar ya da palindromlar olmamalı) $T_m < 20^\circ\text{C}$
Kriter IV.	Pozisyon 19'da A (sens iplikçik)
Kriter V.	Pozisyon 3'te A (sens iplikçik)
Kriter VI.	Pozisyon 10'da T (sens iplikçik)
Kriter VII.	Pozisyon 19'da G ya da C olmamalı (sens iplikçik)
Kriter VIII.	Pozisyon 13'te G olmamalı (sens iplikçik)

Çizelge 2.1. Etkin siRNA tasarımında Khvorova ve ekibi tarafından hazırlanan kriterler

2.6. siRNA Oluşturma Yöntemleri

Kullanılacak amaca yönelik olarak uygun sistem belirlenmeli ve uygulanmalıdır. siRNA elde edebilmek için kullanılan yöntemler ana olarak ikiye ayrılmaktadır;

1. İn vitro/kimyasal yöntemler

- Kimyasal sentez
- *In vitro* transkripsiyon
- Uzun dsRNA'ların Rekombinant Dicer ile işlenmesi
- Ticari olarak satılan hazır siRNA kütüphaneleri

2. Ekspresyon vektörleri

- Plazmit vektörler
- Lentiviral vektörler

2.6.1. *In vitro* / Kimyasal Yöntemler

2.6.1.1. siRNA'ların Kimyasal Sentezi

RNA setezi iyi bir kimya bilgisi ve laboratuvar donanımı gerektirmektedir. Eğer bunlardan herhangi biri yetersiz ise, en iyisi ticari bir kaynaktan siRNA sipariş etmek olacaktır. Çünkü bu süreçler oldukça pahalıdır. DNA oligonükleotidlerinin elde ediliő büyük oranda optimize edilmiştir ancak RNA sentezinde durum oldukça farklıdır. RNA interferansın memelilerde indüklenebileceğinin keşfedilmesi ile RNA oligonükleotidlerinin kimyasal sentezinde gelişmeler olmuştur.

DNA molekülünden farklı olarak RNA molekülünde her bir riboz halkasının 2' - pozisyonunda bir tane fazladan hidroksil grubu vardır, bu da RNA'nın normal şartlar altında destabilizasyonuna yol açar. RNA sentezinde en zor basamak 5' - ve 2' - hidroksil gruplarının solid faz kimyasında simültane olarak korunmasıdır. Raslantısal olarak ek bir 2'-OH koruyucu grup bazı özelliklere sahip olmalıdır; sentezin sonunda kantitatif olarak uzaklaştırılabilmeli ve

tüm reaksiyon şartlarında stabilitesini koruyabilmelidir. 2' - OH koruyucu gruplar temel olarak üç sınıfa ayrılabilir;

- Asit (Scaringe et al. 1998)
- Foto (Ohtsuka et al. 1974, Scwartz et al. 1995, Pitsch et al. 1999)
- Floridlabil (Beaucage and Caruthers 1996)

Geçen birkaç yıl içinde 2 özgün siRNA/RNA üretim stratejisi rapor edilmiştir;

1.Fosforamidlere 2'-OH pozisyonunun korunması için 2'-O-[(triizopropilsilil)oksi]metil, kısaca TOM eklenmesi (Pitsch et al. 1999) yöntemidir ve Qiagen tarafından kullanılmaktadır.

2.Daha yeni olarak da, Dharmacon tarafından uygulanan asit labil 2'-ortoester (bis(2-asetooksietoksi)metil kısaca (ACE) ortoester ve bir 5'-silil eter grup (bis(trimetoksiloksi)siklododesisiloksilil kısaca (DOD) eter kombinasyonuna dayanan yöntemdir (Scaringe 2001).

Sonuç olarak kimyasal olarak sentezlenmiş olan siRNA'lar oldukça pahalıdır ancak enzimatik sentez de kimyasal prosesin sunmuş olduğu saflık ve verimle yarışmamaktadır. Seçilen siRNA'Nın yüksek verimle çalışacağı %100 garanti değildir ve aynı hedefe yönelik birden fazla siRNA oluşturulup validasyonu sağlanmalıdır (Schepers 2005).

2.6.1.2. *In vitro* Transkripsiyon

siRNA'lar kimyasal sentezin yanısıra daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem olan *in vitro* transkripsiyonla da hazırlanabilir. Ticari olarak satılan çeşitli kitler mevcuttur.

Bunlara örnek olarak Promega'nın sunmuş olduğu T7RiboMAX Express RNAi System uzun dsRNA ve siRNA sentezi için uygundur. Kısa DNA oligonükleotidleri G(N17)CTT motifine sahip 21nükleotidlik diziler kodlar. 5'- uçtaki Guanozin T7 RNA Polimeraz enziminin tanıma sekansıdır. 3'- uçta da 2 tane Timin bulunur. Enzimin etkin bir şekilde transkripsiyonu başlatabilmesi için GTP'ye ihtiyacı vardır ve bundan dolayı sentezlenmek istenen dizi

seçilirken bu durum göz önüne alınmalıdır ve aynı hedefe yönelik 3 ayrı oligo tasarlanmalıdır. Optimal transkripsiyon başlangıcı için GGG ve bunları takip eden 17-22 gen spesifik nükleotid gereklidir ve A/T'den ilk 3 bazda kaçınılması verimi büyük oranda artırır ancak susturmanın etkinliğini de azaltır. Enzim tarafından oluşturulan siRNA'ların fosfataz ile 5'-fosfat grupları alınır, elde edilen RNA iplikleri siRNA'ları oluşturur. Kalan tek iplikli RNA'lar ve DNA nükleaz digesyonu ile ortamdan uzaklaştırılır. Elde edilen siRNA izopropanol çöktürme yöntemi ile saflaştırılır ve RNAi uygulamalarında kullanılabilir hale gelir.

Başka bir örnek ise Ambion firmasının geliştirdiği Silencer platformudur. Avantajı, siRNA'lar G ya da GGG ile başlamak zorunda değildir. Kalıp DNA sistemine yerleştirilir ancak siRNA dizisinin bir parçası değildir. Daha sonra mevcut siRNA'dan RNaz digesyonu ile uzaklaştırılabilir. DNA dizisi 29 nükleotidlik olup ilk 8 baz T7 promotor primerinin 5'-ucundakilerle komplementer olmalıdır. siRNA'nın etkinliğinin artırılması için nükleotid karışımı modifiye UTP içermelidir. Oluşan dsRNA 5'- terminal tek iplikli ilder diziler, 19 nükleotidlik hedefe spesifik dsRNA ve 3'- terminal UU içermektedir. Kalıp DNA DNaz ile sindirilir, uçta kalan tek iplikçikli T7 promotor oligonükleotid de tek ipliğe spesifik ribonükleaz ile uzaklaştırılır. RNaz T1, UU overhang yapısına dokunmaz.

Bu 2 örneğin temsil ettiği *in vitro* transkripsiyon yöntemi siRNA elde etmek için kullanılan en ucuz yöntemdir. Zaman ve malzemedan tasarruf sağlarken elde edilen en etkin siRNA hedefi %90 oranında susturabilir. Yöntem uygulanırken gen başına 3-5 farklı siRNA tasarlanmalı ve kontrol için *G3PDH* ya da *ACTB* genlerine spesifik siRNA'lar da kullanılmalıdır. Bu yöntem ile elde edilen siRNA'lar interferon cevabına yol açabilir (Kim et al. 2004). 5'- uçtaki üçlü fosfat bölgesi defosforilasyon enzimleri ya da RNaz T1 ile uzaklaştırılırsa interferon cevabı riski ortadan kalkar (Kim et al. 2004).

2.6.1.3. Uzun dsRNA'nın Enzimatik Yıkımı ile siRNA Elde Edilmesi

siRNA elde etmenin bir başka yolu da uzun dsRNA'ların rekombinant *Drosophila* Dicer ya da *E. coli* RNaz III tarafından enzimatik yıkımıdır (Yang et al. 2002a). Eğer rekombinant enzim ekspresyonu laboratuvarında yürütülebilirse oldukça kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ökaryotik

organizmalardan fare (Nicholson and Nicholson 2002), insan (Provost et al. 2002, Zhang et al. 2002, Kawasaki et al. 2003, Myers et al. 2003) ve *Drosophila* (Schepers, 2005) Dicer enzimi klonlanmıştır. Türden türe değişiklik göstermekle beraber, Dicer enzimi 215-250 kDa ağırlığında bir polipeptittir ve bu ağırlığından dolayı rekombinant olarak bakteri hücrelerinden ziyade ökaryotik böcek ya da memeli hücrelerinde ifade ettirilmelidir (Provost et al. 2002, Kawasaki et al. 2003, Myers et al. 2003). Dicer RNAi yolağına katıldıktan sonra dsRNA'lardan 21- 23 nülkeotid uzunluğunda siRNA'ları oluşturmaya başlar. İn vitro rekombinant insan Dicer'ı yıkım sürecinde Mg+2 ye ihtiyaç duyar ancak ATP'nin bu süreçte gerekli olmadığı gösterilmiştir (Provost et al. 2002, Zhang et al. 2002). Rekombinant Dicer ile uzun dsRNA'nın digesyonu sonucunda aynı hedef mRNA için birden fazla siRNA'nın oluşturduğu bir havuz meydana gelir. Neticede aynı gen ailesindeki mevcut hedef mRNA ile homolog olan dizilerden kaçınılmalıdır. %70'ten fazla verim alınabilmektedir. Elde edilen siRNA'lar ana dsRNA'dan jel filtrasyon kromatografisi ya da jel pürifikasyon basamaklarıyla birbirinden ayrılabilir.

Ökaryotik Dicer'in prokaryotik sistemlerde eksprese edilemeyecek kadar büyük olması, prokaryotik sistemde daha verimli protein üretilebilmesi ve üretilen proteinin saflaştırma işlemlerinin daha kolay olması bazı grupları ve şirketleri *E. coli* RNaz III (30 kDa) elde etme çalışmalarına yöneltmiştir. *E. coli* RNaz III, *E. coli* hücresinde glutatyon-S-transferaz (GST) füzyon proteini olarak eksprese ettirilerek rekombinant enzimin pürifikasyonu sağlanabilir. dsRNA'nın digesyonu GST füzyon şapkası kaldırılmadan da gerçekleştirilebilir, bu endoribonükleaz ile elde edilen siRNA (esiRNA) daima 12-25 baz çifti uzunluğundadır. Digesyon şartlarının optimizasyonu ile 21 nükleotidlik siRNA'lar elde edilebilir. Uzun dsRNA'nın aksine esiRNA, kültüre edilmiş memeli hücrelerinde belirgin non-spesifik etki yaratmadan etkin RNA interferans sağlar. Çoğu şirket artık sadece 21-23 nükleotidlik fragmentler oluşturan modifiye rekombinant *E. coli* RNaz III geliştirmiştir. Buna örnek olarak da "New England Biolabs -Shortcut RNAi Kit" verilebilir.

Gelişim safhasındaki memeli embriyolarında gen ekspresyonunun susturulmasına yönelik ilk denemelerde esiRNA'lar nöral tüp lümenindeki spesifik bölgelere injekte edilmiş ve

yönlendirilmiş elektroporasyonla nöro-epitelyal hücrelere taşınmıştır ve en az siRNA'larla olduğu kadar yüksek verimle istenilen genler susturulmuştur (Calegari et al. 2002).

2.6.1.4. Ekspresyon Vektörleri

Sentetik siRNA'ların uygulanmasının bazı sınırlayıcı yönleri bulunmaktadır, bunlar ; düşük ile orta arası transfeksiyon verimi ve gen ekspresyonunun kısa vadede baskılanabilmesidir. Bu iki engeli aşmak için araştırma grupları ekspresyon vektörleri ve pre-miRNA'ları taklit ederek Dicer tarafından işlenmek üzere shRNA ekspresyon kasetleri üzerinde çalışmaya yönelmişlerdir (Brummelkamp et al. 2002, Lee et al. 2002, Miyagishi and Taira 2002b, Paddison et al. 2002a, Paul et al. 2002, Sui et al. 2002). Bu yapılar tıpkı sentetik siRNA'lar gibi RNAi'yi indüklemek için hedef mRNA ile mükemmel eşleşme için tasarlanırlar. Başarılı bir susturma için shRNA transkripti etkin bir biçimde çekirdekten sitoplazmaya ulaşabilmelidir ki burası, transkriptin Dicer ve RISC tarafından tanınıp işlendiği yerdir. shRNA eksprese eden plazmitler hem kalıcı hemde geçici olarak gen ekspresyonunu spesifik olarak baskılamak için tasarlanmışlardır. Bu sayede uzun zaman alan gelişim evrelerinde gerekli olan RNAi fenotipleri elde etmemize olanak tanır. Sentetik siRNA'lar ile kıyaslandıklarında shRNA'lar, memeli hücrelerinde RNAi'yi başlatmak için benzer potansiyele sahiptirler.

2.6.1.4.1. Promotorlar

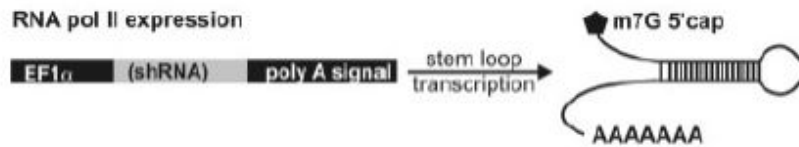
Çoğu RNAi ekspresyon vektörü shRNA'ların ekspresyonunu kontrol etmek için güçlü RNA polimeraz III promotorlarına sahiptir (Brummelkamp et al. 2002, Lee et al. 2002, Miyagishi and Taira 2002b, Paddison et al. 2002a, Paul et al. 2002, Sui et al. 2002). Bunlar insan H1 ve fare U6 promotorlarıdır. RNA polimeraz III enzimi daima 5S RNA, tRNA, 7SL RNA, U6 snRNA ve RNA işlenmesinde görevli diğer küçük stabil RNA'ları içeren sınırlı sayıdaki gene spesifiktir (Paule and White 2000). RNA polimeraz III promotoruna sahip ekspresyon sistemleri *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda stabil siRNA'ların ekspresyonu için kullanışlı promotorlardır. Her ne kadar U6 snRNA ve H1 RNA promotorları fonksiyonel olarak benzer görünseler de, U6 transkripsiyonu başlangıç (+1) nükleotidine karşı daha hassastır, optimal

ekspresyon için guanozin olması tercih edilir. Çoğu zaman U6 ekspresyon kasetleri shRNA'ları ilk 27 nükleotidlik kısmı endojen U6 snRNA olacak şekilde eksprese eder (U6 + 27). Not etmek gerekirse, RNA polimeraz III kaynaklı gen ekspresyonu ürünleri, RNA polimeraz II transkriptlerinden farklı olarak 5'- şapka ve 3'- poli A kuyruktan yoksundur, bunun yerine 4-6 timidin (T) rezidusu ile sonlanır, ancak bazı pol III genlerinde bulunan T reziduları terminasyon sinyali olarak algılanmaz (Gunnery et al 1999).



Şekil 2.5. RNA polimeraz III promotörü ile shRNA transkripsiyonu (Schepers 2005).

RNA polimeraz II temelli siRNA kasetleri CMV ya da EF1 α gibi promotörler kullanılarak elde edilmiştir (Diallo et al. 2003a, Xia et al. 2003). RNA polimeraz II kaynaklı shRNA'ların 3'-poliA kuyrukları ve 5'-şapka yapıları vardır. shRNA ekspresyonundan ziyade, doku-spesifik ekspresyon için kullanılabilirler. Yine de bu promotörler ile potansiyel olarak raportör bir genin 3'-UTR bölgesine shRNA dizisi eklenip ekspresyonu sağlanabilir (Zeng and Cullen 2003).

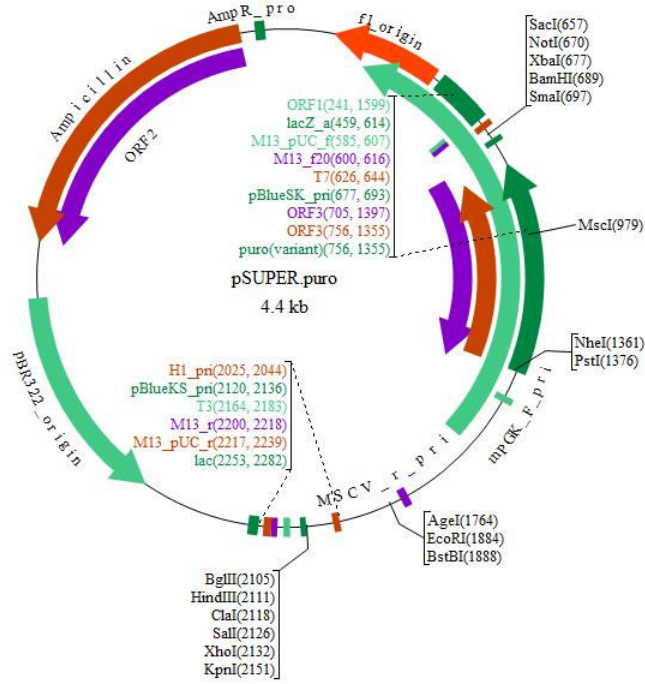


Şekil 2.6. RNA polimeraz II promotörü ile RNA ekspresyonu (Schepers 2005).

2.7. Plazmit Temelli RNAi

2.7.1. shRNA eksprese eden plazmit vektörler

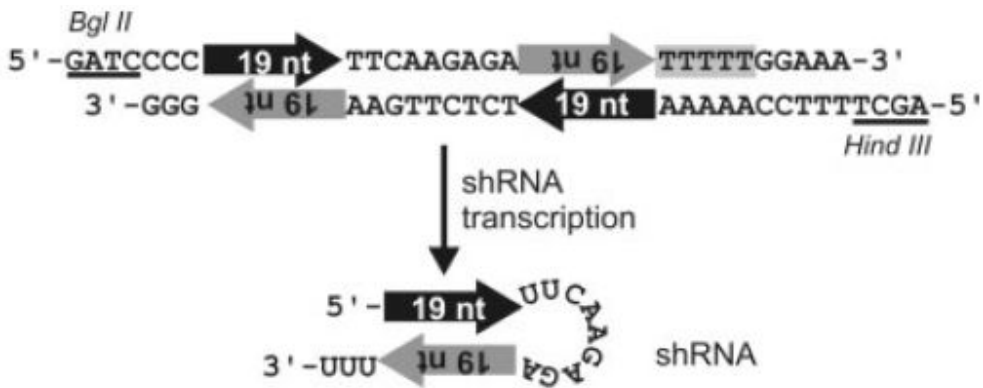
Çeşitli firmalar tarafından birçok amaca yönelik shRNA ekspresyon vektörleri üretilmiştir. En iyi bilineni ilk jenerasyon shRNA ekspresyon vektörlerinden olan pSUPER, Agami ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup (Brummelkamp et al. 2002) hala en popüler vektör sistemidir. Bu sistem yine çok bilinen pBSK (Stratagene) omurgası, içine insan H1 RNA Pol III kaseti sokularak modifiye edilmiştir. Ayrıca memeli hücre hatlarında seçilebilmesi için puromisin antibiyotiğine direnç geni de mevcuttur. Bu vektör içine birbirine komplementer olacak şekilde 19 nükleotidlik sens ve antisens dizi ve bunları birbirinden ayıran ve bu dizilerle homoloji göstermeyen 9 nükleotidlik bir bölge içeren 64 merlik DNA oligonükleotidi yerleştirilerek işlevsel hale getirilir. İnsan H1 RNA Pol III promotörü kontrolü altında eksprese edildiğinde, RNA transkripti kendi üzerine katlanır ve 19 baz çifti uzunluğunda çift iplikli bir kısa saçtokası RNA meydana gelir. Insert içindeki loop yapısını oluşturacak dizinin ilk iki 5'- bazı Uridin olacak şekilde tasarlanır ve dsRNA'nın RNaz tarafından yıkımından sonra 3' UU overhang yapısı oluşur. Ayrıca saçtokası transkriptin 3'- ucunda T5 terminasyon dizisini oluşturmak için 2 tane fazladan Uridin bulunur. Sonuçta shRNA transkripti Dicer enzimi için optimal bir substrat haline gelir, saçtokası yapısını tanıır ve 3'- uçlarında UU overhangleri oluşacak şekilde işlem yapar. Vektör plazmit, 64 mer'lik hibridize oligonükleotidin yapıya dahil olabilmesi için yapışkan uçlu restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerine sahip olmalıdır. Öncelikle oligonükleotidler kendi arasında birleşir ve bunu takiben vektör içine ligasyon gerçekleştirilir. Insert'in vektöre klonlanması için ligasyon ürünü kompetan bakteri süşuna transforme edilir.



Şekil 2.7. pSUPER.puro shRNA ekspresyon vektörünün klonlama haritası

<http://www.biovisualtech.com/>'dan alınmıştır.

Saçtokası transkriptler farklı büyüklüklerdeki halka yapıları tarafından test edilmiştir. pSUPER ile yapılan denemelerde; 5,7,9 nükleotid uzunluğundaki yapılardan 9 nükleotidlik loop yapısı bulunduran shRNA en etkin susturmayı sağlamıştır (Brummelkamp et al. 2002).



Şekil 2.8. shRNA ekspresyon vektörüne klonlanacak taslak DNA oligonükleotidi ve ekspresyon sonrası oluşan shRNA (Schepers 2005).

Tuschl ve ekibinin 30 nükleotitten kısa siRNA'ların interferon cevabı oluşturmadığına ilişkin gözlemine karşın, endojen olarak eksprese olan shRNA'ların indüklediği non-spesifik etkilere dikkat çekilmiştir. Hem siRNA transfeksiyonunun hem de shRNA transkripsiyonunun Jak-STAT yolağının interferon temelli aktivasyonuna ve nükleustaki interferonla ilişkili genlerin global artışına sebep olduğu gösterilmiştir (Bridge et al. 2003, Sledz et al. 2003). Bu etki 21-23 nükleotidlik siRNA'ların hücrel varlığı ile aktive edilen ve IFN- α 'nın ve diğer muhtemel hücrel sinyal moleküllerinin artışı için gerekli olan ds-RNA bağımlı Protein kinaz (PKR) tarafından oluşturulur. Bunlar hala tartışılan sonuçlardır, shRNA uygulanmasının ardından güçlü bir şekilde interferon cevabına yol açan siRNA'lar ve onların shRNA benzerlerinin interferon indüksiyonu üzerine yapılan karşılaştırmalı çalışmalar mevcuttur (Bridge et al. 2003). Not etmek gerekirse, neredeyse bütün plazmit vektörler taşıdıkları içerikten bağımsız olarak transfeksiyondan sonra interferon cevabını indükleyebilirler. Bu durum sadece temel araştırmalarda değil, olası tedavi uygulamalarında da dikkate alınmalıdır (Gitlin et al. 2002, Jacque et al. 2002). Çalışmalarda öncelikle uygulanan siRNA/shRNA sisteminin interferon cevabı test edilmelidir. Alınabilecek en temel önlem en düşük etkin miktarın belirlenip uygulamaya gidilmesidir (Bridge et al. 2003).

siRNA'ların knock down etkisinin transfeksiyondan itibaren 7-10 gün ile sınırlı olması, uzun dönemli çalışmalar için kullanışsız araçlar olduğunu ortaya koymaktadır. shRNA ekspresyon vektörleri bu sınırlamayı aşabilecek sistemlerdir. Antibiyotik direnç kasetlerine sahip vektörlerin uzun süren gelişim evrelerinde ihtiyaç duyulan RNAi fenotiplerin analizine izin verecek birkaç hafta ya da daha uzun sürelerde spesifik gen ekspresyonunun baskılanmasını sağladıkları gösterilmiştir. Hücrelerin floresan ışığa yoluyla ya da geçici seçici marker uygulamaları ile seçilmeleri düşük transfeksiyon verimini dengeleyecek şekilde içinde vektör bulunduran hücrelerin sayısının artışı sağlayabilir. Dahası, yeni nesil vektörler shRNA ekspresyon kasetlerinin memeli konakçı hücrelerinin genomuna entegre olmasını sağlayabilir (Rubinson et al. 2003).

shRNA ekspresyon vektörlerinin kullanımında klonlama sürecinden dolayı hazır siRNA kullanımında olduğu gibi hızlı validasyon sağlanamaz. Zaman alıcıdır ve seçilen shRNA'nın gen ekspresyonunu yeterli düzeyde baskılayacağını bir garantisi yoktur. Ancak bu sınırlama

gen susturma yapısının büyük miktarlarda üretilebilme yeteneğiyle dengelenebilir. Etkin olmayan siRNA'ların klonlanmasından kaçınmak için en etkin siRNA'nın geçici RNAi deneyleriyle araştırılması uygun olacaktır. Geçici RNAi yaklaşımındaki benzer şekilde, shRNA dizisinin doğru tasarımı etkin gen susturulması için hayati önem taşımaktadır. shRNA eksprese eden hücre klonlarının saflaştırılmasından sonra bile, hiçbir çalışmadan gen ekspresyonunun tamamen susturulduğuna ilişkin henüz bir veri yoktur. Benzer şekilde Tuschl ve ekibi de, kullandıkları sentetik siRNA'lar ile %80-90 oranında knock-down oranı yakalayabilmişlerdir (Elbashir et al. 2001a). İnhibisyon oranının nasıl artırılacağına ilişkin yolların bulunması önemlidir; deneylerde birden fazla siRNA kullanılması, farklı shRNA'lar eksprese eden vektörlerin birlikte transfeksiyonu gibi yollar daha verimli susturma etkileri göstermiştir (Ji et al. 2003, Yang et al. 2002a).

2.8. Lentivirüs Temelli RNAi

HIV-1 virüsü türevli lentiviral vektörler *in vivo* ve *in vitro* bölünen ve bölünmeyen hücrelerin genomlarına integre olabilme yeteneğindedir (Naldini and Verma 1999, Vigna and Naldini 2000). Lentiviral vektörler hematopoietik kök hücreleri gibi multipotent kök hücrelerin kendilerini yenileme, organ repopülasyon kapasitelerini engellemeksizin transdüksiyonunu sağlayabilir (Miyoshi et al. 1999, Woods et al. 2000). Bu, Maloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)'den türetilmiş olan onkoretroviral vektörlere karşı önemli bir avantaj sağlar, genetik olarak modifiye edilmiş kök hücrelerin (hematopoietik, nöral, epidermal) transplantasyonu ile diabet, multipl-sklerozis, kanser ve AIDS'i de içeren hastalıklara karşı potansiyel bir tedavi olanağı sunar. Yıllar süren araştırmalar lentiviral vektörlerin hem tasarım hem de paketlenmesi bakımından önemli ölçüde gelişmesini sağlamıştır; HIV yapısal ve düzenleyici sekansları hem transfer hem de paketlenme yapılarında minimize edilmiş ve HIV türevi ile insan hücrelerinin transdüklenmesi fikriyle ortaya çıkan güvenlik endişeleri sona ermiştir (Vigna and Naldini 2000). Bu vektörler artık transplantabl kök hücreleri, *ex vivo* merkezi sinir sistemi ya da karaciğer gibi post mitotik hücrelerin *in vivo* transdüksiyonunda umut vadeden vektörler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Federico 2003).

2.8.1. Lentivirüslerden Lentivirüs Vektörlere

Lentivirus grubu üyesi olan At İnfeksiyöz Anemi Virusu (EIAV), 20. yüzyılın ilk on yılı içinde keşfedilen ve bitkisel olmayan ilk virüstü (Vallee and Carré 1904). O günlerden beri lentivirüsler, 1980'lerin başında HIV-1 virüsü izole edilinceye kadar gizemlerini korumuşlardır. Lentivirüsler, zarf yapısına sahip, tek iplikli pozitif (kodlayıcı) RNA'dan iki kopya taşıyan, insan, primat, kedi, at, koyun ve keçilerin de içinde bulunduğu geniş bir yelpazedeki hayvan türlerinde görülen immün yetmezlik sendromlarının etiyolojik ajanları olarak bilinmektedirler. Bu sendromlar çoklu organ hastalıklarında gelişirler ve potansiyel immünolojik cevaba karşı viral varlığın devamını sağlayan ve uzunca zaman alan bir inkubasyon süresince pasif olarak kalırlar. Lentivirüs adı (Latince *lenti* : yavaş), hastalığı indükleyebilmesi için virüsün ihtiyacı olan, aylardan yıllara kadar uzun zaman alan inkubasyon sürecinden ileri gelmektedir. Lentivirüsler, *Retroviridae* virüs ailesinin alt ailesi olan *Lentiviridae* alt ailesine mensuptur. Aynı ailede *Lentiviridae* alt ailesinden başka, büyük çoğunluğu hücre transformasyonunu indükleyen virüslerden oluşan *Oncoviridae* ve non-patojenik infeksiyonlara yol açan kalıcı virüslerin içinde bulunduğu *Spumaviridae* alt aileleri vardır (Coffin 1997).

Lentivirüs vektörlerinin davranış modu, parental lentivirüslerin biyolojisi ile yakından ilişkilidir. Bu viral genusun prototipik üyelerinin yapısına benzerlik gösterebilecek bazı araçlara sahip olmaları gerekmektedir. Genomları, lentiviral vektörlerin yapımında sıklıkla araç olarak kullanılan ve aynı ailenin üyeleri olan HIV-2, simian immunodeficiency virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV) ve bunlardan minimal yapısal farklılıklar gösteren HIV-1 'den esinlenilerek oluşturulmuştur. Bunların yanında daha az popüler lentivirüsler olan EIAV, caprine arthritis encephalitis virus, bovine leukemia virus ve foamy virus gibi üyeler de alternatif lentivirüs vektörleri tasarlanmasında araç olarak kullanılmıştır (Federico 2003).

2.8.2. Viral Genomun Yapısı

Konakçı genomuna entegre olan viral cDNA, yani provirusun büyüklüğü ortalama 9-10 kb'dır. Retroviridae ailesinin diğer bileşenleriyle benzer olarak, lentiviral provirusların her iki

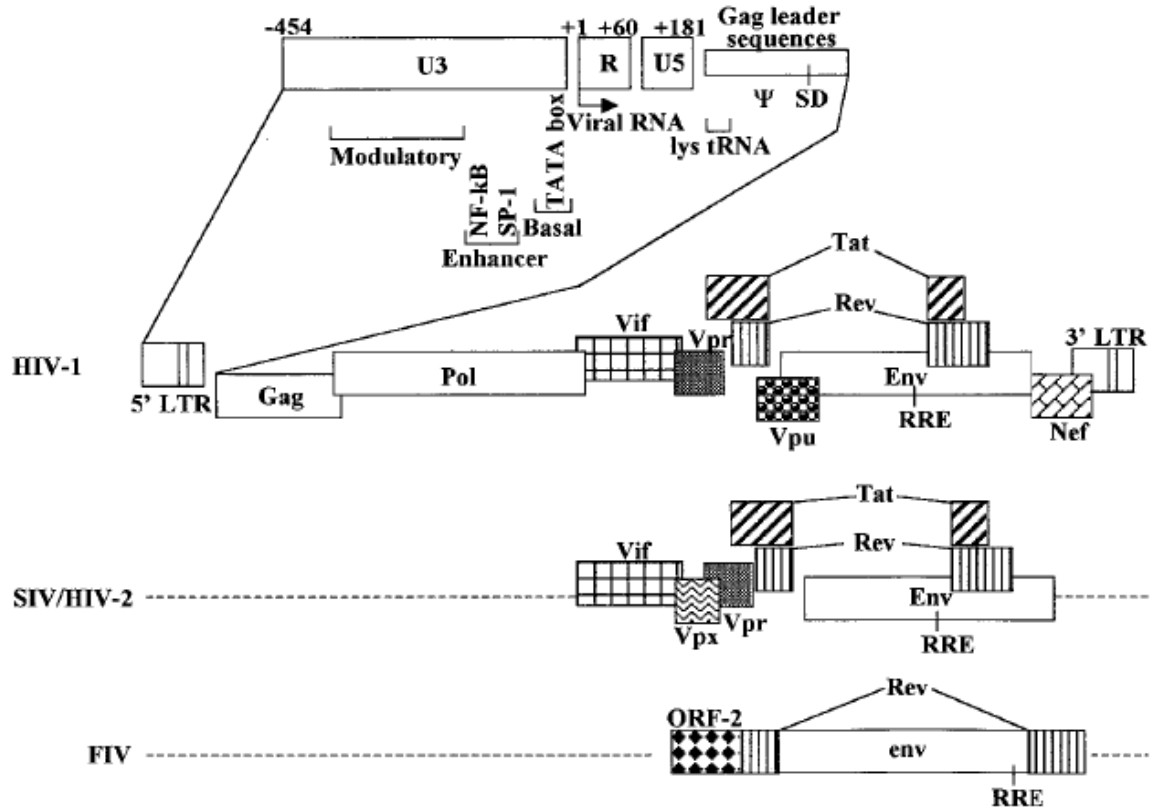
ucu da 600-900 nükleotid uzunluğunda homolog bölgelerden (LTR : long terminal repeats) meydana gelir, bu bölgeler virus replikasyonu, integrasyonu ve ilgili genlerin ekspresyonu için gereklidir. Proviral LTR'ler şematik olarak iç kısma ayrılırlar; U3, R ve U5. R bölgesinin ilk nükleotidi transkripsiyon başlangıcına işaret eder. Bu, viral genomik RNA yapısının provirusun tamamı ile örtüşemeyeceğine işaret eder. Özellikle Genomik RNA U5 ve RLTR bölgelerini 5'- ucunda, U3 ve R bölgesini de poliadenilasyon sitesinde doğru 3'- ucunda bulundurur. Sonuç olarak da viral genomun sıralanması; R-U5-Genler-U3-R yapısı şeklindedir. Viral transkripsiyon aktivitesi, U3 bölgesinde ve R ve U5'deki ek bölgelerde konumlandırılmış olan dizilerde bitişik Gag lider sekansları ve konakçı bağlanma faktörlerini de içeren hücrel faktörlerin interaksyonuna ihtiyaç duyar (Pereira et al. 2000). U3 bölgesi bazal-, enhansır- ve modülatör- elemanları bulundurur, R bölgesi ise Tat-temelli transaktivasyonda kritik olarak görev alan, büyüyen RNA molekülleri içindeki stabil kök loop yapılarını oluşturan dizileri içerir, sonuncu olarak da, R bölgesindeki LTR'ler RNA şapkalama (transkriptlerin 5' - ucu) ve poliadenilasyon sinyallerini içerirler (Federico 2003).

Yeni lentiviral vektörler dizayn edilirken, LTR fonksiyonlarının büyük bir kısmının farklı bölgelere dağılmış olmasına dikkat edilmelidir çünkü, bunlardan herhangi biri vektör replikasyonu ve integrasyonunu engellemeden promoting aktivitesini manipüle edebilir. Biyogüvenlik açısından bakılacak olursa, hücreleri lentivirus vektörlerle transdüklemedeki ana kaygı, 3'- uçtaki viral promotörün tam bir kopyasının varlığıdır. Konakçı genomuna bir kere integre olduktan sonra, teorik olarak devamında yer alan bölgelerdeki hücrel genlerin transkripsiyonunu değiştirir ve beklenmedik gen deregülasyonuna yol açar. Bu yüzden son jenerasyon lentivirus vektörler olan self-inactivating (SIN) vektörlerde klinik araştırma perspektifinden dolayı, lentiviral promotörlerin bazal-enhansır elemanları etkin bir şekilde heterolog viral ya da hücrel promotörlerin transkripsiyonel kontrol elemanlarıyla değiştirilmiştir (Federico 2003).

Lentivirusların genomu üç yapısal öncül proteini kodlar; Gag, Pol ve Env. HIV-1'de, *gag* ve *pol* genlerinin, virus tomurcuklanması esnasında ya da hemen sonra viral proteaz tarafından olgun ürünlere dönüştürülen ürünleri, p55 Gag ve p160 Gag-Pol polipeptid öncüllerinden meydana gelir. 55 kDa ağırlığındaki Gag öncülünün yıkılması matriksi (p17 MA), kapsidi

(p24 CA), nükleokapsidi (p9 NC) ve p6 proteinlerini oluşturur (Freed 1998). Diğer bir yandan, 160 kDa ağırlığındaki Gag-Pol öncülünün işlenmesi, herbir Gag olgun ürününün yanında viral proteaz (p12 PR), Gag-Pol öncülünün yıkımına bağlı olarak genomik RNA'dan viral cDNA sentezlenmesinde benzersiz bir rol oynayan revers transkriptaz (p51/66 RT) ve viral DNA'nın konağı genoma integrasyonu için gerekli olan integraz (p31 IN) enzimlerinin oluşmasında rol oynar (Li et al. 1997). Hem Gag, hemde Gag-Pol öncülleri tam uzunluktaki viral RNA tarafından oluşturulur, ikincisi p55 Gag öncülüne göre 1:20 oranında daha düşük yüzdelerde ribozomal çerçeve kayması tarafından oluşturulur. *env* geni 160 kDa ağırlığında bir öncülü kodlar, yıkımı hücre proteazları tarafından gerçekleştirilir, yüksek oranda glikozile olmuş viral yüzey ve transmembran (TM) zarf glikoproteinleri olmak üzere iki ürüne dönüşür. Bunlar hücre resptör tanınmasında ve virusun hücre membranlarına füzyonunda işlev görürler (Wyatt and Sodroski 1998).

Özellikle lentivirüsler, retroviruslardan açık okuma çerçeveleri tarafından kodlanan daha az sayıdaki giriş ya da daha uygun bir ifadeyle düzenleyici gene sahip olmaları ile ayrılırlar. Bu genlerin viral hayat döngüsündeki rolleri şekilde özetlenmiştir. Lentivirüs gen mühendisliği stratejileri açısından, vektör transdüksiyon etkinliği üzerindeki düzenleyici genlerin ekspresyonunun etkileri, hücre sisteminden hücre sistemine değişiklik gösterir. Örneğin, sadece HIV-1 Rev proteininin ekspresyonu, paketleme yapsındaki, gelişimi durmuş hücre hatlarını transdükleme için gerekli lentiviral partiküller oluşturmakta yeterli olmuştur (Kim et al. 1998), ancak durgun ex vivo lenfositlerin etkin transdüksiyonu, paketleyici hücrelerdeki tüm HIV-1 proteinlerinin ekspresyonu ile aşılabilmektedir (Chinnasamy et al. 2000). Bu yüzden hem viral replikasyonda hem de transdüksiyondaki lentiviral vektörler her bir düzenleyici proteinin etkilerinin bulunduğu özet bir araç olmalıdır.



Şekil 2.9. HIV-1, SIV/HIV2 ve FIV virüslerinin genom yapıları (Federico 2003).

Vif : “Viral Infectivity Factor” Viral replikasyonun hücresel inhibitörünü bloke eder

Vpr: “Viral Protein R” Sadece HIV-1’de bulunur. Preintegrasyon kompleksinin nükleusa göçünü sağlar. Hücrelerin G2 evresinde tutuklu kalmalarına neden olur.

Tat: “TrAnscripTion factor” henüz olgunlaşmamış viral transkriptlerin etkin elongasyonu için gereklidir.

Rev: “REgulatory Viral protein” RRE dizilerini bağlar, birleştirilmemiş ya da tekli birleştirilmiş viral RNA’ların sitoplazmaya taşınmasına imkan sağlar.

Vpu : “Viral Protein U” Hücre membranında lokalize olmuştur. Viral salınımı sağlar.

Nef: “NEgative Factor” Hem viral salınımı hem de infektiviteyi sağlar.

Vpx: “Viral Protein X” preintegrasyon kompleksinin nükleusa göçü ile ilgili bir proteindir.

ORF-2: “Open Reading Frame-2” viral genom transkripsiyonundan sorumludur.

2.8.3. Lentivirüs Hayat Döngüsü

Viral replikasyon esnasında düzenleyici proteinlerin kritik rolleri lentivirüslerin hayat döngülerini *Retroviridae* ailesinin diğer üyelerinden ayırt etmede büyük öneme sahiptir. Lentiviral partiküller tipik olarak B ve T lenfositleri, makrofajlar, astrositler ve mikroglial hücreler gibi hedeflerine zarf glikoproteinleri ile spesifik hücre reseptörlerine (primatlarda CD4, FIV için CD9 ve kemokin reseptörü, CXCR4, CCR5) bağlanarak dahil olur (Clapham and McKnight 2001). Viral kapsidin hedef hücreye gelişi viral zarfın hücre membranı ile pH bağımsız olarak füzyonu ile gerçekleşir. Önce sitoplazma içine taşınır, viral kapsid açılır, retrotranskripsiyon süreci başlar ve çift iplikli viral DNA oluşur. Revers transkripsiyon çok karmaşık bir süreç olarak görülebilir (Jonckheere et al. 2000) ve *pol* geninin ürünü olan revers transkriptaz enzimi ile gerçekleştirilir. RNA ve DNA bağımlı DNA polimeraz özelliği gösterir, RNaz H aktiviteleri gibi DNA sentezi lizin tRNA'sının (tRNA Lys3) hücresel sinyali ile başlatılır. Gag lider dizilerindeki komplementer diziler bağlanır. Bir kez retrotranskribe olduktan sonra, 5'- LTR, genomun 3'- ucundaki R bölgesine atlar, RNA/DNA hibrit molekülünün oluşma süreci başlatılır ve RNA bileşeni aşamalı olarak RNaz H aktivitesiyle revers transkriptaz enzimi tarafından degrade edilir (Federico 2003).

DNA/RNA viral çift iplik formları, MA, IN ve Vpr viral proteinleri ve hücre faktörleri ile birlikte preintegrasyon kompleksi oluşturur. Lentivirüsleri diğer retrovirüslerden ayıran en önemli özellik, cDNA'sını hücre bölünmesinden ve dolayısıyla nükleer membranın ayrılmasından bağımsız olarak entegre edebilme yeteneğidir. HIV-1'de, hem MA hem de IN proteinleri importin- α hücre proteini tarafından tanınan tipik nükleer lokalizasyon dizileri taşırlar. Böyle bir interaksiyon; PIC'i nükleer membran porlarına hedefleme yeteneğindeki bir protein olan importin- β ile bağlanmayı sağlar. Vpr, PIC'in nükleer girişine importin- α 'nın nükleer lokalizasyon dizilerine ilgisini artırırken, importin- β 'nin analogu gibi davranır (Gallay et al. 1997, Haffar et al. 2000).

Nükleusta provirüs 2'- LTR halkasal formu oluşturur ve her iki proviral uçtaki kesilmeyi takiben IN aktivitesi ile stabil integrasyona girer. Viral cDNA'nın her bir sonlanma bölgesindeki 4-6 nükleotid integrasyon süreci ile doğrudan ilişkilidir; lentiviral genomun

konakçı hücrenin kalıcı bir elemanı olmasını sağlar. Özellikle, konakçı DNA'sı lentiviral provirüs ile tercih edilen integrasyon bölgeleri olmadan da erişilebilir bir durumdadır (Katzman and Katz 1999).

Viral genlerin ekspresyonu sıkı bir şekilde koordine edilmiştir. *Nef*, *Tat* ve *Rev*, çoklu birleştirilmiş Rev-RRE bağımsız viral RNA'lar tarafından erken aşamada kodlanan proteinlerdir. *Tat* ve *Rev*'in erken ve gereğinden fazla üretimi lentivirüs replikasyonunun dinamiğinden dolayı açık bir şekilde farkedilmektedir, *Nef*'in de ani olarak büyük miktarlarda görülmesi de hala merak uyandıran bir olgudur. Rev-RRE interaksyonu sitoplazma içindeki birleştirilmemiş ve tekli birleştirilmiş viral RNA'ların taşınmasına olanak verir; ek düzenleyici, yapısal ve viral proteinlerin sentezini sağlar (Federico 2003).

Lentivirüs hayat döngüsünün geç evreleri ile retrovirüslerinki arasında belirgin bir fark göze çarpmamaktadır. Hücre membranına ulaşan viral yapısal proteinler viral genom ve diğer giriş molekülleri ile beraber (ör; lizin tRNA³, Vpr, ve Nef proteinleri), Gag, Gag-Pol ve Env öncülleri ile aktif ürünlerine yıkımı sırasında ya da yıkıldıktan sonra hücre içinde olgun viral partiküllerine dönüşürler. Yaygın kanıya göre çoğu HIV-1 Gag işlenmesi hücre membranında, Gag öncüllerinin yıkımı da hücre sitoplazmasında gerçekleşir (Kaplan and Swanstrom 1991). Oluşan olgun virüs partikülü U5 bölgesi 5'-LTR dizisindeki komplementer dizilerle birbirine bağlanmış tam uzunlukta 2 viral RNA kopyası içerir.

2.8.4. Uygun Paketleyici Hücre Tiplerinin Seçimi ve Kullanımı

Eksojen genleri hedef hücrelere transfer eden transdükleyici lentiviral vektörler viral replikasyon için tipik olarak defektiftir çünkü en azından viral proteinleri kodlayan trans-acting dizileri silinmiştir. Vektör virüsün çoğalması için, viral proteinleri eksprese eden plazmitlerin geçici transfeksiyonuyla veya hücre genomlarına stabil olarak integre olmuş viral ekspresyon plazmitlerine sahip paketleyici hücreler kullanılarak viral proteinler elde edilebilir (Buchsacher and Wong-Staal 2000). Paketleyici hücreler retroviral vektör virüsü çoğaltmadan bir güvenlik avantajı sağlarlar, çünkü replikasyon kompetan (RC) virüs üretimine yol açabilecek rekombinasyon olasılığını azaltırlar. Paketleyici hücrelerin gelişimi esnasında

ekspresyon plazmitleri farklı zamanlarda dizisel olarak içeri sokulabilirler ve böylece hücre genomunda farklı yerlere yerleşirler. Buna ek olarak aynı anda tüm trans-acting bileşenlerin birlikte transfeksiyonundan kaçınmak, daha sonraki aşamalarda rekombinasyon benzeri bir durum olma riskini azaltır (Mann et al. 1983).

Lentiviral vektörler kısmi olarak insan immün yetmezlik virüsü tip-1 (HIV-1)'den türetilmiştir. Sistem içinde ek güvenlik elemanları yerleştirilmiştir, birçok araçsal ve düzenleyici protein kodlayan gen uzaklaştırılırken, vektörün etkin bir şekilde hedef hücreleri indüklemeye yeteneğine dokunulmamıştır. Dahası, güvenlikten emin olmak için, paketleyici ve yardımcı üretici hücreler ile transdükleyici vektörü içeren hücrelerde RC virüsü varlığı periyodik olarak takip edilmelidir.

Lentiviral paketleyici hücreleri üretirken araştırmacıların karşısına çıkan bir zorluk da hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterebilecek olan bazı yapısal proteinlerin ekspresyonudur. Bu zorluğun üstesinden gelebilmek için, tetrasiklin ya da ekdizon temelli indüklenebilir ekspresyon sistemleri kullanılabilir.

Lentiviral vektörler ve paketleyici hücre sistemleri için en azından üç potansiyel uygulama mevcuttur;

1. Bölünen ve bölünmeyen hücelere etkin gen transferi
2. Antiviral ilaç tarama protokolleri
3. Viral replikasyonun temel biyolojisini aydınlatma çalışmaları

Spesifik uygulama kullanılacak paketleyici hücre tipini de belirler. İlk amaç için sıradan bir paketleyici hücre kullanılması yeterli olurken, ilaç tarama veya replikasyon için daha uygun olabilecek tüm lentiviral proteinleri eksprese eden paketleyici hücre kullanılması yerinde olacaktır (Federico 2003).

2.8.5. Rekombinant Lentivirüs Partiküllerinin Elde Edilmesi

Lentivirüslerin detaylı olarak ortaya çıkarılmış biyolojik verileri lentivirüs vektör teknolojisinin geliştirilmesinde kritik önem taşımaktadır. Lentivirüs vektör tasarlanmasında teorik yaklaşım konsept olarak yeni değildir ve uygulamada da onkoretrovirüs temelli vektörlerin geliştirilmesinde başarı sağlanmıştır. Ne varki, düzenleyici proteinlerin varlığı, lentivirüs vektörlerin tasarımını daha kompleks hale getirmiştir (Federico 2003).

Lentivirüs temelli transfer tekniklerinin kullanımı, ilgilenilen transgenin taşınabileceği, yüksek oranda silinmiş viral genoma sahip rekombinant lentiviral partiküllerin *in vitro* üretimi temeline dayanmaktadır. Özellikle, rekombinant lentivirüs partikülleri paketleyici (permisif) hücre hatlarında; Gag-Pol öncülleri ile *Rev* ifade eden paketleyici vektör, heterolog doğası olan Env reseptörü ifade eden vektör ve replikasyon, inkapsidasyon ve ekspresyonu için gerekli dizileri barındırırken kalan tüm ORF bölgeleri çıkarılmış viral DNA'yı barındıran transfer vektörün in-trans koekspresyonu ile elde edilebilir. Not etmek gerekirse, paketlenme süreciyle ilişkili dizilerin dışındaki yapısal protein transkriptleri, transfer vektöründen sağlanan RNA'lar ile lentiviral partiküllere inkorpore olurlar (Federico 2003).

Rekombinant lentiviral vektörler genellikle yüksek oranda transfekte edilebilen hücre hatlarında (örneğin insan embriyonik böbrek hücreleri; Hek293 hücre hattı) geçici üçlü transfeksiyonlarla elde edilebilirken, sadece transfer vektörünün transfeksiyonu ile lentivirüs partiküllerinin elde edilebileceği etkin paketleyici hücre klonu izole etmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Farson et al. 2001, Xu et al. 2001). Herhangi bir durumda vektör hedef hücreleri tek bir hücre döngüsünde abortif infeksiyon yapar ve hücre replikasyonuna ihtiyaç duymaksızın konakçı hücre genomuna stabil olarak integre olur. Bu süreç post mitotik hücre tiplerine kadar geniş bir yelpazede yeni uygulamaların önünü açmaktadır.

Kompetan lentivirüslerin replikasyonunun yüksek oranda patojenik doğasından ötürü, araştırmacılar lentivirüs vektörlerinin son jenerasyonlarını geliştirirken gereksiz viral sekansların varlığını minimize etmek için sürekli bir çaba içindedirler. Benzer şekilde, bir sonraki etkileyici gelişme de bazı cesaret verici ancak hala giriş seviyesindeki sonuçlara dayanılarak,

hem hedeflenebilir hemde injekte edilebilir lentivirüs vektörleri vasıtasıyla tedavi amaçlı transgenlerin *in vivo* taşınımının gerçekleştirilmesiyle olacaktır (Federico 2003).

2.8.6. Lentiviral RNAi Vektörü

Memeli hücrelerinde shRNA/siRNA temelli RNAi uygulaması için çeşitli lentiviral vektörler mevcuttur. Bazı vektörler infektivite belirteci olarak yeşil floresan proteini (GFP), Lusiferaz proteini (Luc) gibi knock-down hücreleri eş zamanlı olarak görmemizi sağlayan genlerin yanında puromisin, neomisin gibi infekte hücrelerin besi ortamında seçilmelerini sağlayan antibiyotik direnç genleri içerirler. Bunlara ek olarak, ortama göre değişiklik gösteren lentiviral RNAi vektörleri de mevcuttur, kullanıcı deney esnasında ortama verdiği maddeler vasıtası ile RNAi aktivitesini açıp kapatabilir.

shRNA/siRNA vektörünü oluşturmak için de RNA polimeraz III promotorundan hemen sonraki bölge bir çok ticari vektörde önceden restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmiş ve içine istenen oligonükleotidlerin yerleştirilebilmesi için lineer olarak gelir. Kullanıcıya kalan sadece önceden sipariş etmiş olduğu, siRNA ya da shRNA'ları oluşturacak olan komplementer DNA oligonükleotidlerini önce birbirleri ile hibridize etmek, daha sonra da lineer vektör içine klonlamaktır.

2.8.7. shRNA/siRNA Virüsün Üretimi ve Kullanımı

Paketlenme, DNA vektörlerinden kompetant virüsün hazırlanmasıdır. RNAi virüsünün paketlenmesi, cDNA taşıyan lentivirüsün paketlenmesi ile temelde aynıdır. DNA vektörleri geçici olarak hücre hattına transfekte edilir, Hek293 gibi hücre hatlarında 2-3 gün içinde supernatant bölgede virüs birikimi gözlenir. Esas olarak yukarıda da belirtildiği üzere, lentiviral vektör üretim sistemleri “dağıtım sistemi” üzerinde kuruludur. Doğal virüsün minimize edilmiş genomu tek tek yardımcı plazmitlere dağıtılmıştır. Farklı viral elemanların 3 ya da 4 ayrı vektöre dağıtılmış olması lentiviral genomun tesadüfi rekombinasyonu yoluyla replikasyon kapasitesine sahip virüs oluşturması riskini ortadan kaldırır. Lentiviral sistem seçilirken, araştırmacının dar veya geniş konukçu hücre profili seçme opsiyonu vardır. Esas

olarak, viral yüzey zarf proteini tür spesifikliğini de belirler. Lentiviral üretimin dağınık olmasından dolayı bu kılıf proteini kullanımı da anahtarlanabilir. Örneğin, veziküler somatitis virüs G glikoproteini olan VSV-G, geniş konukçu yönelimi sergilerken, ekotropik maltoz bağlayıcı yüzey glikoproteini de dar bir konukçu profili sergiler.

Yüksek titrede virüs elde edilmesi, paketlenmenin etkinliğine bağlıdır. Genel olarak, DNA vektörlerinin transfeksiyon verimini artırmak için, viral titrasyonun da artırılması gerekmektedir. Kaba bir hesaplama, %90-100 arasında bir transfeksiyon verimliliği gereklidir. DNA'nın, hücrelerin ve transfeksiyon koşullarının kalitesi optimizasyon aşamasında göz önünde bulundurulması gereken potansiyel değişkenlerdir.

Lentivirüsün paketlenmesi için genellikle %90-100 oranında transfeksiyon yüzdesine sahip olan insan Hek293 hücre hattı kullanılmaktadır. Tüm transfeksiyonlar için mümkün olduğunca en az pasajlanmaya uğramış hücreler kullanılmalıdır. Ve her ne kadar Hek293 hücreleri adherent hücreler olmalarına rağmen pipetlenme esnasında ya da ufak bir sarsılma sonucunda konfluent halde bile petri yüzeyinden kolaylıkla kalkabilmektedirler. Bundan dolayı transfeksiyonun %80 konfluentlik oranında yapılması tavsiye edilmektedir. 36-48 saat itibarıyla hücreler istenen konfluentlik yüzdesine ve maksimum virüs üretme kapasitesine ulaşırlar.

Hücrelerin optimal transfeksiyonu başarıldıktan sonra, viral içerikli supernatantın hücrelerden ayrılması gerekmektedir. Bu işlem supernatantın 0.45 µm şırınga filtreden geçirilmesiyle sağlanabilir. Bunun ardından supernatant direkt olarak deneylerde kullanılabilir. Farklı hücre tipleri farklı verimlerle transfekte olurlar. Transfekte edilmesi zor hücre tipleri için polibrene gibi yük nötralize edici ajanlar kullanılabilir. Ancak bu yöntem, supernatantın konsantre edilmesini gerektiren hücre tiplerinde yardımcı olmayabilir. Bazı hücre tipleri içinse "spin enfeksiyonu" adı verilen, virüsün ve hücrelerin birlikte çok düşük hızda santrifüj edildiği yöntem uygulanarak enfeksiyon oranları artırılabilir.

2.8.9. Gen Susturulmasının Test Edilmesi

Öncelikle ilk denemelerde transfeksiyon verimi istenen düzeyde gerçekleşmişse, hedeflenen gen ekspresyonunda azalma beklenir. Transfeksiyonun verimi de kontrol overekspresyon vektörünün transfekte edildiği hücrelerde hiç transfekte edilmemiş hücelere nazaran ilgilenilen genin ekspresyonunda artış gözlenmesiyle anlaşılır. siRNA/shRNA eksprese eden virüsün infekte edildiği hücrelerde de hiç transfekte edilmemiş hücrelerdeki gen ekspresyonuna göre nisbi azalma görülürse sistemin çalıştığından emin olunur. Bu aşamadan sonra infekte-transfekte hücrelerin saflaştırılması aşamasına geçilir. Hücreler infekte olduktan sonra, infekte olmayan kontamine edici hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması zorunludur. Genel olarak, hücrelerde RNAi temelli gen susturulmasını analiz etmenin ve öncesinde saflaştırmanın iki yolu vardır; infekte hücre popülasyonunun tamamı incelenir ve seçilmiş olan sayıdaki mevcut klonal hücre hatları incelenir. Hangi stratejinin uygulanacağı, deneyin doğasına bağlı olarak değişiklik gösterir. Eğer tüm popülasyonlar analiz edilecekse, GFP ya da antibiyotik direnç geni yardımıyla seçim yapılabilir. Eğer ki yapısal shRNA eksprese eden vektör kullanıldıysa hücrelerin prosedür boyunca canlılıklarını ve gelişimlerinin gözlemlenmesi önemlidir. Bazı hayati genlerin susturulması yavaş gelişime ya da ölümcül fenotiplerin oluşmasına neden olabilir. Bu da infekte hücrelerin antibiyotik seçimli tayinlerini güçleştireceğinden bunun yerine GFP marker tercih edilebilir. Alternatif olarak da indüklenebilir RNAi vektörlerinin kullanımı önerilebilir. Bir diğer alternatif de, basit olarak düşük yoğunluktaki hücreleri petrilere aktarmak ve ilgili kolonileri analiz için toplamak olabilir. Eğer virüs GFP eksprese ediyorsa, hücre kolonileri floresan mikroskop ışığı altında alınabilir, bu da sadece yeşil hücrelerle analize devam edilmesine olanak verir. Her koloninin istenilen hücre hattı olduğundan emin olunmalıdır ve saf oldukları kesinleştirilmelidir.

Eğer mümkünse gen susturulmasının analizi protein düzeyinde de yapılmalıdır. Bu da western blotlama gibi fonksiyonel analizlerle yapılabilir. Ayrıca mevcut tüm hatlarda gen susturulmasının aynı düzeyde gözlemlenmesi beklenmemelidir. Önce iyi bir şekilde genin RNAi ile susturulmuş olduğu hatlar elde edilmeli, ondan sonra en azından 2-3 aynı hat ile deneysel analiz yürütülmelidir.

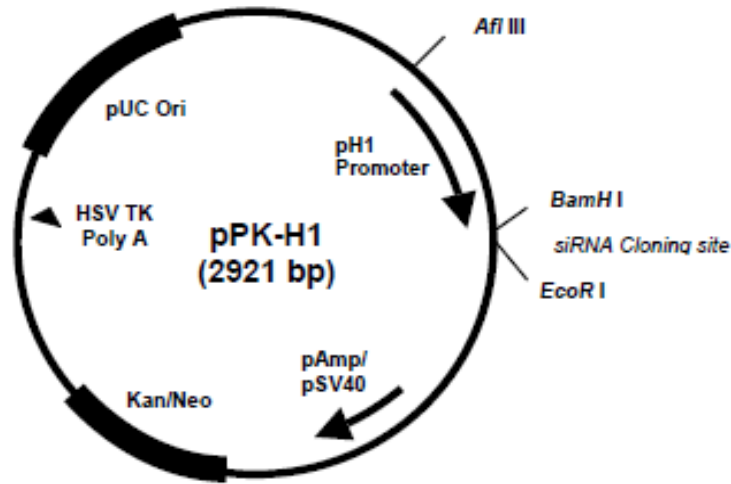
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

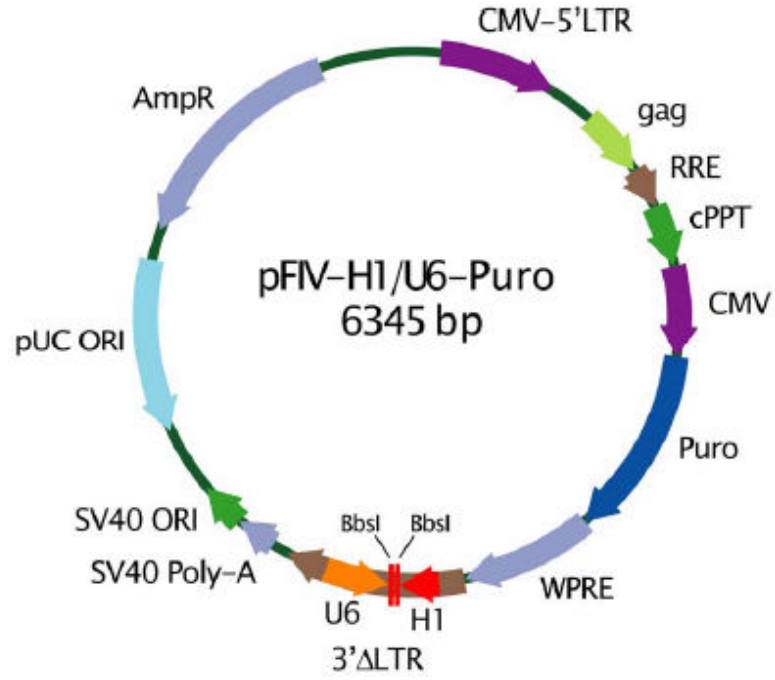
3.1.1. Vektörler

3.1.1.1. Plazmit siRNA Vektörü

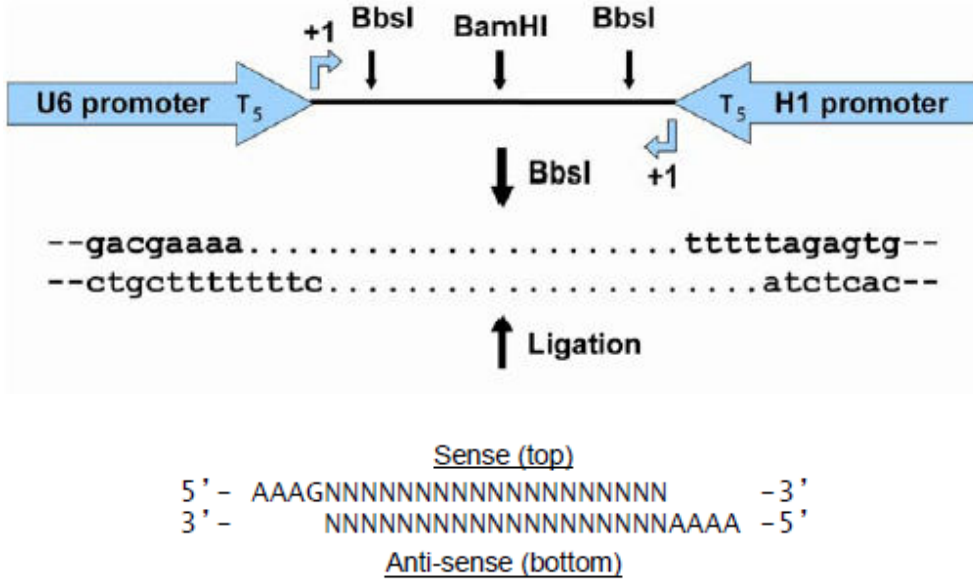
Deney sistemimizde plazmit vektörü olarak “PromoKine pPK-H1 shRNA Vector Kit (PK-MB-P100100)” kullanılmıştır. Vektör 2921 bp uzunluğunda olup, içinde H1 RNA Pol. III promotörü, bakteriyel Kanamisin, ökaryotik Neomisin antibiyotiklerine karşı direnç genleri taşıyan temel özelliklere sahip bir plazmittir (Şekil 3.1). Lineer yapıdaki plazmit birbirine yapışamayacak şekilde bir ucunda BamHI, diğer ucunda EcoRI yapışkan uçlarını oluşturan nükleotidlere sahiptir. Bu uçlara uygun oligonükleotid dizisi yerleşmedikçe plazmit halkasal hale gelemmez ve çoğalması engellenir. H1 RNA polimeraz III promotörü sens ve antisens sekansları birbirine komplementer shRNA eksprese eder ve oluşan shRNA Dicer tarafından işlenerek 21-23 nükleotidlik siRNA’ya dönüştürülür ve RNAi yolağına katılır. Vektörün eksprese edeceği shRNA’yı oluşturacak 62 nükleotidlik DNA dizisi Şekil 3.2’de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. pPK-H1 plazmit vektörün genel yapısı.



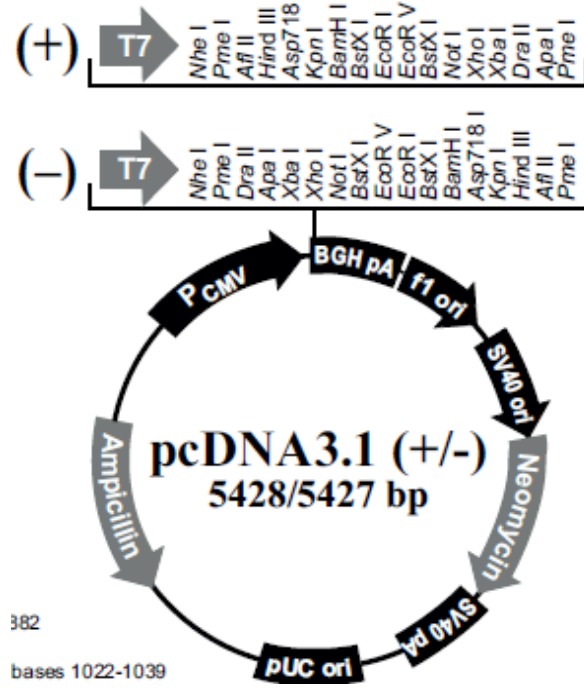
Şekil 3.3. pFIV-H1/U6-PuroTM lentiviral vektörün genel yapısı



Şekil 3.4 pFIV-H1/U6-PuroTM lentiviral vektörün siRNA klonlama bölgesine yerleştirilecek olan 23 nükleotid uzunluğundaki kalıp oligonükleotid dizilimi ve yerleşim bölgesi.

3.1.1.3. Memeli Ekspresyon Vektörü

Deney sistemimizde transfeksiyon verimliliğini kontrol edebilmek amacıyla daha önce laboratuvarımızda hazırlamış olduğumuz *MDK* eksprese eden 5427 bp uzunluğundaki Invitrogen pcDNA 3.1. memeli ekspresyon vektörü kullanıldı. pcDNA 3.1 plazmit vektörü çoğu memeli hücre hattında yüksek düzeyde stabil ve replikatif olmayan geçici ekspresyon imkanı sunmaktadır. Çok çeşitli memeli hücrelerinde protein gen ekspresyonu sağlayabilmesi için insan CMV promotörü içermektedir. Stabil hücreler oluşturabilmek içinse Neomisin direnç geni kodlamaktadır. Şekil 3.5’de vektörün genel yapısı görülmektedir.



Şekil 3.5. pcDNA 3.1 memeli ekspresyon vektörün genel yapısı

3.1.2. Memeli Hücre Hatları

İnsan karaciğer kanser hücreleri (Hep G2) ve pankreas kanser hücreleri (Panc I) Johns' Hopkins Üniversitesi Patoloji Onkoloji bölümünden, insan embriyonik böbrek hücreleri (Hek293) Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Moleküler Hücre Biyolojisi Birimi'nden temin edildi.

3.1.3. Primerler ve Amplifikasyon Bölgeleri

3.1.3.1. *ACTB* (β -Actin)

F : 5'- AGAAAATCTGGCACACACC

R: 5'- AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

5'-**AGAAAATCTGGCACACACC**ttctacaatgagctgcgtgtggctcccaggagcaccctgtgctgaccga
gccccctgaacccaaggccaaccgcgagaagatgaccagatcatgttgagacctcaacacccagccatgtacgttgctatcca
ggctgtgctatccctgtacgctctggccgtaccactggcatcgtgatggactccgggtgacggggtcaccacactgtgccatctacg
aggggtatgccctccccatgccatcctgcgtctggacctggctggccgggacctgactgactacctcatgaagatcctcaccgagcg
cggctacagcttcaccaccagggcgagcgggaaatcgtgcgtgacattaaggagaagctgtgctacgtgccctggacttcgagca
agagatggccacggctgcttcagctcctccctggagaagagctacgagctgacctgacggccaggtcatcaccattggcaatgagcg
gttccgctgccctgaggca**CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT** 3'- 594 bp

3.1.3.2. *MDK* (Midkine)

F: 5'- AGGATGCAGCACCGAGGCTTC 3'-

R: 5'- GTCTTCTGGCACTGAGCATTG 3'-

5'**AGGATGCAGCACCGAGGCTTC**ctcctcctcaccctcctcgccctgctggcgctcacctccggctgcacaaaaa
gaaagataaggtgaagaaggcggccccggggagcagtgctgctgagtgccctggggccctgcacccccagcagcaaggattg
cggcgtgggttccgcgagggcacctgcggggcccagaccagcgcacccggctgcagggtgcctgcaactggaagaaggatttg

gagccgactgcaagtacaagtttgagaactggggtgcgtgtgatgggggcacaggcaccacaaagtccccaaggcaccctgaagaag
gcgcgctaCAATGCTCAGTGCCAGGAGAC 3' - 359 bç

3.1.3.3. pPKH1 Plazmitinde Bulunan H1 Ekspresyon kaseti

F: AGG AAT TCG ACC TCT GAC TTG

R: TGG TTC ACG TAG TGG AAT TC

5' ACCTCTGACTTGagcgtcgatttttgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctt
ttacggttcctggccttttctggccttttctcacatgtgatattgcatgctgctatgtgttctgggaaatcaccataaacgtgaatgtctt
ggatttggaaatctataagttctgtatgagaccactcg_siRNA_Klonlama_Bölgesi_gatcccgGAATTCCACTA
CGTGAACC 3' - 304 bç

3.1.4 siRNA Olarak Eksprese Edilen Oligonükleotidler ve MDK cDNA'daki Konumları

3.1.4.1. Mid1

Sens : 5'-CTGGAAGAAGGAGTTTGGGA 3'-

Antisens : 3'-GACCTTCTTCCTCAAACCT 5'-

5'gtgctcccggaaaggcactgggcgaccgacccgtggctttcttgggcgaccgggtccagactccccagcagcagagc
gcttccctgccaccgcggaaccgccccaggtgggcccgcgccccctcccagcagccagcaggggcggcagggtgagccggc
cgtggaggggagcgggtcccgcgggtatacagggcggggctccgaggcagatgagcaccgaggcttctcctcctcaccct
cctcgccctgctggcgtcacctccgcggtcgcaaaaagaaagataaggtgaagaaggcggcccggggagcagtgcgctgag
tggcctgggggcccctgcacccccagcagcaaggattgcggcgtgggttccgcgagggcacctgcggggcccagaccagcgea
tccggtgcagggtgcctgcaaCTGGAAGAAGGAGTTTGGAgccgactgcaagtacaagtttgagaactggggtgc
gtgtgatgggggcacaggcaccacaaagtccgccaaggcaccctgaagaaggcgcgctacaatgctcagtccaggagaccatccgc
gtcaccaagccctgcacccccaaagcaaaaggccaaagcaaaagggaagggaaggactagacgccaagcctggat
gccaaggagcccctggtgtcacatggggcctggcccacgcctcctctcccaggcccagatgtgaccaccagtgccttctgtctg
ctcgtagctttaatcaatcatgcctgccttgcctctcactccccagccccaccctaaagtgccaaaagtggggagggacaaggatt

ctgggaagcttgagcctccccaagcaatgtgagtccagagcccgtttgttcttccccacaattccattactaagaacacatcaaa
taaactgacttttcccccaataaaaagctcttcttttaataataaaaaaaaaaaaaa 3'-

3.1.4.2. Mid2

Sens : 5'-TGCTCAGTGCCAGGAGACC 3'-

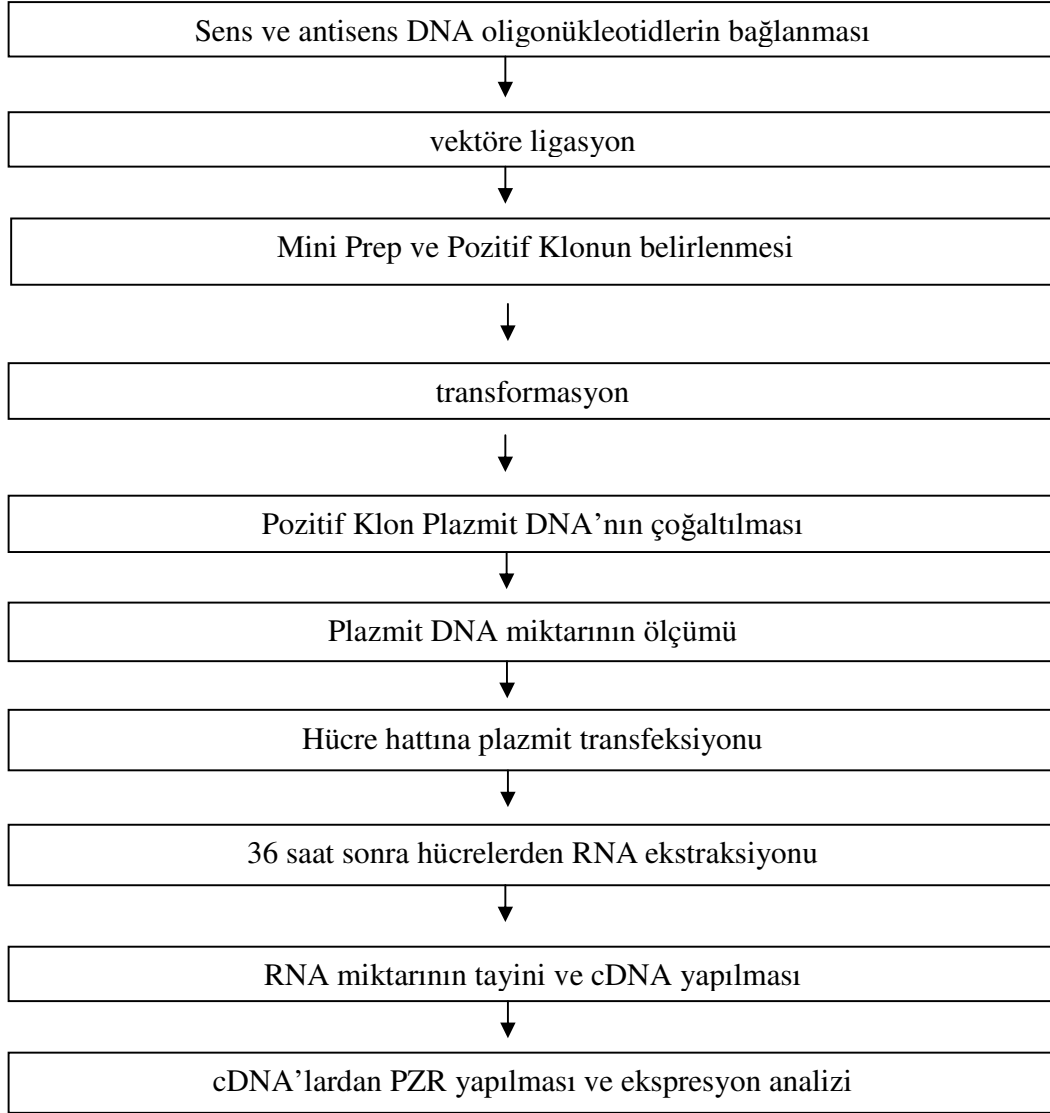
Antisens : 3'- ACGAGTCACGGTCCTCTGG 5'-

5'gtgctcccggaaaggcactgggcgaccgacccgtggcttctctgggcgaccgggtcccagactccccagcacagcagagc
gcttcctgcccaccgcggaaaccgccccaggtgggcccgcgccccctccccagcagccagcagggcgccagggctgagccggc
cgtggaggggagcgggtcccgcgggtatacagggcgcggggctccgcggcaggatgcagcaccgaggcttctcctcctcacct
cctcgccctgctggcgtcacctccgcggtcgcataaaagaaagataaggtgaagaaggcggcccggggagcagtgctgctgag
tggcctgggggcctgcacccccagcagcaaggattgcggcgtgggttccgcgagggcacctgcggggcccagaccagcgcga
tccggtgcagggtgccctgcaactggaagaaggagttggagccgactgcaagtacaagttgagaactggggtgcgtgtgatgggg
gcacaggcaccaaagtccgccaaggcaccctgaagaaggcgcgctacaa**TGCTCAGTGCCAGGAGACC**atccgc
gtcacaagccctgcacccccagaccaaagcaaaaggccaaagccaagaaagggaaggaaaggactagacgccaagcctggat
gccaaggagccctgggtgcacatggggcctggcccacgacctcctctcccaggcccagatgtgaccaccagtgccttctgtctg
ctcgttagctttaatcaatcatgcctgccttgcctctcactccccagccccaccctaagtgcccaaagtggggagggacaagggatt
ctgggaagcttgagcctccccaagcaatgtgagtccagagcccgtttgttcttccccacaattccattactaagaacacatcaaa
taaactgacttttcccccaataaaaagctcttcttttaataataaaaaaaaaaaaaa 3'-

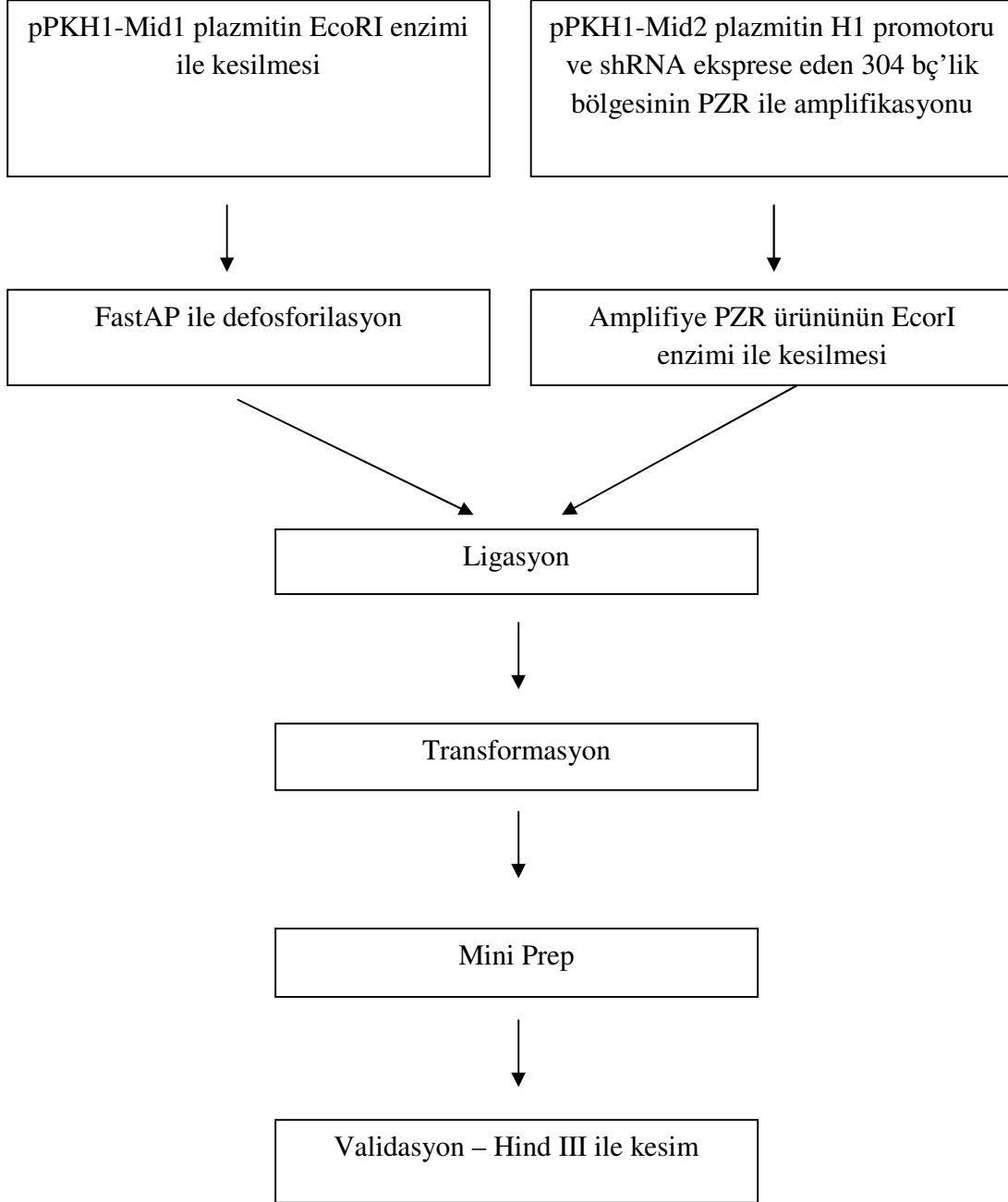
3.2. Memeli hücre hatlarında *MDK* Geninin Plazmit-siRNA ve Lentivirüs-siRNA Vektör Sistemleri Kullanılarak Susturulması

Memeli hücre hatlarında *MDK* geninin Plazmit-siRNA ve Lentivirüs-siRNA vektör sistemleri kullanılarak susturulmasında etkinliklerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmanın akış şeması aşağıdaki gibidir;

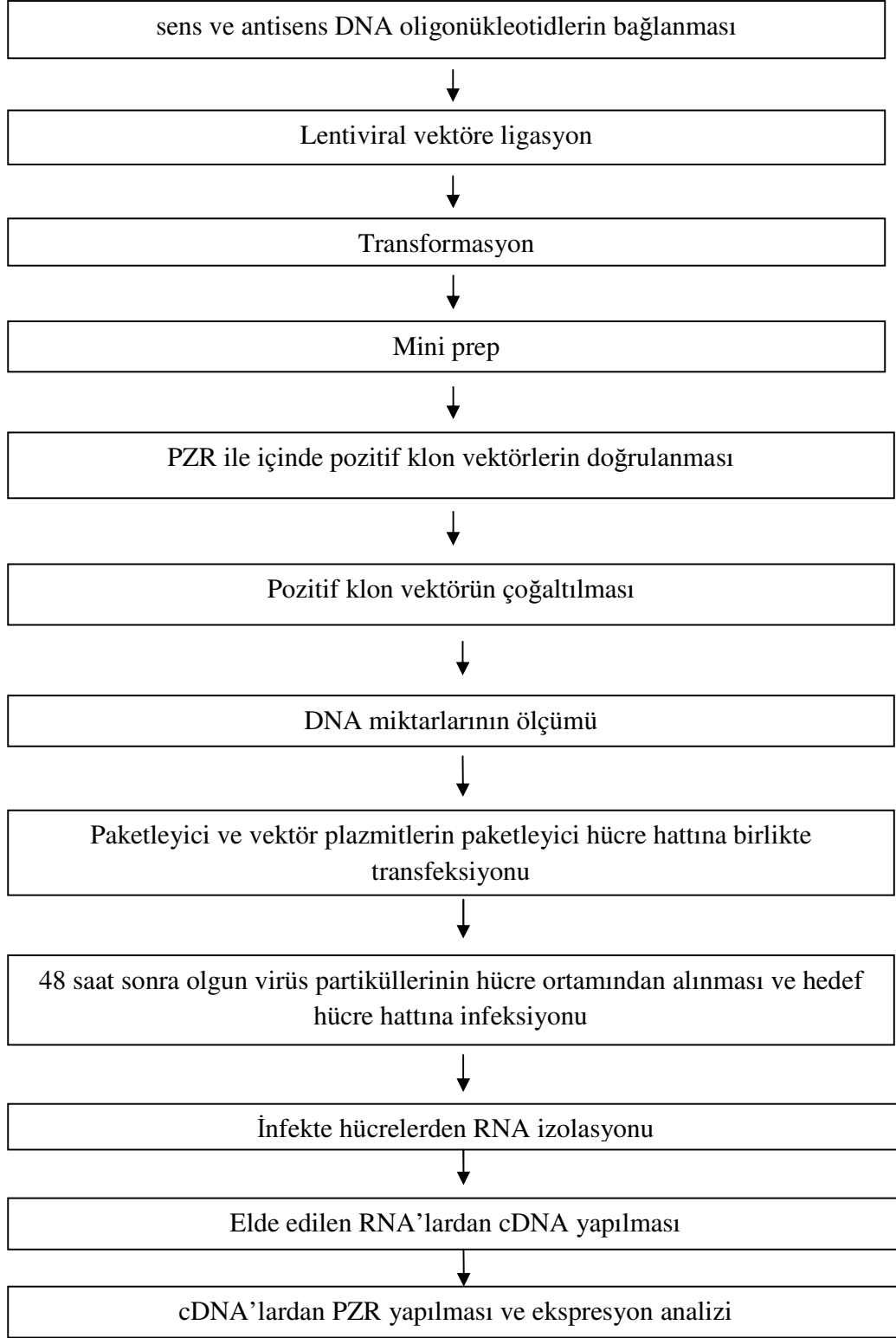
A. Plazmit-siRNA vektörü ile *MDK* Geninin Susturulması



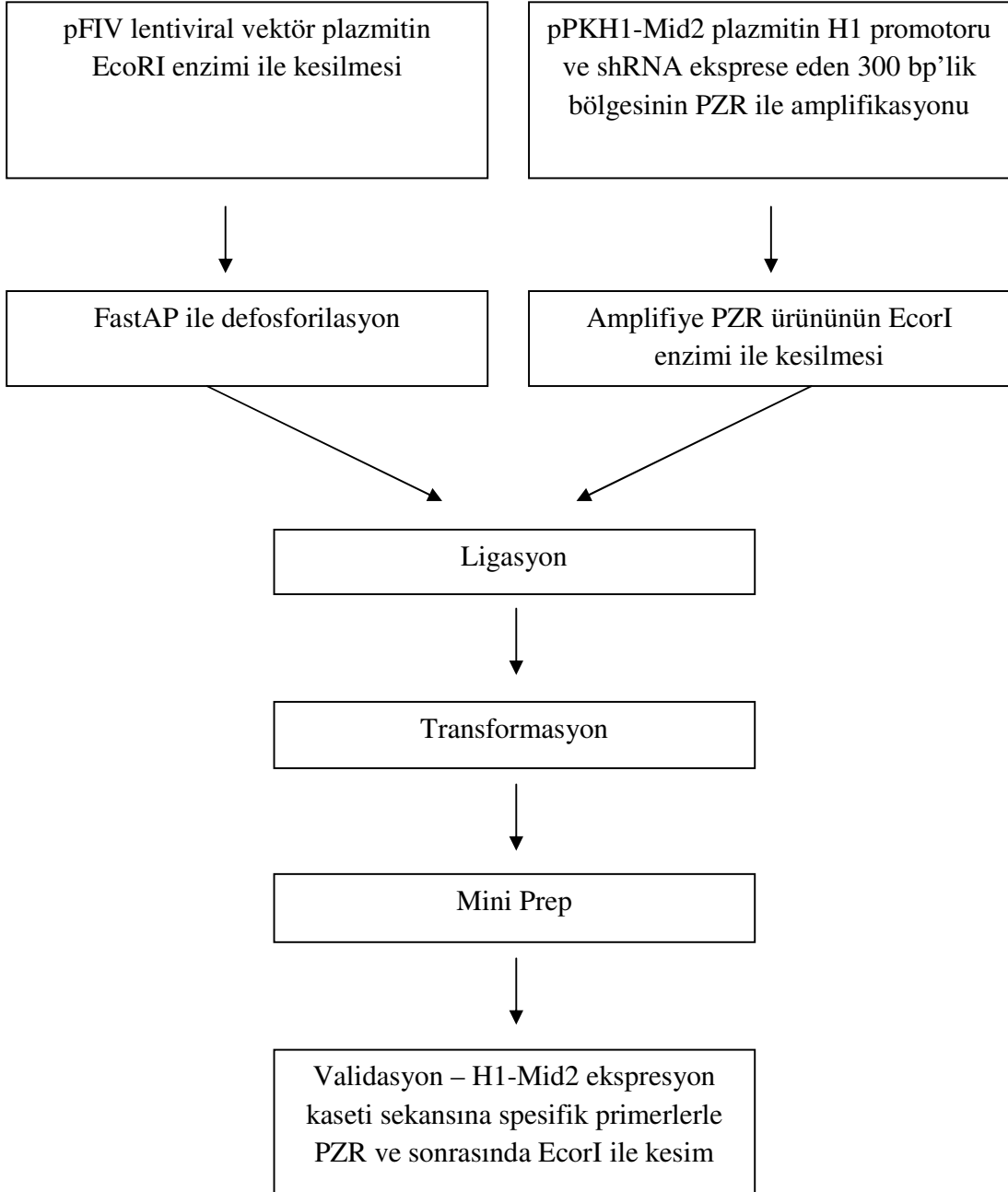
B. Mid1 ve Mid2 shRNA'yı Birlikte Eksprese Eden Plazmit Vektör Elde Edilmesi



C. Lentivirüs-siRNA Vektörü ile *MDK* Geninin Susturulması



D. H1-Mid2 shRNA Ekspresyon Kaseti İçeren Lentiviral Plazmit Vektör Oluşturulması



3.2.1. Ligasyon

Ligasyon islemi için ; Kit ile beraber gelen 10X ligasyon tamponu ile T4 ligaz enzimi ve daha önce pürifiye edilmiş hedef PZR ürünü veya klonlanacak oligonükleotid ve plazmit kullanılır. Ligasyon islemi; tüp içerisinde klonlanacak PZR ile amplifiye edilmiş DNA dizisinin yada oligonükleotidin klonlamada aracı vektör olarak kullanılacak plazmit DNA'sının içine kovalent bağ oluşturularak sokulması işlemidir. Ligasyon reaksiyonu belirtilen tampon ve T4 ligaz enzimi uygun miktarlarda karıştırılıp toplam hacim genel itibariyle 10-20 µl olacak şekilde +4 °C'de 16 saat süre ile inkübasyona tabi tutularak gerçekleştirilir.

3.2.2. Transformasyon

Plazmit DNA'nın kompetant bakteriye ısı şoku metodu ile sokulması işlemidir. Plazmit DNA, içine girdiği bakteri hücrelerini kodladığı antibiyotik direnç geni sayesinde o antibiyotiğe karşı direnç kazandırır. Kullandığımız plazmit DNA'ların kompetant *E. coli* suşu olan DH5α'ya transformasyonu için, -80° C den çıkarılan 50 µl DH5α bakteri hücresi elde çözüldü. 2 ng DNA (plazmit) ilave edilip ve pipetaj yapıldı. 20 dk. buz üzerinde inkübe edildi. 37°C' de 3 dk sıcaklık farkı ile hücreler şoka tabi tutuldu. Tekrar buz üzerinde 1 dk. inkübe edildi. Oda ısısındaki LB tamponundan 1000 µl. ilave edilip ve pipetaj yapıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra LB agarlı petrilere kültüre edildi.(LB agarlı plate hazırlanırken klonlamada kullanılan plazmitlerin sahip olduğu antibiyotik direnç genine uygun antibiyotik besi ortamına ilave edildi). 37°C'lik etüvde gece boyunca inkübasyona tabi tutuldu.

3.2.3. Alkalın Lizis Yöntemi İle Plazmit DNA İzolasyonu (Mini/Maxi 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 (mini prep 100 µl/ maxi prep 5 ml) Alkalın Lizis Solüsyon I eklenip pipetaj yapıldı. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra Alkalın Lizis Solüsyon II (mini prep 200 µl/ maxi prep 10 ml) eklendi ve yavaşça 3-4 kere alt- üst edilip 5 dk buzda bekletildi. 5 dk dolduktan sonra

(mini prep 150 µl / maxi prep 7,5 ml) Alkalin 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 (mini prep 3µl/ maxi prep 10 µl) RNaz eklendi. Karışım vortekslenip ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine (mini prep 500 µl /maxi prep 2 ml) fenol kloroform eklendi Vortekslenip (mini prep 1 dk 10000xg/ maxi prep 5 dk 5000xg)’de santrifüjlendi. Üstte kalan sıvı kısım yeni tüpe aktarıldı ve üzerine (mini prep 600 µl/ maxi prep 30 ml) saf etanol eklendi ve çalkalandıktan sonra +4°C’de 10000 rpm ‘de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve üzerine (mini prep 600 µl/ maxi prep 30 ml) %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 (mini prep 45 µl/ maxi prep 500 µl) ddH₂O eklendi.

3.2.4 R. Endonükleaz enzimleri ile kesilen DNA’ların 5’- Uçlarının Defosforilasyonu

Bu işlemde Fermentas FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase kullanılmıştır. DNA, RNA ve nükleotidlerin 5’- ve 3’- fosfat gruplarının uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. FastAP, içine DNA parçası yerleştirilmek istenen lineer vektör plazmitin fosfat gruplarını elimine eder ve içine ligand yerleşmeden birleşmesini engellemiş olur. Çalışmamızda 1 µg plazmit DNA için 2 µl 10x reaksiyon tamponu, 1 µl FastAP™ enzim karışımına 20 µl son hacim olacak şekilde ddH₂O eklenip, vortekslenildi ve 10 sn santrifüjlendikten sonra 10 dk 37°C’de reaksiyon gerçekleştirildi.

3.2.5. DNA Pürifikasyonu

DNA pürifikasyon işlemi “Ultra Clean GelSpin DNA Purification Kit” ile yapıldı. Temizlenmek istenen DNA’nın içinde bulunduğu reaksiyon ya da solüsyonun hacminin 3 katı kadar GelBind tampon eklendi ve pipetajla homojenize edildi. Karışım toplayıcı tüpün içinde bulunan spin kolona aktarıldı ve 10 sn 10000xg’de santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve spin kolon üzerine 300µl GelWash yıkama tamponu eklendi. Tekrar 10 sn 10000xg’de santrifüjlendi ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine istenen

miktarda ddH₂O eklendi ve 30 sn 10000xg'de santrifüjlendi. DNA toplama tüpüne aktarılmış oldu ve spin kolon atıldı.

3.2.6. DNA Miktar ve Saflık Tayini

Konsantrasyon tayini şu formülasyona göre yapıldı;

$(260 \text{ nm DNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) \times \text{dilüsyon faktörü} \times \text{DNA sabiti} \times \text{kuvars kristali malzeme sabiti}$.

DNA sabiti : 50 µg/ml, Kuvars kristali malzemenin sabiti: 2

Saflık tayini şu formülasyona göre yapıldı :

$(260 \text{ nm DNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) / (280 \text{ nm DNA} - 280 \text{ nm ddH}_2\text{O})$

3.2.7. Vektör ve Paketleyici Plazmitlerin Büyük Hacimlerde Üretilmesi

Seçilen mini prep plazmit DNA'lardan DH5α hücrelerine transformasyon yapıldı. Petride oluşan kolonilerden akşam saatlerinde 200 µl 250 mg/ml antibiyotik içeren 400 ml LB besiyerine bir tanesi ekildi ve çalkalamalı etüvde 210 rpm 37°C'de 1 gece inkubasyona bırakıldı. Ertesi sabah plazmit DNA bakterilerden alkalın lizis yöntemi ile izole edildi.

3.2.8. Hücre kültürü

İnsan karaciğer hücreleri (HepG2) ve pankreas kanser hücreleri (PancI) Johns Hopkins Üniversitesi Patoloji Onkoloji bölümünden, insan embriyonik böbrek hücreleri (Hek293) Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Moleküler Hücre Biyolojisi Birimi'nden temin edildi. Hücreler %10 fetal bovine serum içeren ve 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, katkılı Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) içersinde 5% CO₂ li 37 °C inkübatörde üretildi. Hücre pasajları ve deneyler için 0.1% tripsin ve 10 µM EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) kullanılarak hücreler petrillerinden ayrıştırıldı.

3.2.9. Hücre Hatlarına Plazmit DNA Transfeksiyonu

24 kuyucuklu petri ortamında bulunan memeli hücre hatlarına plazmit DNA'lar Lipofectamine 2000 reaktifi ile transfekte edildi. Her bir kuyucuk için 0,8 µg plazmit DNA ve 2 µl Lipofectamine 2000 reaktifi karışımı kullanıldı. Öncelikle transfeksiyondan 1 gün önce $0.5-2 \times 10^5$ adet hücre antibiyotik içermeyen 500 µl besi ortamına eklendi ve transfeksiyon yapılacağı zaman % 90-95 konfluent hale gelmiş olmasına dikkat edildi. Her bir kuyucuk için plazmit DNA 50 µl serumsuz besin ortamı ile seyreltildi ve pipetaj yapılarak homojenize hale getirildi. Lipofektamin kullanılmadan önce hafifçe alt üst edildi ve 50 µl serumsuz besin ortamına eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra içinde plazmit DNA ve serumsuz besin ortamı bulunan karışımla birleştirildi birkaç kere alt üst edildikten sonra 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 100 µl karışım kuyucukların kenarından hücre ortamına eklendi. Hücreler 37°C' de %5'lik CO₂ inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.10. Kültür Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

24 kuyucuklu hücre kültürü petrilere her bir kuyucuk için ($5-10 \times 10^6$ hücre başına) 1 ml TRIZOL (Invitrogen) reaktifi hücrelerin üzerine aktarıldı ve iyice pipetaj yapıldı. Daha sonra hücreleri içeren lizat 1,5 ml eppendorf tüpüne aktarıldı ve 5-10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 0,2 ml kloroform eklendi ve eppendorf tüpü hızlı bir şekilde 15 sn boyunca çalkalandı. 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi ve +4°C'de 12.000xg de 15 dk santrifüj edildi. Üstte kalan şeffaf kısım altındaki faza dokunulmadan yeni eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 0,5 ml izopropil alkol eklenip ve 5-10 defa alt üst edildi. 10 dk oda sıcaklığında bekletilip ve +4°C'de 12.000xg de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve üzerine %75 etanol eklendi. +4°C'de 7500xg de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve RNA'lar 15-20 dk kurumaya bırakıldı. Kuruma bittikten sonra RNA'ların üzerine 50 µl ddH₂O eklendi ve 5-10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra buza alındı.

3.2.11 RNA Miktarının Hesaplanması

Konsantrasyon tayini şu formülasyona göre yapılmıştır;

$(280 \text{ nm RNA} - 260 \text{ nm ddH}_2\text{O}) \times \text{dilüsyon faktörü} \times \text{RNA sabiti} \times \text{Ölçümde kullanılan kuvars kristal malzemenin sabiti}$

RNA sabiti : 40 µg/ml , Kuvars kristali malzemenin sabiti: 2

3.2.12. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için “Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” kullanıldı. 1-2 µg RNA, 1 µl oligodT ve ddH₂O eklenerek toplam hacim 12 µl’ye tamamlandı. Karışım hafifçe vortekslendi. Isıtıcı blokta 70 °C’de 5 dk bekletilip buza alındı ve karışıma 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 1 µl RNaz inhibitörü ve 2µl dNTP karışımı eklendikten sonra hafifçe vortekslendi ve 10 sn santirfüjlendi. 37°C’de 5 dk bekletildi. 1µl Revers transkriptaz enzimi eklendi. Hafifçe vortekslenip ısı bloğunda 42 °C’de 1 saat reaksiyon gerçekleştirildi ve cDNA’lar elde edildi.

3.2.13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA amplifikasyon işlemi 5 µl 10x PZR tamponu, 1.5 mM (1 µl) MgCl₂, 100 µM (1µl) dNTP 0, 5 µM (1µl) oligonükleotid primer, 2.5 ünite (1µl) Taq DNA polimeraz eklenerek steril ddH₂O eklenerek 50 µl’ye tamamlandı ve 0.2 ml steril PZR tüpünde yapıldı. Isıl döngü cihazı kullanılarak, kalıp DNA ilk olarak 94 °C de 2 dakika ayrıştırılıp, daha sonra 30-40 döngü, her biri 94 °C de 30s, 58-60 °C de 45 s ve 72 °C 45 s 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) EtBr₂ varlığında yürütülerek UV transillüminatör ile görüntülendi.

3.2.14. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez yöntemi hem agaroz jeller için hem de poliakrilamid jeller için kullanılan DNA'nin negatif yükünden yararlanılarak DNA örneklerinin elektrik akımının geçişine izin verecek tampon çözeltiler (TBE) aracılığı ile negatif yüklü kutuptan pozitif yüklü kutuba doğru koşturulması işlemidir. Bu teknik kullanılarak DNA dizilerinin moleküler büyüklüklerine göre ayrımı yapılmış olur. Farklı konsantrasyondaki jeller kullanılarak farklı büyüklükteki DNA dizileri kolaylıkla tanımlanabilir. DNA dizilerinin ultraviyole ışık altında görüntülenmesi için çift sarmal DNA dizisi içinde yer alan karşılıklı bazların arasına giren ve U.V. ile ışımaya veren etidyum bromür kullanılır. Farklı konsantrasyondaki agaroz jeller 1X TBE tamponu ile agaroz ağırlık/ hacim 1X TBE olarak farklı yüzdelerde hazırlanır. Agaroz jelle yüklenen klon plazmid veya PZR örnekleri elektroforez tankının hacmine ve örneklerin özelliklerine bağlı olarak 50-150 V akımda 30-45 dk yürütülür. U.V. üzerinde görüntülenerek fotoğraflanır.

3.2.15. Plazmit Vektörün Hazırlanması

3.2.15.1. shRNA İçin Oligo Tasarımı

İlgilenilen *MDK* genine özgü Mid1 ve Mid2 olmak üzere 2 tip 19 nükleotidlik birbirine komplementer sens ve antisens DNA oligoları önceden belirlendi ve Şekil 3.3. de gösterildiği şekliyle toplam 62 nükleotid olacak şekilde tasarlanıp sipariş edildi. Bu 62 nükleotidlik oligoların tam ortasında oluşacak shRNA'nın saçtokası yapısına denk gelen bölgede plazmitin hiçbir bölgesinde bulunmayan Hind III enzim kesim bölgesi bulunmaktadır. Bu kesim bölgesi pozitif klonların seçilmesi için özellikle yerleştirilmiştir.

Mid1: 5'GATCCGCTGGAAGAAGGAGTTTTGAGAAGCTTGTCAAAACCTCTTCTCC
3'-GC**GACCTTCTCCTCAAAACT** CTTCGAACAGTTTTGAGGAAGAAGG
AGTTTTTTTGGAAAG 3' -
TCAAAAACCTTCTTAA 5'-

Mid2: 5'GATCC**TGCTCAGTGCCAGGAGACCGAAGCTTGGGTCTCCTGGCACTGAG**
3'-GC**ACGAGTCACGGTCCTCTGGCTTCGAACCCAGAGGACCGTGACTC**
CGTTTTTTTGGGAAG 3' -
GCAAAAACCTTCTTAA 5'-

3.2.15.2. Oligoların Birbirleri ile Bağlanması

62 nükleotidlik DNA oligoları 1 µg/µl konsantrasyon olacak şekilde sulandırıldı ve aşağıdaki gibi toplam 50 µl'lik karışım hazırlandı.

2 µl sens oligo
2 µl antisens oligo
46µl bağlanma tamponu
<hr/>
50 µl toplam

Karışım vortekslendi ve 10 saniye santrifüjlenerek spin-down edildi. Karışım ısı bloğunda 90 °C de 3 dk bekletildi ve sıcaklık 37°C'ye düşene kadar beklendi (Yaklaşık 1 saat). İşlem tamamlandıktan sonra karışım üzerine 350 µl ddH₂O eklenerek hacim 400 µl'ye tamamlandı.

3.2.15.3. Bağlanan Oligoların shRNA Ekspresyon Plazmitine Ligasyonu

1 µl shRNA ekspresyon vektörü
1 µl bağlanmış oligo
1 µl T4 Ligaz Tampon (10x)
1 µl T4 Ligaz Enzim
6 µl ddH ₂ O
<hr/>
10 µl toplam

Yukarıdaki karışım hazırlanıp, vortekslendi ve spin down edildi. 1 gece +4°C de bekletildi. Ertesi gün transformasyon yapıldı.

3.2.15.4. Mini Prep ve Pozitif Klonların Seçimi

Ertesi gün oluşan kolonilerden rastgele 8 tanesi belirlendi ve akşam saatlerinde her biri 3'er ml Kanamisinli LB bulunan steril deney tüplerine ekildi. Çalkalamalı etüv 210 rpm hıza ve 37°C'ye ayarlandı ve bakteriler burada 1 gece üremeye bırakıldı. Ertesi sabah alkalın lizis yöntemi ile bakterilerden plazmit DNA'ların ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Pozitif klonun belirlenmesi için her bir plazmit DNA HindIII restriksiyon enzimiyle kesime bırakıldı. Bunun için aşağıdaki karışım hazırlandı;

2 µl plazmit DNA
1 µl HindIII enzim
1 µl 10x HindIII tampon
1 µl 10x BSA
5 µl ddH ₂ O
<hr/>
10 µl

Karışım vortekslenir ve spin-down edildikten sonra 2 saat boyunca 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Kesimin olup olmadığını anlamak için % 1 konsantrasyondaki Agaroz jelde (TBE) yürütüldü. Kesimin göstergesi olan tek bant oluşumu gözlemlendi.

3.2.15.5. Mid1 ve Mid2 shRNA'ları Birlikte Eksprese Eden Plazmit Vektörün Oluşturulması

3.2.16.5.1. pPKH1-Mid1 plazmitin EcoRI Enzimi İle Kesilmesi

10 µl Konsantre edilmiş ve saflaştırılmış plazmit DNA
5 µl EcoRI Enzim
10 µl 10x EcoRI Tampon
10 µl 10x BSA
55 µl ddH ₂ O
<hr/>
100 µl toplam
60

Reaksiyon karışımı hazırlandı ve vortekslenip spin down edildikten sonra 50şer µl hacimlerde 2 eppendorf tüpüne paylaştırıldı. 2 saat 37°C’de reaksiyona bırakıldı. 2 saat sonra DNA %1 lik agaroz jelde yürütülerek kesim kontrol edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı Ultra Clean GelSpin DNA Purification kit ile son hacim 43 µl olacak şekilde temizlendi.

3.2.15.5.2. EcoRI ile Kesilen Plazmit DNA’nın 5’- Fosfat Gruplarının Uzaklaştırılması

Temizlenen DNA’nın kesim bölgesinde yer alan yapışkan uçların tekrar birleşmemesi için defosforilasyon enzimi ile 10 dk inkube edildi. Karışım vortekslendi ve spin down edildikten sonra 10 dk 37°C’de reaksiyona bırakıldı. Daha sonra reaksiyon karışımı enzimden ve tuzlardan arındırmak amacıyla “Ultra Clean GelSpin DNA Purification Kit” ile son hacim 30 µl olacak şekilde temizlendi.

3.2.15.5.3. pPKH1-Mid1 plazmitin H1 Promotoru ve shRNA Eksprese Eden 300 bç’lik Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu

Konsantre edilmiş ve saflaştırılmış plazmit DNA 100 kere sulandırıldıktan sonra PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. 60°C bağlanma sıcaklığında 35 siklуста PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyondan sonra PZR ürünü %1,5 agaroz jelde yürütülerek doğrulandı. Tüm PZR reaksiyon karışımı enzimden ve tuzlardan arındırmak amacıyla “Ultra Clean GelSpin DNA Purification Kit” ile pürifiye edildi.

3.2.15.5.4. Amplifiye PZR Ürününün EcoRI Enzimi İle Kesilmesi

20 µl PZR ürünü
3 µl EcorI enzim
5 µl 10x enzim tampon
5 µl 10x BSA
17 µl ddH ₂ O
<hr/>
50 µl toplam

Reaksiyon karışımı hazırlandı ve vortekslenip 10 sn santrifüj edildi. 2 saat 37°C’de reaksiyona bırakıldı. 2 saat sonra DNA %1 lik agaroz jelde yürütülerek kesim kontrol edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı “Ultra Clean GelSpin DNA Purification Kit” ile pürifiye edildi.

3.2.15.5.5. Ligasyon

EcoRI enzimi ile kesilip 3’ uçları defosforile edilmiş pPKH1-Mid2 plazmit ile pPKH1-Mid1 plazmitinden PZR ile amplifiye edildikten sonra EcoRI enzimi ile her iki ucunda EcoRI yapışma bölgesi bulunduran H1-Mid1 ekspresyon kaseti ile ligasyona bırakıldı. Ertesi gün transformasyon yapıldı.

3.2.15.5.6. Mini Prep ve Pozitif Klonların Seçimi

Ertesi gün oluşan kolonilerden rastgele 8 tanesi belirlendi ve akşam saatlerinde her biri 3’er ml Kanamisinli LB bulunan steril deney tüplerine ekildi. Çalkalamalı etüv 210 rpm hıza ve 37°C’ye ayarlandı ve bakteriler burada 1 gece üremeye bırakıldı. Ertesi sabah Alkalin Lizis yöntemi ile bakterilerden plazmit DNA’ların ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Plazmit DNA’lar %1’lik agaroz jelde yürütüldü HindIII restriksiyon enzimiyle kesime bırakıldı. Herbir plazmit DNA için aşağıdaki karışım hazırlandı;

2 µl plazmit DNA
1 µl HindIII enzim
1 µl 10x HindIII tampon
1 µl 10x BSA
5 µl ddH ₂ O
<hr/>
10 µl

Karışım vortekslendi ve 10 sn santrifüj edildikten sonra 2 saat boyunca 37°C’de inkubasyona bırakıldı. Kesimin olup olmadığını anlamak için % 1 konsantrasyondaki Agaroz jelde (TBE) yürütüldü.

3.2.16. Lentivirüs Vektörün Hazırlanması

3.2.16.1. siRNA İçin Oligo Tasarımı

U6 ve H1 çift promotora sahip lentiviral plazmit lineer olarak gelmektedir. U6 promotorun eksprese edeceği kısma AAAG ile başlayan toplam 23 nükleotidlik gen spesifik sens oligo, H1 promotorun eksprese edeceği kısma AAAA ile başlayan toplam 23 nükleotidlik antisens oligo tasarlanıp sipariş edildi. Bu oligoların 19 nükleotidi 21-23 nükleotidlik siRNA’nın çift iplik olduğu komplementer dizilerini oluşturmaktadır. Bu sistemden eksprese olan siRNA’lar Dicer tarafından işleme tabi tutulmadan doğrudan RISC ile inkorpore olup RNAi yolağına katılırlar.

Mid1: U6 Promotor – 5’- AAAG **CTGGAAGAAGGAGTTTGG**A 3’-

3’-**GACCTTCTTCCTCAAACCT**AAAA 5’- H1 Promotor

Mid2: U6 Promotor – 5’- AAAG **TGCTCAGTGCCAGGAGACC** 3’-

3’-**ACGAGTCACGGTCCTCTGG**AAAA 5’- H1 Promotor

3.2.16.2. shRNA İçin Oligo Tasarımı

Kurduğumuz deney sisteminde çift promotordan siRNA iplikçığının sens ve antisens olmak üzere birer ipliğini eksprese ettirmenin yanında, her bir promotordan kendi üzerine katlanan 7 nükleotidlik saç tokasına sahip shRNA eksprese ettirerek 2 kat fazla siRNA oluşturmayı hedefledik. Bunun için aşağıdaki oligonükleotid dizilimlerini kullandık;

d-Mid1

5'-AAAGCTGGAAGAAGGAGTTTGGACTCTTGATCCAACTCCTTCTTCCAG 3'-
GACCTTCTCCTCAAACCT GAGAACT AGTTTGAGGAAGAAGGTCAAAA

d-Mid2

5'-AAAG TGCTCAGTGCCAGGAGACCCTCTTGAGGTCTCCTTGGCACTGAGCA 3'-
ACGAGTCACGGTCCTCTGGGAGAACTCCAGAGGAACCGTGACTCGTAAAA

Oluşacak olan shRNA'lar öncelikle Dicer aktivitesi ile siRNA'ya dönüştürülecek daha sonra RISC ile inkorpore olarak RNAi yolağına katılacaklardır.

3.2.16.3. Oligoların Birbirleri ile Bağlanması

23 nükleotidlik DNA oligoları 1 µg/µl konsantrasyon olacak şekilde sulandırıldı ve aşağıdaki gibi toplam 50 µl'lik karışım hazırlandı.

2 µl Sens oligo
2 µl Antisens oligo
46 µl bağlanma tamponu
<hr/>
50 µl toplam

Karışım vortekslendi ve 10 saniye santrifüjlenerek spin-down edildi. Karışım ısı bloğunda 90 °C de 3 dk bekletildi ve sıcaklık 37°C'ye düşene kadar bekledi (Yaklaşık 1 saat). İşlem tamamlandıktan sonra karışım üzerine 350 µl ddH₂O eklenerek hacim 400 µl'ye tamamlandı.

3.2.16.4. Bağlanan Oligoların siRNA Ekspresyon Plazmitine Ligasyonu

1 µl shRNA ekspresyon vektörü
1 µl bağlanmış oligo
1 µl T4 Ligaz Tampon (10x)
1 µl T4 Ligaz Enzim
6 µl ddH ₂ O
<hr/>
10 µl toplam

Yukarıdaki karışım hazırlanıp, vortekslendi ve 10 sn santrifüj edildi. 1 gece +4°C de bekletildi. Ertesi gün transformasyon yapıldı.

3.2.16.5. Mini Prep ve Pozitif Klonların Seçilmesi

Ertesi gün oluşan kolonilerden rastgele 12'şer tanesi belirlendi ve akşam saatlerinde her biri 3'er ml Ampisilinli LB bulunan steril deney tüplerine ekildi. Çalkalamalı etüv 210 rpm hıza ve 37°C'ye ayarlandı ve bakteriler burada 1 gece üremeye bırakıldı. Ertesi sabah alkalın lizis

yöntemi ile bakterilerden plazmit DNA'ların ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra pozitif klonların olduğu plazmitleri belirlemek için seçilen 4 plazmit DNA'ya U6 promotor sekansına spesifik primerler ile PZR yapıldı. PZR için plazmit DNA'lar 100 kere sulandırıldı ve reaksiyon karışımı hazırlandı ; karışım vortekslendi ve 10 sn santrifüj edildi. Reaksiyon 58°C bağlanma sıcaklığında 40 siklуста gerçekleştirildi.

3.2.16.6. pPKH1-Mid2 vektör plazmitte yer alan H1-Mid2 ekspresyon kasetinin pFIV lentiviral vektör plazmite klonlanması

Mid1 ve Mid2 shRNA'ları aynı anda eksprese eden pPKH1 vektör plazmit oluşturulmasında uygulanan yöntem aynı şekliyle H1-Mid2 ekspresyon kaseti içeren pFIV lentiviral vektör oluşturulmasında da kullanıldı. Ancak pozitif klonların ayırt edilmesi için mini prep plazmit DNA'ları ve H1-Mid2 ekspresyon kaseti sekansına spesifik primerler ile PZR gerçekleştirildi. Reaksiyon 58°C bağlanma sıcaklığı ve 40 siklуста gerçekleştirildi.

3.2.16.7. İnfektif Virüs Partiküllerinin Oluşturulması

Çalışmamızın temeli olan RNAi sistemini lentivirüs sistemi içerisinde kullanarak hedeflediğimiz gen ürünü olan *MDK* RNA'sını susturmak amacıyla çift promotor taşıyan pFIV-H1/U6-Puro vektörünü kullanıldı. RNA dizilimine uygun olarak hazırlanan DNA nükleotid diziliminin iki ucuna BbsI kesim bölgesi sekansı olacak şekilde yaptırıldıktan sonra pFIV-H1/U6-Puro vektörü içersine klonlandı. DNA nükleotidinin vektör içersindeki H1 ve U6 primerleri ve *MDK* spesifik primerlerle araştırıldı ve *MDK* siRNA bölgesinin vektör içersindeki varlığı teyit edildi. İçerisinde *MDK* genine spesifik DNA bulunduran vektör seçildi. Daha sonraki aşamada lentivirus oluşumunu sağlamak amacı ile Hek293T hücre kültürü içersine hazırlanan vektör ve virüs oluşumunu sağlayacak diğer vektörler ile birlikte lipofektamin kullanılarak transfekte edildi. Hücre mediumunda bulunan lentivirüsler toplandı ve içerisinde %10luk FCS bulunduran DMEM icesinde üremekte olan PancI pankreas kanser hücresine infekte edildi. 48 saat sonra hücre serilerinden elde edilen RNAdan cDNA yapılarak *MDK* RNA ekspresyon düzeyleri RT-PZR yöntemi ile araştırıldı.

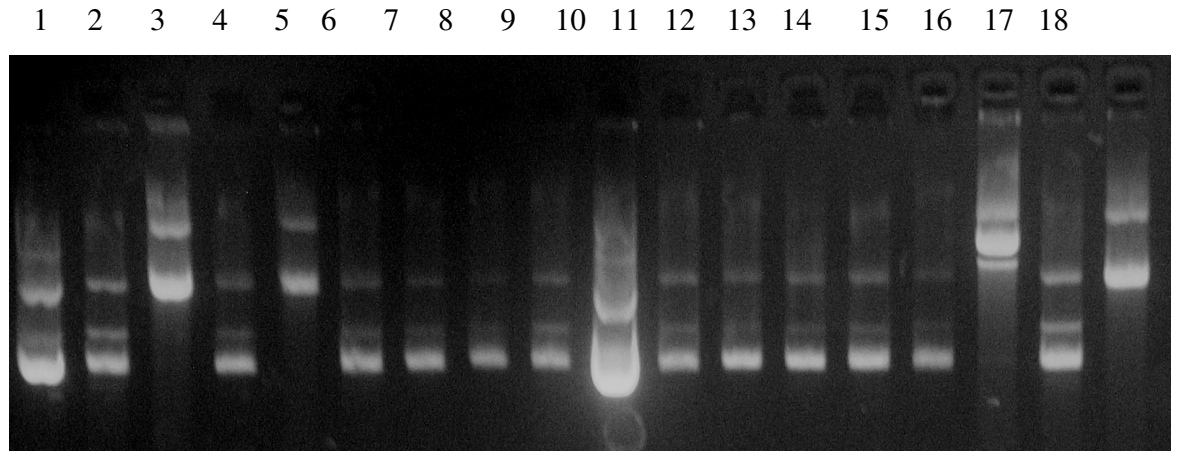
3.2.17. Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyonunun rölatif analizi için National Institute of Health tarafından ücretsiz olarak sunulan ImageJ 1.43u adlı program kullanılarak 34 siklus ve 60° bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilen PZR neticesinde ürünlerinin agaroz jelde UV ışığı altında oluşturdukları bantların verdikleri ışımaya miktarları ölçülüp gen ekspresyonları sayısal veriye dönüştürüldü. *MDK* geni ekspresyon seviyelerinin *ACTB* gen ekspresyon seviyelerine oranı bulundu ve kontrol hücre grubundaki ekspresyon seviyelerine göre kıyaslandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

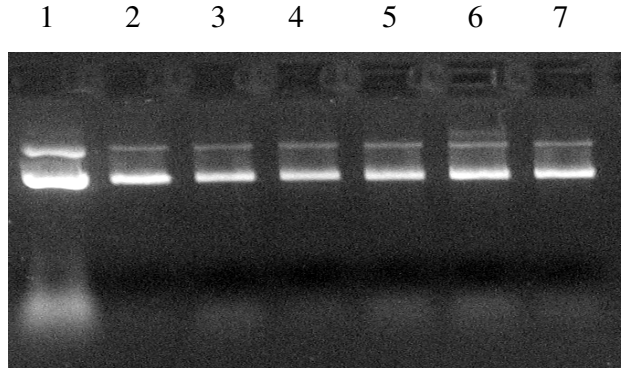
4.1. Plazmit siRNA Vektörlerinin Hazırlanması

Şekil 4.1.de Plazmit vektör pPKH1 içine Mid1 ve Mid2 oligonükleotidlerinin klonlanmasından sonra elde edilen mini prep plazmit DNA'lar %1'lik agaroz jelde (TBE) 120V'da yürütülmüştür.



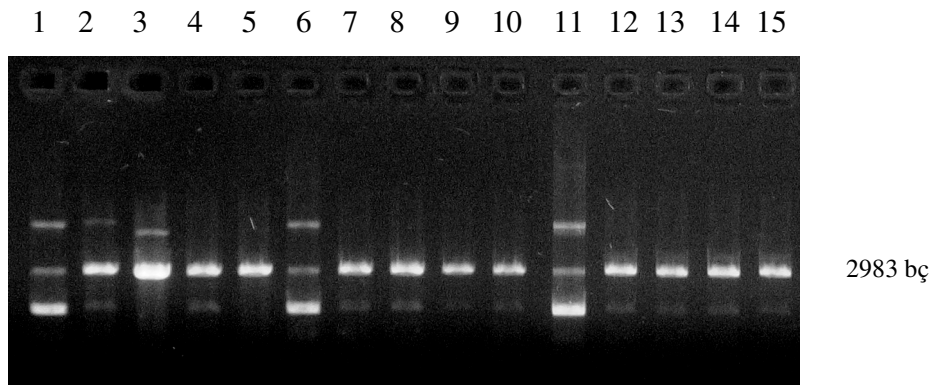
Şekil 4.1. pPKH1-Mid1 ve Mid2 mini prep jel görüntüsü. K 1-10 pPKH1 kontrol plazmit DNA, K 2-9 pPKH1- Mid1 mini prep plazmit DNA'ları, K11-18 pPKH1- Mid2 mini prep plazmit DNA'ları

Şekil 4.2’de Plazmit vektör pPKH1 içine Mid2-2 oligonükleotidinin klonlanmasından sonra elde edilen mini prep plazmit DNA’lar %1’lik agaroz jelde (TBE) 120V’da yürütülmüştür.



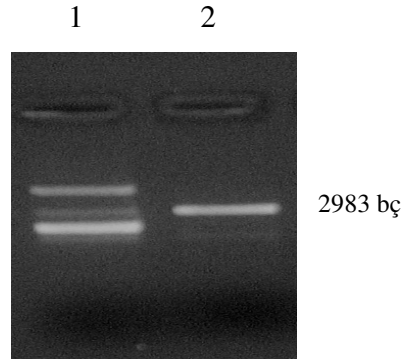
Şekil 4.2 pPKH1-Mid2-2 Mini prep jel görüntüsü K1: pPKH1 kontrol plazmit DNA K2-7: pPKH1-Mid2-2 mini prep plazmit DNA’ları

Şekil 4.3’de pPKH1-Mid1, pPKH1-Mid2 ve pPKH1-Mid2-2 Plazmit DNA’lar pozitif klonların belirlenmesi amacıyla her gruptan ilk 4 tanesi HindIII enzimi ile kesime konulduktan sonra %1’lik agaroz jelde (TBE) 120V’da yürütülmüştür; Neredeyse tümünün HindIII ile kesilmiş olması pozitif klon olduklarını göstermektedir.



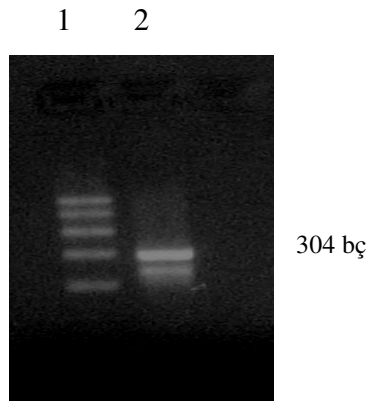
Şekil 4.3 HindIII ile kesilmiş pPKH1 mini prep plazmit DNA’ları. K 1,6,11: Kesilmemiş kontrol plazmit DNA, K 2-5: Hind III ile kesilmiş pPKH1-Mid1 plazmit DNA’lar, K 7-10: HindIII ile kesilmiş pPKH1-Mid2 plazmit DNA’lar, K 12-15: HindIII ile kesilmiş pPKH1-Mid2-2 plazmit DNA’lar

Şekil 4.4’de pPKH1-Mid2 vektör plazmitin EcoRI enzim ile kesim sonucu görülmektedir.



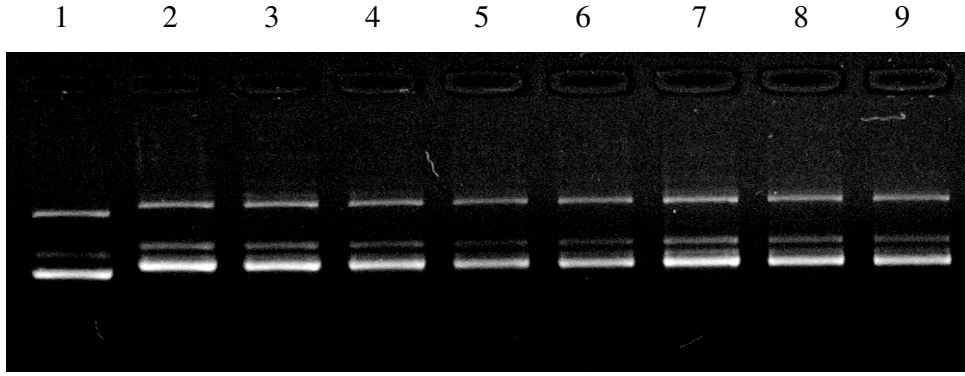
Şekil 4.4 EcoRI ile kesilmiş pPKH1-Mid2 plazmit DNA. K1:Kesilmemiş kontrol plazmit DNA, K2:EcoRI ile kesilmiş pPKH1-Mid2 plazmit DNA

Şekil 4.5’de pPKH1-Mid1 vektör plazmit içindeki H1 promotor ve Mid1 oligonükleotid içeren ekspresyon kaseti PZR ile amplifiye edildikten sonra %1.5 agaroz jelde 120V’da yürütülmüştür.



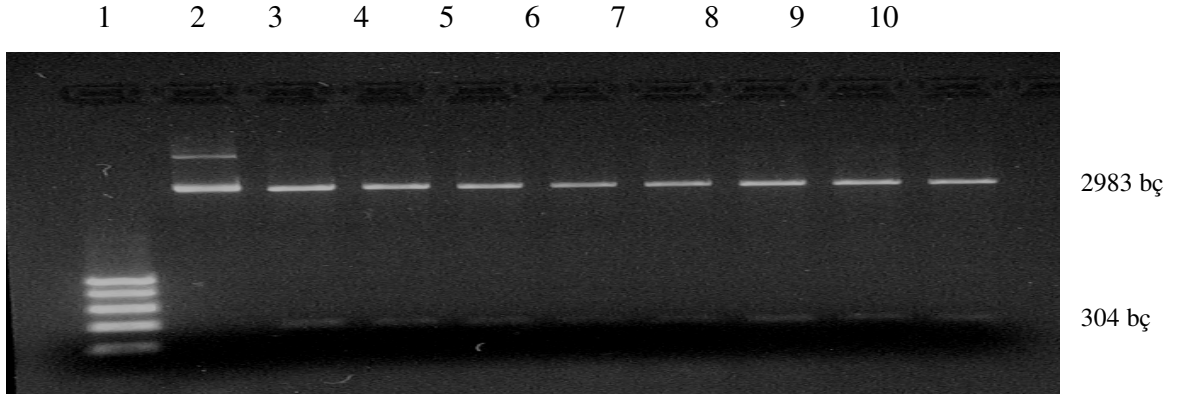
Şekil 4.5 pPKH1-Mid1 H1 ekspresyon kaseti PZR jel görüntüsü. K1:200-600 bç marker , K2: H1 promotor ve Mid1 oligonükleotid içeren 300 bç PZR ürünü

Şekil 4.6'da EcorI enzimi ile kesilip defosforile pPKH1-Mid2 plazmit ile pPKH1-Mid1 plazmitten amplifiye edilip EcoRI ile kesilen H1 promotor ve Mid1 oligonükleotidi içeren ekspresyon kasetinin ligasyonundan sonra yapılan mini prep plazmit DNA'lar %1'lik agaroz jelde (TBE) 120V'da yürütülmüştür. Elde edilen bantların kontrol pPKH1-Mid1 plazmitten daha ağır oldukları görülmektedir.



Şekil 4.6 K1: pPKH1-Mid1plazmit kontrol DNA, K 2-9: pPKH1-Mid(1+2) mini prep plazmit DNA'lar.

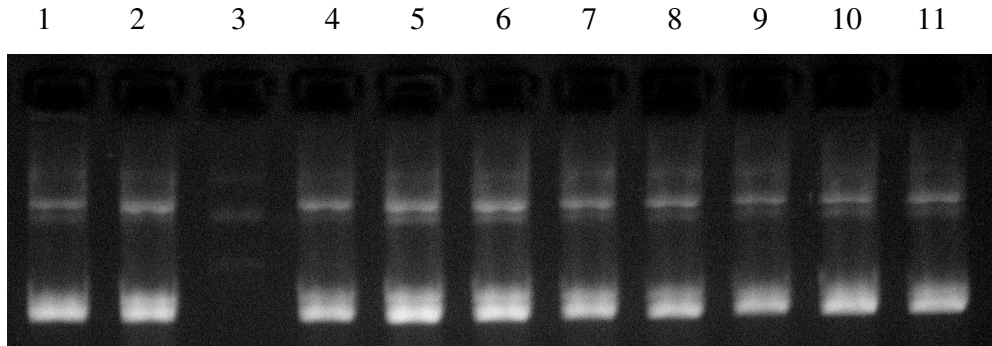
Şekil 4.7’de pPKH1(Mid1+2) Mid1 ve Mid2 shRNA eksprese eden plazmit DNA’lar HindIII ile kesildikten sonra tümünde çift bant oluşumu gözlemlendi. DNA’lar %1lik agaroz jelde 120V’da yürütüldü. Aynı anda hem Mid1 hem de Mid2 shRNA eksprese etmesini sağladığımız vektörde 2 tane HindIII kesim bölgesi mevcuttur. Bu durumda HindIII ile kesildikten sonra çift bant oluşumu gözlenmesi beklenmektedir.



Şekil 4.7 K 1: 200-600 bç marker, K 2: Kesilmemiş kontrol plazmit DNA, K 3-10 : HindIII enzimi ile kesilmiş pPKH1-Mid(1+2) plazmit DNA’lar.

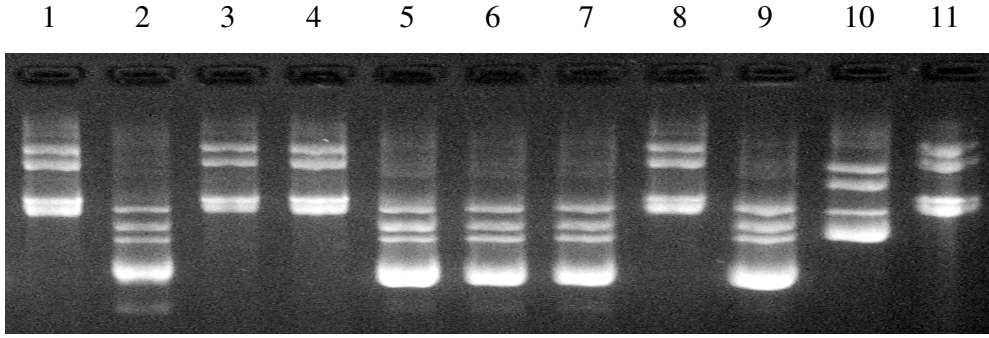
4.2. Lentivirüs siRNA Vektörün Hazırlanması

Şekil 4.8’de pFIV lentiviral plazmit vektöre Mid1 oligonükleotidin klonlanmasından sonra yapılan mini prepten elde edilen plazmit DNA’lar %1’lik agaroz jelde (TBE) 120V’da yürütüldü.



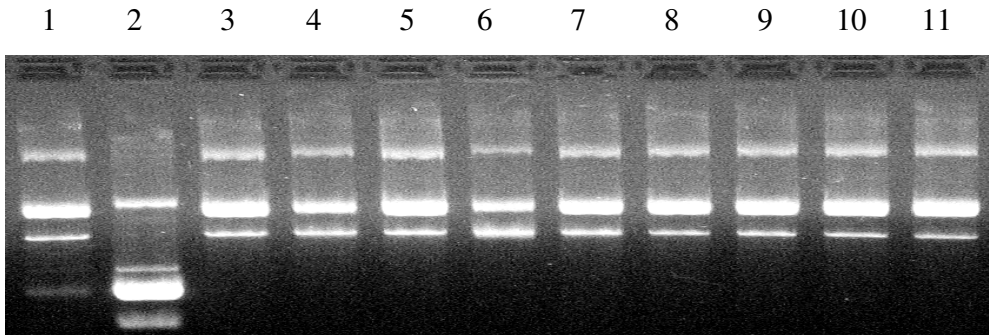
Şekil 4.8 K 1: pFIV kontrol plazmit DNA, K 2-11: pFIV-Mid1 mini prep plazmit DNA’ları

Şekil 4.9'da pFIV lentiviral plazmit vektöre Mid2 oligonükleotidin klonlanmasından sonra yapılan mini prepten elde edilen plazmit DNA'lar %1'lik agaroz jelde (TBE) 120V'da yürütüldü. Kontrol DNA ile aynı büyüklüğe sahip olan plazmitler 3,4,8 ve 11 numaralı kuyucuklarda görülmektedir.



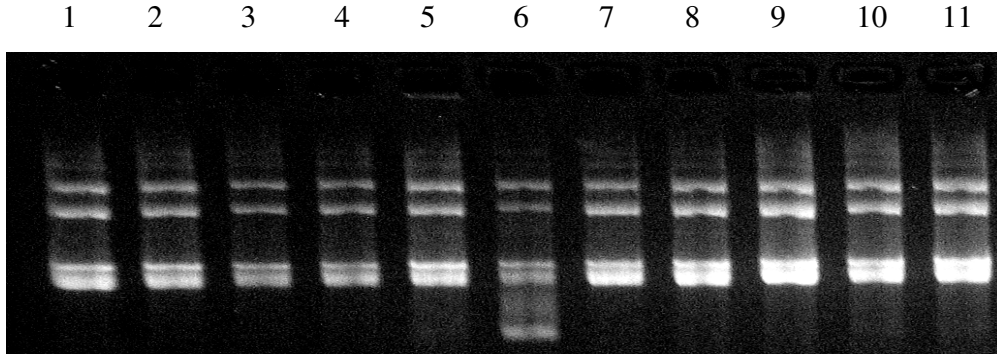
Şekil 4.9 K1: pFIV kontrol plazmit DNA, K 2-11: pFIV-Mid2 mini prep plazmit DNA'ları

Şekil 4.10'da pFIV lentiviral plazmit vektöre d-Mid1 oligonükleotidin klonlanmasından sonra yapılan mini prepten elde edilen plazmit DNA'lar %1'lik agaroz jelde (TBE) 120V'da yürütüldü. Kontrol DNA ile aynı büyüklüğe sahip olan plazmitler 3,4,5,6,7,8,9,10 numaralı kuyucuklarda görülmektedir



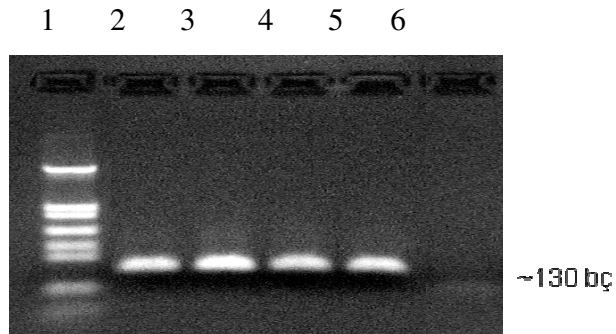
Şekil 4.10 K1: pFIV kontrol plazmit, K 2-11 : pFIV-d-Mid1 mini prep plazmit DNA'ları

Şekil 4.11’de pFIV lentiviral plazmit vektöre d-Mid2 oligonükleotidin klonlanmasından sonra yapılan mini prepten elde edilen plazmit DNA’lar %1’lik agaroz jelde (TBE) 120V’da yürütüldü. Kontrol DNA ile aynı büyüklüğe sahip olan plazmit DNA’lar görülmektedir.



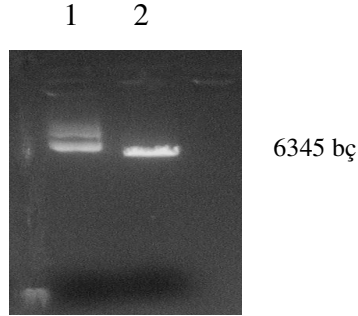
Şekil 4.11 K1: pFIV kontrol plazmit, K 2-11 : pFIV-d-Mid2 mini prep plazmit DNA’ları

Şekil 4.12’de pFIV-Mid1, pFIV-Mid2, pFIV-d-Mid1 ve pFIV-d-Mid2 klon plazmitlerin validasyonu için taşıdıkları oligonükleotidler ve U6 promotor sekansına spesifik primerler ile yapılan PZR sonucunda DNA’lar %1.5’luk agaroz jelde (TBE) 120V’da yürütüldü.



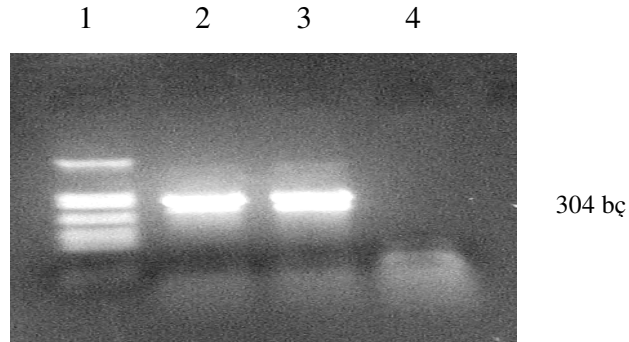
Şekil 4.12 pFIV plazmitlerden yapılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü. K1: Anaerob marker, K2: pFIV-Mid1, K3: pFIV-mid2, K4: pFIV-d-Mid1, K5: pFIV-d-Mid2, K6: Negatif PCR kontrol

Şekil 4.13’de pFIV self ligasyon vektörün EcoRI ile kesildikten sonra %1’lik agaroz jelde (TBE) 120V’da yürütülmüştür.



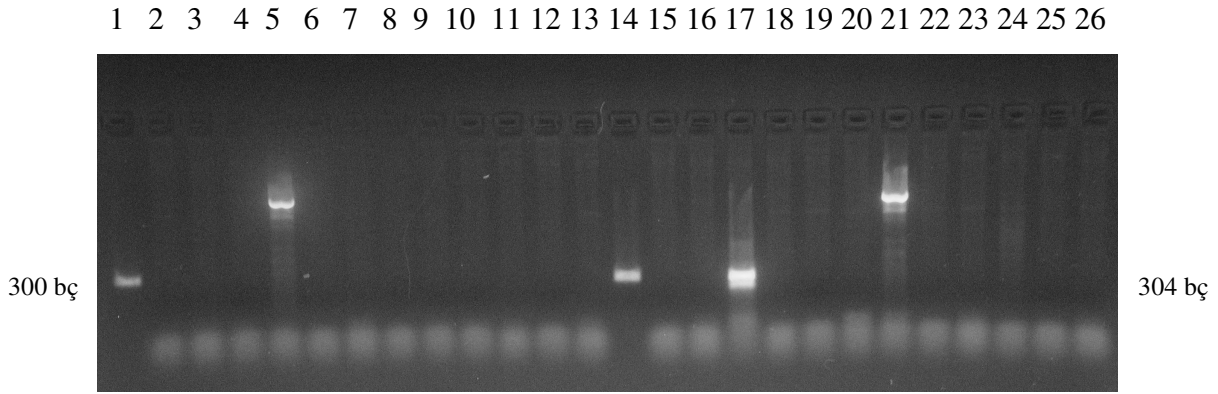
Şekil 4.13 K1 : Kontrol pFIV lentiviral vektör plazmit DNA, K2: EcoRI ile kesilmiş pFIV lentiviral vektör plazmit DNA

Şekil 4.14’de pFIV lentiviral vektör plazmit içine yerleştirilmek istenen pPKH1-Mid1 ve pPKH1-Mid2 vektör plazmitler içinde yar alan 300 bçlik H1 promotor ve Mid1 veya Mid2 oligonükleotid içeren ekspresyon kaseti PZR ile amplifiye edildikten sonra %1.5’luk agaroz jelde 120V’ da yürütülmüştür.



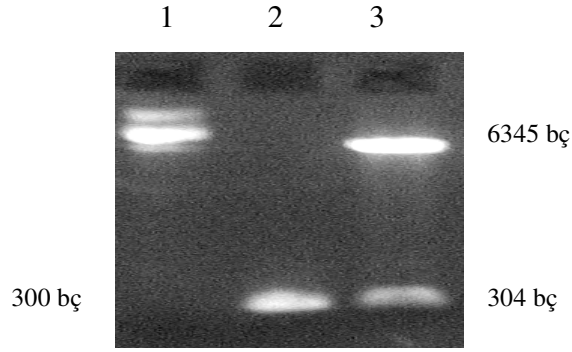
Şekil 4.14 K1 : Anaerob marker K2: H1 promotor ve Mid1 oligonükleotid içeren 300 bç PZR ürünü, K3: H1 promotor ve Mid2 oligonükleotid içeren 300 bç PZR ürünü, K4: Negatif kontrol

Şekil 4.15’de H1-Mid1 ve H1-Mid2 ekspresyon kasetleri ile EcoRI ile kesildikten sonra defsoforile edilmiş pFIV vektör ile ligasyona bırakıldıktan sonra yapılan mini prep plazmit DNA’lara ekspresyon kaseti DNA dizilimine spesifik primerler ile PZR yapıldıktan sonra ürünler %1.5’luk agaroz jelde 120V’da yürütülmüştür. Oluşması beklenen 300 bç’lik ürün yalnızca 17 numaralı kuyucukta görülmektedir. pFIV vektöre H1-Mid2 ekspresyon kaseti klonlandığını göstermektedir.



Şekil 4.15 K 1,14: 300 bç kontrol DNA K 2-13: pFIV vektör ile H1-Mid1 ekspresyon kasetinin ligasyon sonrası elde edilen mini prep plazmit DNA’lardan 300 bçlik ekspresyon kasetine spesifik primerler ile yapılan PZR sonuçları, K 15-26: pFIV vektör ile H1-Mid2 ekspresyon kasetinin ligasyon sonrası elde edilen mini prep plazmit DNA’lardan 300 bçlik ekspresyon kasetine spesifik primerler ile yapılan PZR sonuçları

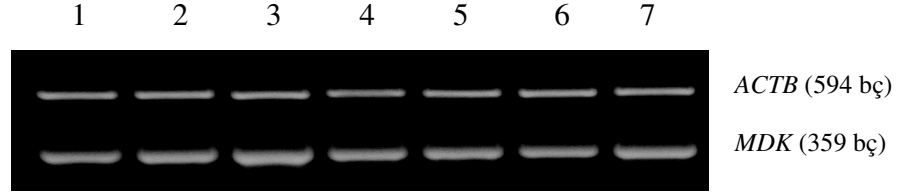
Şekil 4.16'da pFIV vektör ile H1-Mid2 ekspresyon kasetinin ligasyon sonrası elde edilen mini prep plazmit DNA'larından 300 bçlik ekspresyon kasetine spesifik primerler ile yapılan PZR sonucunda amplifikasyon sağlanan plazmit DNA, ekspresyon kasetinin her iki ucunda yer alan EcoRI kesim bölgesi olduğu için enzim ile kesildi ve %1'lik agaroz jelde 120V'da yürütüldü. Kesim sonucu 300 bç'lik bant oluştu ve klon varlığı doğrulandı.



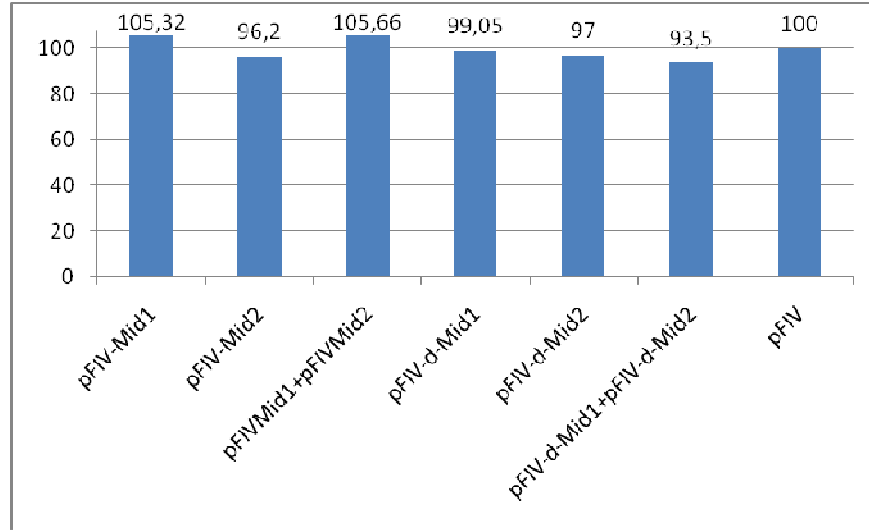
Şekil 4.16 K1: pFIV lentiviral plazmit vektör kontrol DNA, K2: 300 bç büyüklüğünde kontrol DNA, K3: EcoRI enzimi ile kesilmiş H1-Mid2 ekspresyon kaseti klonlanan pFIV lentiviral vektör plazmit DNA

4.3. Gen Ekspresyon Analizi

Şekil 4.17’de HepG2 hücrelerinde Mid1, Mid2, d-Mid1, d-Mid2 siRNA eksprese eden lentivirüslerin infeksiyonundan sonra *MDK* geni ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler görülmektedir. Ekspresyon düzeyleri ölçüldükten sonra *ACTB* geni ekspresyon seviyeleri ile kıyaslanarak artış ve azalmalar % ekspresyon miktarı olarak Şekil 4.19’de gösterilmiştir.

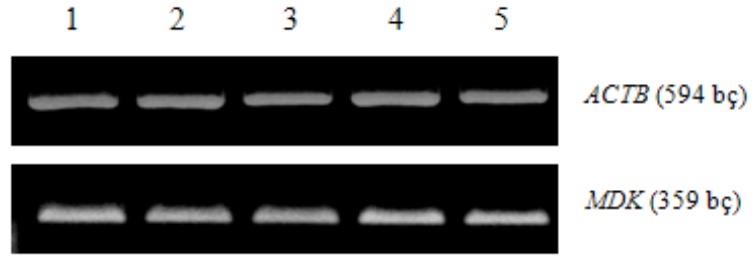


Şekil 4.17. K1: pFIV-Mid1, K2: pFIV-Mid2, K3: pFIV-Mid1+pFIV-Mid2, K4: pFIV-d-Mid1, K5: pFIV-d-Mid2, K6: pFIV-d-Mid1+pFIV-d-Mid2, K7: pFIV

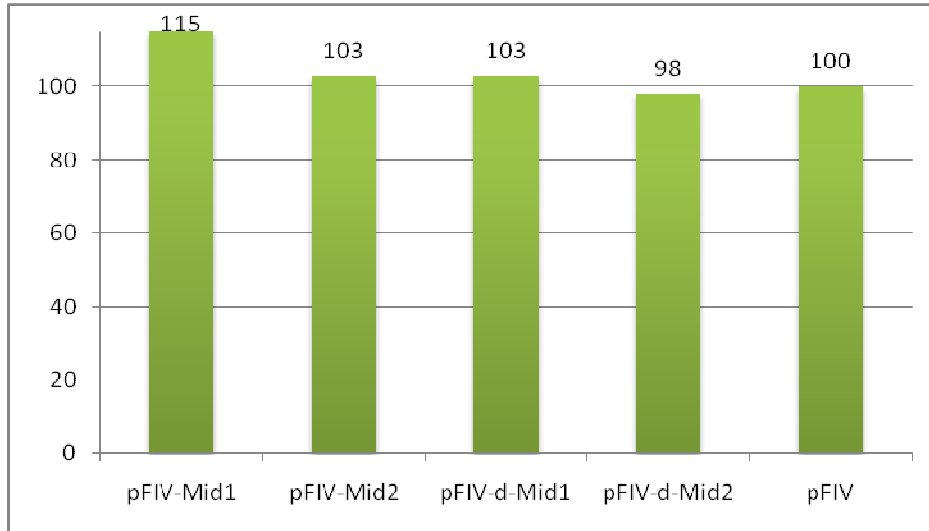


Şekil 4.18. *MDK* geninin lentivirüs ile infekte edilen HepG2 hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri.

Şekil 4.19’da Hek293 hücrelerinde Mid1, Mid2, d-Mid1, d-Mid2 siRNA eksprese eden lentiviral plazmit vektörlerin transfeksiyonundan sonra sonra *MDK* geni ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler görülmektedir. Ekspresyon düzeyleri ölçüldükten sonra *ACTB* geni ekspresyon seviyeleri ile kıyaslanarak artış ve azalmalar % ekspresyon miktarı olarak Şekil 4.20’de gösterilmiştir.

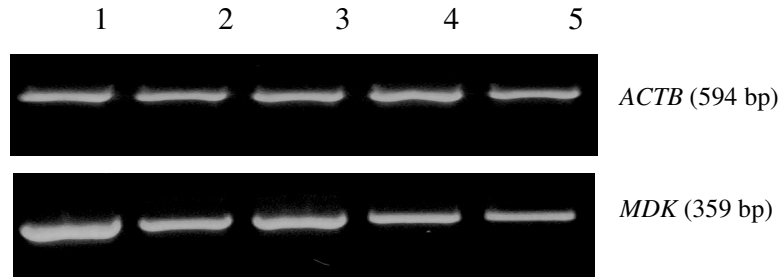


Şekil 4.19. K1: pFIV-Mid1, K2: pFIV-Mid2, K3: pFIV-d-Mid1, K4: pFIV-d-Mid2, K5: kontrol pFIV

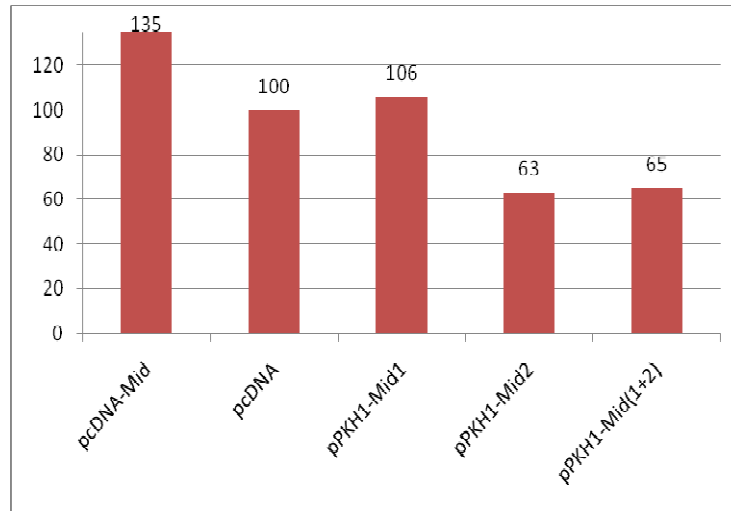


Şekil 4.20. *MDK* geninin pFIV lentiviral plazmitlerle transfekte edilen Hek293 hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri.

Şekil 4.21’de PancI hücrelerine *MDK* geni eksprese eden pcDNA plazmiti, boş pcDNA plazmiti, pPKH1-Mid1, pPKH1-Mid2 ve Mid1 ile Mid2 siRNA’larını aynı anda eksprese eden pPKH1 plazmit transfeksiyonu yapıldıktan sonra *MDK* gen ekspresyon seviyesindeki değişimler gözlenmektedir. Ekspresyon düzeyleri ölçüldükten sonra Aktin geni ile kıyaslanarak artış ve azalmalar % ekspresyon miktarı olarak Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

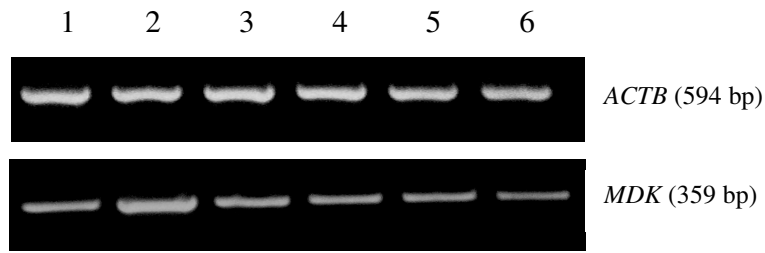


Şekil 4.21. K1: pcDNA-Mid, K2: pcDNA, K3: pPKH1-Mid1, K4: pPKH1-Mid2, K5: pPKH1-Mid(1+2)

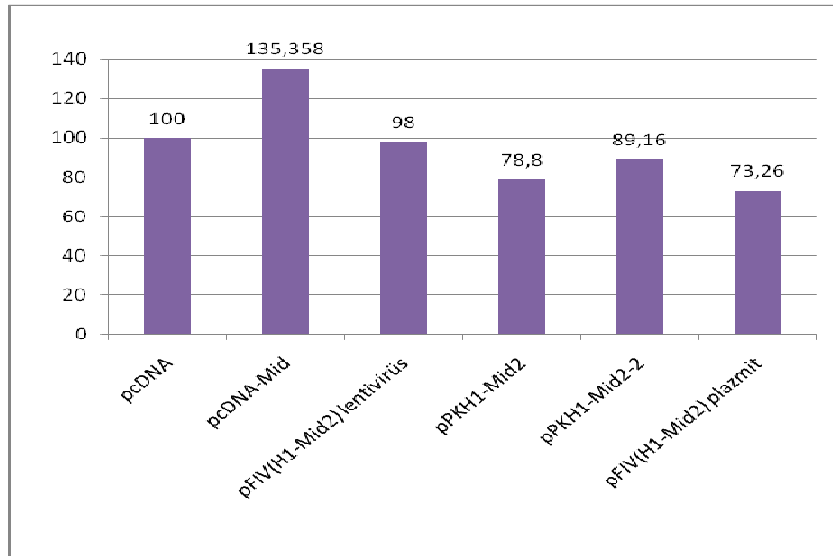


Şekil 4.22. *MDK* geninin pcDNA ve pPKH1 plazmitleri ile transfekte edilen PancI hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri.

Şekil 4.23’de pFIV lentivirüs sistemi içine pPKH1-Mid2 plazmit vektörün H1-Mid2 ekspresyon kaseti yerleştirildikten sonra ayrı ayrı lentivirüs ve lentiviral plazmit olarak PancI hücrelerinde *MDK* geni ekspresyon seviyesini nasıl etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca burada pPKH1-Mid2 plazmiti ve Mid2 oligonükleotidinin ters olarak yerleştirildiği pPKH1-Mid2-2 plazmitinin de PancI hücrelerinde *MDK* geni ekspresyon seviyesini nasıl etkilediği gösterilmiştir. Ekspresyon düzeyleri ölçüldükten sonra *ACTB* geni ekspresyonu ile kıyaslanarak artış ve azalmalar % ekspresyon miktarı olarak Şekil 4.24’de gösterilmiştir.



Şekil 4.23. K1: pcDNA, K2: pcDNA-Mid, K3: pFIV(H1-Mid2) lentivirüs , K4: pPKH1-Mid2, K5: pPKH1-Mid2-2, K6: pFIV(H1-Mid2) plazmit



Şekil 4.24. *MDK* geninin pCDNA, pPKH1, pFIV transfeksiyonu ve lentivirüs infeksiyonundan sonra PancI hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Memeli hücrelerinde RNA interferans mekanizmasının keşfinden sonra araştırmacılar memeli genlerinin fonksiyonlarını ortaya çıkartmak ve hastalıklarla ilişkili genlerin ekspresyonlarının tedavi amaçlı manipülasyonu için bu tekniğin en etkin biçimde uygulanabileceği yöntemler üzerinde yoğunlaşmışlardır.

Yapılan çalışmaların önemi göze alındığında, bu tür çalışmaların etkin ve güvenilir sistemlerle yürütülmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Çalışmanın amacına yönelik uygun vektörün seçimi hayati önem arz etmektedir. Bu çalışmada bir sonraki aşamada *in vivo* kullanımı öngörülen lentivirüs RNAi sistemi ile bu sistemin *in vitro* hücre kültürü ortamında kıyaslanacağı plazmit temelli RNAi sistemleri kullanılmış ve hedef gen üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır.

Çalışmamızda öncelikle memeli hücre hattında daha önceki çalışmalarımızda etkinliği valide edilmiş siRNA dizilimlerine uygun siRNA'ları eksprese eden temelli RNAi sistemi kullanılmıştır. Ancak elde edilen sonuçlarda sistemimizin hedef gen üzerinde herhangi bir etkisi saptanamamıştır. Memeli Hek293 hücrelerine lentivirüs genomunu ve virüs partiküllerini oluşturacak olan plazmitlerin transfeksiyonuyla oluşması beklenen infeksiyöz virüs partikülleri ile HepG2 hücreleri infekte edilmiş ve ardından yapılan ekspresyon analizinde 85 hedef gen ekspresyonu üzerinde belirgin bir azalmaya yol açmadığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

Daha sonra, lentiviral plazmitlerin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için transfeksiyonu kolay Hek293 hücrelerine Mid1, Mid2, d-Mid1 ve d-Mid2 siRNA'ları eksprese eden pFIV lentiviral plazmitler transfekte edilmiş ve yine hedef gen ekspresyonu üzerinde belirgin bir azalma gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

Bu aşamada öncelikle transfeksiyon basamağında bir problem olabileceği düşünülmüş ve plazmit temelli siRNA sistemi satın alınmıştır. Plazmit vektör içine lentivirüs sisteminde kullanılan aynı dizilimlere sahip siRNA'ları oluşturacak oligonükleotidler klonlanmış ve hücre

hattında hedef genin ifadesini azalttığı görülmüştür. Ayrıca transfeksiyon veriminin daha iyi gözlemlenebilmesi için hedef genin mRNA'sını eksprese eden memeli ekspresyon vektörü pcDNA-Mid plazmiti kullanılmıştır. Hedef gen ekspresyonunda %35 oranında artış görülmesi de transfeksiyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Aynı hedefe karşı farklı siRNA dizilimleri eksprese eden plazmit vektörlerden pPKH1-Mid2 plazmitin hedef genin ifadesini %37 oranında azalttığı, pPKH1-Mid1 plazmitin neredeyse hiç etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Kendi oluşturduğumuz hem Mid1 hem de Mid2 siRNA'ları aynı anda eksprese eden pPKH1-Mid(1+2) plazmitin ise pPKH1-Mid2 plazmit ile hemen hemen aynı etkinlikle hedef gen ifadesini azalttığı gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalara sadece Mid2 siRNA eksprese eden vektörlerle devam edilmesi kararlaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

Lentivirüs sistemin çalışmama sebebi olarak çift promotor mekanizmasında bir hata olabileceği düşünülmüş ve plazmit vektör sisteminde kullanılan ve çalıştığı gösterilmiş olan H1 promotoru ve Mid2 siRNA kodlayan oligonükleotid içeren ekspresyon kaseti PZR ile çoğaltılıp lentiviral plazmit vektöre klonlanmıştır. Bu aşamada kurulan deney sisteminde Mid2 eksprese eden pPKH1 plazmit, H1-Mid2 ekspresyon kasetini içeren pFIV plazmit, bu plazmiti içeren lentivirüs ve Mid2 diziliminin tam tersi dizilime sahip Mid2-2 siRNA eksprese eden pPKH1 plazmit vektörlerin PancI hücre hattındaki hedef gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. H1-Mid2 ekspresyon kaseti içeren pFIV plazmit yapılan deneyde en yüksek susturma yüzdesine sahipken (%27) aynı plazmiti içeren lentivirüsün gen ekspresyonunu neredeyse hiç etkilememesi Lentivirüs sisteminin virüs paketleyici bileşenlerindeki sorunlu olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca Mid2 siRNA ile tersi dizilimde siRNA eksprese eden pPKH1-Mid2-2 plazmitin hedef genin ekspresyonu üzerindeki etkisi de pPKH1-Mid2 plazmite göre (%23) daha zayıf kalmıştır. Burada Mid2 diziliminin doğru bir seçim olduğu ortaya konmuştur (Bkz. Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

Gen ifadesindeki azalış oranlarının maksimum %35 lere olması elde edilen RNA'ların sadece transfekte hücrelerden değil, ortamdaki bütün hücrelerden alınmasından kaynaklanmaktadır. Stabil hücre hatlarının elde edilmesi durumunda hedef gen ifadesinde azalmanın çok daha yüksek verimlerde gözleneceği açıktır. Çalışmamızda asıl hedeflenen lentivirüs ile plazmit

temelli RNAi sistemleri arasındaki etkinliğin karşılaştırılması olduğundan stabil hücrelerle devam edilmesi gerekliliği lentivirüs sisteminin çalışmaması nedeniyle ortadan kalkmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, bir sonraki aşamada *in vivo* kullanımı düşünülen lentivirüs sisteminin uygun bir seçenek olmadığı kültür hücrelerinde *in vitro* düzeyde gösterilmiştir. Karşılaştırma amaçlı kullandığımız plazmit temelli RNAi sisteminin *in vitro* çalışmalarda etkinliğinin gösterilmesi bu fikrimizi desteklemektedir ancak bu sistemin *in vivo* kullanımı da oldukça sınırlıdır. Tam bir organizmada yapılacak çalışmalarda kalıcı RNAi fenotiplerinin oluşturulmasında tüm doku ve hücrelere ulaşılabilmesi için lentiviral platformlara ihtiyaç vardır. Daha sonra yapılacak olan *in vivo* çalışmalarımızda kullanılmak üzere yaygın olarak kullanımı bildirilen güvenilirliği kanıtlanmış lentivirüs temelli RNAi sistemlerinden biri seçilmesi daha uygun bir adım olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abraham N., Stojdl D.F., Duncan P.I., Methot N., Ishii T., Dube M., Vanderhyden B.C., Atkins H.L., Gray D.A., Burney M.W., Koromilas A.E., Brown E.G., Sonenberg N., Bell J.C. 1999. Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem*, (274); 5953-5962.
- Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H. 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res*, (31); 589–595.
- Ambros V., Lee R.C., Lavantay A., Williams P.T., Jewell D. 2003b. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, (13); 807-818.
- Barton G.M., Medzhitov R. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (99); 14943-14945.
- Beaucage S.L., Caruthers M.H. 1996. *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*. Oxford University Press, Oxford, England.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, (409); 363-366.
- Billy E., Brondani V., Zhang H., Muller U., Filipowics W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, (98); 14428-14433.
- Billy E., Brondani V., Zhang H., Muller U., Filipowicz W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, doublestranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, (98); 14428–14433.
- Bitko V., Muiyisenko A., Shulyayeva O., Barik S. 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*, (11); 50-55.
- Bohnshack M.T., Czaplinski K., Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding-protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, (10); 185-191.

- Boutla A., Delidakis C., Livadaras I., Tsagris M., Tabler M. 2001. Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr Biol*, (11);1776–1780.
- Bridge A.J., Pebernard S., Ducraux A, Nicoulaz A.L., Iggo R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genet*, (34); 263–264.
- Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. 2002a. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, (296); 550-553.
- Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. 2002b. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, (2); 243-247.
- Buchsacher G.L., Jr. and Wong-Staal F. 2000. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, (95); 2499–2504.
- Calegari F., Haubensak W., Yang D., Huttner W.B., Buchholz F. 2002. Tissue specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, (99); 14236–14240.
- Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R.A. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, (98);9742-9747.
- Carmell M.A., Zhang L., Conklin D.S., Hannon G.J., Rosenquist T.A. 2003. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol*, (10); 91-92.
- Check E. 2005. A crucial test. *Nat Med*, (11); 243-244.
- Chinnasamy D., Chinnasamy N., Enriquez M.J., Otsu M., Morgan R.A., and Candotti F. 2000. Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood*, (96); 1309–1316.
- Chiu Y.L., Rana T.M. 2003. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *Rn.a – A Publication of the Rn.a Society*, (9); 1034–1048.

- Clapham P.R. and McKnight, A. 2001. HIV-1 receptors and cell tropism. *Br. Med. Bull.*, (58); 43–59.
- Clemens M.J. 1997. Pkr – a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol*, (29); 945–949.
- Clemens M.J., Elia A. 1997. The doublestranded RNA-dependent protein kinase PKR – structure and function [Review]. *J Interferon Cytokine Res*, (17); 503–524.
- Coffin J.M., Huges S.H., and Varmus H.E. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA
- Cogoni C., Macino G. 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, (399); 166-169.
- Cogoni C., Macino G. 1997. Isolation of quelling defective (QDE) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,(94); 10233-10238.
- Couzin J. 2002. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science*, (298); 2296-2297.
- Dector M.A., Romero P., Lopez S., Arias C.F. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO J*, (3);1175-1180.
- Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H., Ketting R.F., Hannon G.J. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, (432); 231-235.
- Devroe E., Silver P.A. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol*,(2);15.
- Diallo M., Arenz C., Schmitz K., Sandhoff K., Schepers U. 2003a. Long endogenous dsRNAs can induce a complete gene silencing in mammalian cells and primary cultures. *Oligonucleotides*, (13); 381–392.

- Dickins R.A., Hemann M.T., Zilfou J.T., Simpson D.R., Ibarra I., Hannon G.J., Lowe S.W. 2005, Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet*, (37); 1289-1295.
- Doench J.G., Petersen J.P, Sharp P.A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, (17); 438-442.
- Doms R.W., Trono D. 2000. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev*, (14); 2677-2688.
- Dykxhoorn D.M., Lieberman J. 2006. Silencing viral infection. *PloS Med*, (3);e242.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, (411); 494-498.
- Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. 2001b. Rna interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs. *Genes Dev*, (15); 188-200.
- Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. ,Tuschl T. 2001c. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, (20); 6877–6888.
- Farson D., Witt R., McGuinness R. 2001. A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, (12); 981–997.
- Filippov V., Solovyev V., Filippova M., Gill S.S. 2000. A novel type of Rnase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, (245); 213-221.
- Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, (391); 806-811.
- Fortin K.R., Nicholson R.H., Nicholson A.W. 2002. Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics*, (3); 26.

- Freed E.O. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, (251); 1–15.
- Gallay P., Hope T., Chin D., and Trono D. 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (94); 9825–9830.
- Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J. 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, (100); 2718-2723.
- Gitlin L., Karelsky S., Andino R. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, (418); 430–434.
- Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, (432); 235-240.
- Grishok A., Pasquinelli A.E., Conte D., Li N., Parrish S., Ha I., Baillie D.L., Fire A., Ruvkun G., Mello C.C. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, (106); 23-34.
- Gunnery S., Ma Y., Mathews M.B. 1999. Termination sequence requirements vary among genes transcribed by RNA polymerase III. *J Mol Biol*, (286); 745–757.
- Guo S., Kemphues K.J. 1995. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, (81); 611-620.
- Gündoğdu R., Çelik V. 2009. RNA İNTERFERANS (RNAİ). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1-2); 34 – 47.

- Haffar O.K., Popov S., Dubrovsky L. 2000. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 preintegration complex. *J. Mol. Biol.*, (299); 359–368.
- Hall T.M. 2005. Structure and function of argonaute protein. *Structure*, (13);1403-1408.
- Hamilton A.J., Baulcombe D.C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Science*, (286); 950-952.
- Han J., Lee Y., Yeom K.H., Kim Y.K., Jin H., Kim V.N. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary miRNA processing. *Genes Dev*, (18); 3016-3027.
- Han J., Lee Y., Yeom K.H., Nam J.W., Heo I., Rhee J.K., Sohn S.Y., Cho Y., Zhang B.T., Kim V.N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, (125); 887-901.
- Hannon G.J., 2002. RNA Interference. *Nature*, (418); 244-251.
- Hemann M.T., Fridman J.S., Zilfou J.T., Hernando E., Paddison P.J., Cordon-Cardo C., Hannon G.J., Lowe S.W. 2003. An epigenetic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi procedures distinct tumor phenotypes *in vivo*. *Nat Genet*, (33); 396-400.
- Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M.T., Babaie E., Prydz H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, (30); 1757–1766.
- Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., Balint E., Tuschl T., Zamore P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, (293); 834-838.
- Hutvagner G., Zamore P.D. 2002. A MicroRNA in multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, (297); 5589.
- Irvine D.V., Zarategui M., Tolia N.H., Goto D.B., Chitwood D.H., Vaughn M.W., Joshua-Tor L., Martienssen R.A. 2006. Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Proc Natl Acad Sci USA*, (103); 1134-1137.

- Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnol*, (21); 635–637.
- Jacque J.M., Triques K., Stevenson M. 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, (418); 435-438.
- Jacque J.M., Triques K., Stevenson M. 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, (418); 435–438.
- Ji J., Wernli M., Klimkait T., Erb P. 2003. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett*, (552); 247–252.
- Jonckheere H., Anne J., and De Clercq E. 2000. The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med. Res. Rev.*, (20); 129–154.
- Kapadia S.B., Brideau-Andersen A., Chisari F.V. 2003. Interference of Hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, (101); 12753-12758.
- Kaplan A.H. and Swanstrom R. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gag proteins are processed in two cellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (88); 4528–4532.
- Katzman M. and Katz R.A. 1999. Substrate recognition by retroviral integrases. *Adv. Virus Res.*, (52); 371–395.
- Kawasaki H., Taira K. 2003. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res*, (31); 700–707.
- Ketting R.F., Fischer S.E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J., Plasterk R.H. 2001a. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.*, (15); 2654-2659.
- Kim D.H., Longo M., Han Y., Lundberg P., Cantin E., Rossi J.J. 2004. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nature Biotechnol*, (22); 321–325.

- Kim V.N., Mitrophanous K., Kingsman S.M., and Kingsman, A.J. 1998. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*, (72), 811–816.
- Knight S.W., Bass B.L. 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RnaseD. *Cell*, (99); 209-216.
- Krichevsky A.M., Kosik K.S. 2002. RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, (99); 11926–11929.
- Landthaler M., Yalcin A., Tuschl T. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*, (14); 2162-2167.
- Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.J., Ehsani A., Salvaterra P., Rossi J. 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, (20); 500-505.
- Li X., Quan Y., and Wainberg M.A. 1997. Controlling elements in replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, (43); 443–454.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. 2004. Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, (305), 1437–1441.
- Lund E. Guttinger S., Calado A., Dahlberg J.E., Kutay U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, (303); 95-98.
- Lund E., Guttinger S., Galado A., Dahlberg J.E., Kutay U. 2004. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, (303); 95-98.
- Mann R., Mulligan R.C., and Baltimore D. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, (33); 153–159.
- McCaffrey A.P., Meuse L., Pham T.T., Conklin D.S., Hannon G.J., Kay M.A. 2002 RNA interference in adult mice. *Nature*, (418); 38-39.

- McFarland T.J., Zhang Y., Appukkutan B., Stout J.T. 2004. Gene therapy for proliferative ocular diseases. *Expert Opin Biol Ther*, (4); 1053-1058.
- McManus M.T., Haines B.B., Dillon C.P., Whitehurst C.E., van Parijs L., Chen J., Sharp P.A. 2002. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T-lymphocytes. *J Immunol*, (169); 5754-5760.
- Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, (15); 185-197.
- Miyagishi M., Taira K. 2002. U6 promoter driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, (20); 497-500.
- Miyoshi H., Smith K.A., Mosier D.E., Verma I.M., and Torbett B.E. 1999. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science*, (283); 682-686.
- Montgomery M.K., Fire A. 1998. Double-stranded RNA as mediator in sequence specific genetic silencing and co-suppression. *Trends Genet.*, (14);255-258.
- Montgomery M.K., Xu S.Q., Fire A. 1998. RNA as a target of double stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (95);15502-15507.
- Mourrain P., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Jouette D., Lacombe A.M., Nikić S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo T.A., Vaucheret H. 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, (101); 533-542.
- Myers J.W., Jones J.T., Meyer T., Ferrell J.E., Jr .2003 . Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nature Biotechnol*, (21) ; 324-328.

- Naldini L. and Verma I.M. 1999. Lentiviral vectors, in *The Development of Gene Therapy* (Friedmann, T., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, (2); 279-289.
- Nicholson R.H., Nicholson A.W. 2002. Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome*, (13); 67-73.
- Novina C.D., Murray M.F., Dykxhoorn D.M., Beresford P.J., Riess J., Lee S.K., Collman R.G., Lieberman J., Shankar P., Sharp P.A. 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, (8); 681-686.
- Ohtsuka E., Tanaka S., Ikehara M. 1974. Studies on transfer ribonucleic acids and related compounds. IX. Ribooligonucleotide synthesis using a photosensitive o-nitrobenzyl protection at the 2'-hydroxyl group. *Nucleic Acids Res*, (1); 1351-1357.
- Paddison P.J. , Vogt P.K. 2008. *RNA Interference. Current Topics in Microbiology and Immunology* (320). Springer-Verlag ,1,2,Berlin Heiderberg.
- Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S. 2002b. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, (16); 948-958.
- Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S. 2002a. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, (16); 948-958.
- Paddison P.J., Hannon G.J. 2002. RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell*, (2); 17-23.

- Paddison P.J., Silva J.M., Conklin D.S., Schlabach M., Li M., Aruleba S., Balija V., O'Shaughnessy A., Gnoj L., Scobie K., Chang K., Westbrook T., Cleary M., Sachidanandam R., McCombie W.R., Elledge S.J., Hannon G.J. 2004. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, (428); 427-431.
- Pai S.I., Lin Y.Y., Macaes B., Meneshian A., Hung C.F., Wu T.C. 2006. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*, (13); 464-477.
- Parrish S., Fleenor J., Xu S., Mello C., Fire A. 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell*, (6);1077-1078.
- Paul C.P., Good P.D., Winer I., Engelke D.R. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*, (20); 505-508.
- Paule M.R., White R.J. 2000. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, (28); 1283–1298.
- Pereira L.A., Bentley K., Peeters A., Churchill M.J., and Deacon N.J. 2000. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res.*, (28); 663–668.
- Pillai R.S., Artus C.G., Filipowics W. 2004. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna*, (10); 1518-1525.
- Pitsch S., Weiss P.A., Xu X.L., Ackermann D, Honegger T. 1999. Fast and reliable automated synthesis of RNA and partially 2'-O-protected precursors ('caged RNA') based on two novel, orthogonal 2'-O-protecting groups. *Helv Chim Acta*, (82); 1753–1761.
- Provost P., Dishart D., Doucet J., Friendewey D., Samuelsson B., Radmark O. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBOJ*, (21); 5864–5874.

- Qiao L., Lissemore J.L., Shu P., Smardon A, Gelber M.B., Maine E.M. 1995. Enhancers of *glp-1*, a gene required for cell-signalling in *Caenorhabditis elegans*, define a set of genes required for germline development. *Genetics*, (141); 551-569.
- Qin X.F., An D.S., Chen I.S., Baltimore D. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA*, (100); 183-188.
- Randall G., Grakoui A., Rice C.M. 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, (100); 235-240.
- Raoul C., Barker S.D., Aebischer P. 2006. Viral-based modelin and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther*, (13); 487-495.
- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* , (3);326–330.
- Rossi J.J. 2006. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques*, (40); 25-29.
- Rubinson D.A., Dillon C.P., Kwiatkowski A.V., Sievers C., Yang L., Kopinja J., Zhang M., McManus M.T., Gertler F.B., Scott M.L., Van Parijs L. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, (33); 401-406.
- Scaringe S.A. 2001. RNA oligonucleotide synthesis via 5'-silyl-2'-orthoester chemistry. *Methods*, (23); 206–217.
- Scaringe S.A., Wincott F.E., Caruthers M.H. 1998. Novel RNA synthesis method using 5'-O-silyl-2'-O-orthoester protecting groups. *J Am Chem Soc*, (120); 11820–11821.
- Schepers, U. 2005. *RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in C. elegans, Drosophila and Mammals*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA,1, Weinheim.

- Schwartz M.E., Breaker R.R., Asteriadis G.T., Gough G.R. 1995. A universal adapter for chemical synthesis of DNA or RNA on any single type of solid support. *Tetrahedron Lett*, (36); 27–30.
- Shin K.J., Wall E.A., Zavzavadjian J.R., Santat L.A., Liu J., Hwang J.I., Rebres R., Roach T., Seaman W., Simon M.I., Fraser I.D. 2006. A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, (103); 13579-13764.
- Siolas D., Lerner C., Buchard J., Ge W., Linsley P.S., Paddison P.J., Hannon G.J., Cleary M.A. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol*, (23); 227-231.
- Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H., Williams B.R. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nature Cell Biol*, (5); 834–839.
- Song E., Lee S.K., Wang J., Ince N., Ouyang N., Min J., Chen J., Shankar P., Lieberman J. 2003a. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, (9); 347-351.
- Song J.J., Liu J., Tolia N.H., Sneiderman J., Smith S.K., Martensen R.A., Hannon G.J., Joshua-Tor L. 2003b. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, (10); 1026- 1032.
- Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, (305); 1434-1437.
- Song, J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implication for RISC slicer activity. *Science*, (305); 1434–7.
- Sontheimer E.J., Carthew R.W. 2005. Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, (122); 9-12.
- Stegmeier F., Hu G., Rickles R.J., Hannon G.J., Elledge S.J. 2005. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (102); 13212- 13217.

- Sui G., Soohoo C., Affar el B., Gay F., Shi Y., Forrester W.C., Shi Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (99); 5515-5520.
- Svoboda P., Sten P., Hayashi H., Scultz R.M. 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development*, (127); 4147-4156.
- Tabara H., Grishok A., Mello C.C. 1998. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, (282);430-431.
- Tabara H., Sarkissian M., Kelly W.G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C.C. 1999. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, (99); 123-132.
- The RNAi Web , 2004-2008 http://www.rnaiweb.com/RNAi/What_is_RNAi/index.html
- Tiscornia G., Singer O., Ikawa I.M. 2003. A general method for gene knock down in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, (100); 1844- 1848.
- Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J., Parker R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, (20); 515-524.
- Vallee, H. and Carré, H. 1904 Nature infectieuse de l'anémie de cheval. *C. R. Acad. Sci*, (139); 331–333.
- Vigna E. and Naldini L. 2000. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.*, (2); 308–316.
- Wianny F., Zernicka-Goetz M. 2000. Specific interference with gene function by double stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, (2); 70-75.
- Woods N.B., Fahlman C., Mikkola H. 2000. Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood*, (96); 3725–3733.

- Wu H., Xu H., Miraglia L.J., Crooke S.T. 2000. Human Rnase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J. Biol Chem*, (275); 36957-36965.
- Wyatt R. and Sodroski J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, (280); 1884–1888.
- Xia X.G., Zhou H., Ding H., Affar el B., Shi Y., Xu Z. 2003. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res*, (31); 100.
- Xu K., Ma H., McCown T.J., Verma I.M., and Kafri T. 2001. Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, (3); 97–104.
- Yang D., Buchholz F., Huang Z., Goga A., Chen C.Y., Brodsky F.M., Bishop J.M. (2002a) Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (99); 9942–9947.
- Yang S., Tutton S., Pierce E., Yoon K. 2001. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, (21); 7807-7816.
- Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, (17); 3011-3016.
- Yu J.Y., DeRuiter S.L., Turner D.L. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, (99); 6047- 6052.
- Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. 2000. RNAi: Double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, (101); 25-33.
- Zeng Y., Cullen B.R. 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rn.a.*, (8); 855-860.
- Zeng Y., Wagner E.J., Cullen B.R. 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, (9); 1327-1333.

Zeng Y., Cullen B.R. 2003. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *Rn. A.*,(9); 112-123.

Zhang H., Kolb F.A, Brondani V, Billy E., Filipowicz W. 2002 Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*, (21); 5875–5885.

EK

Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Sıvı Besiyeri

Tripton	4 gr
Maya ekstraktı	2 gr
NaCl	4 gr
Antibiyotik	200 µl (250 mg/ml)
dH ₂ O	400 ml

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

Luria Bertani (LB) Agar Katı besiyeri

Tripton	4 gr
Maya ekstraktı	2 gr
NaCl	4 gr
BactoAgar	6 gr
dH ₂ 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.

Hücre kültürü besiyeri

DMEM	500 ml
Fetal Bovin Serum	50 ml
Penisilin/Streptomisin	5 ml
L-Glutamin	5 ml

Solüsyonlar

Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Solüsyonlar ve İçerikleri

Agaroz Jel (%1)	Agaroz Jel (%1,5)	TBE 5X	
Agaroz 0,4 g	Agaroz 0,6 gr	Tris-Base	54 gr
TBE 1x 40 ml	TBE1x 40 ml	Borik Asit	27,5 gr
EtBr ₂ 1,2 µl	EtBr ₂ 1,2 µl	0,5M EDTA(pH 8.0)	20 ml
		ddH ₂ O	980 ml

Alkalin Lizis Solüsyonları ve İçerikleri

Solüsyon I

ddH ₂ O	90,5 ml
1M TRIS pH 8.0	2,5 ml
0,5 M EDTA pH 8.0	2,0 ml
1M Glukoz	5,0 ml
Toplam	100,0 ml

Solüsyon II

5 M Potasyum Asetat	60,0 ml
Glasiyel Asetik Asit	11,5 ml
ddH ₂ O	28,5 ml
Toplam	100,0 ml

Solüsyon III (Taze hazırlanacak)

%10 SDS	1 ml
2M NaOH	1 ml
ddH ₂ O	8 ml
Toplam	10 ml

Fenol-Kloroform

Fenol	100 g
Kloroform	96 ml
İzoamil alkol	4 ml
TE tampon	20 ml (1 M Tris-HCL pH 7,5 stoktan 10 mM, 0,5 M EDTA pH 8,0 stoktan 1 mM)

Karışım hazırlanır ve iyice karışması sağlandıktan sonra 10 dk karanlıkta bekletilir. Daha sonra Kahverengi cam şişelere paylaştırılarak +4 °C' de saklanır.

Kimyasallar ve Reaktifler

10x PCR tamponu (DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit ,F-551S)

Agaroz (VIVANTIS, AG6330)

Ampisilin (Ampisina Flakon, Mustafa Nevzat İlaç, 8699541270106)

Bakto-Agar (Biolab, BAA10500)

Borik Asit (LABKİM, 111000)

dNTP (Fermentas, 37)

DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco, USA, 12800)

DNA Moleküler Belirteçleri (Doç. Dr Fikret Şahin)

DNA Pürifikasyon Kiti (Bağlayıcı Solüsyon, Yıkama Solüsyon, Elüsyon Solüsyon, DNA spin kolon ve kollektör tüp) (Mo. Bio. Laboratories, Inc. UltraClean™ GelSpin™ DNA Extraction Kit, 12400-50)

EcoRI Restriksiyon Endonükleaz (SibEnzyme™ , E057)

EcoRV Restriksiyon Endonükleaz (SibEnzyme™ ,E059)

EDTA (MERCK, 70156890)

Etanol (MERCK, 1.00983)

Etidyum Bromür (APPLICHEM, 1239458)

Fenol (MERCK A, 550101)

Fermentas FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas, #EF0651)

Fetal Bovin Serum (Hyclone ,1115-L)

GIBCO™ L-Glutamine (Invitrogen™ Life Technologies, 21051024)

HindIII Restriksiyon Endonükleaz (SibEnzyme™ , E073)
Izoamil Alkol (MERCK, K33548279 438)
İzopropanol (MERCK, M109634.2500)
Kanamisin (Kanovet, VET AŞ)
Kloroform (DOP, 001)
Magnezyum Klorür (DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit ,F-551S)
Maya ekstraktı (Lab M, Q270481080)
Oligonükleotidler ve Primerler (SBI)
Revers Transkriptaz (Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit , #K1622)
RNaz (Ambion, AM2269)
SmaI Restriksiyon Endonükleaz (SibEnzyme™ , E178)
Sodyum Klorür (MERCK K,28713500104)
Streptomisin/Penisilin (Gibco, 15070)
T4 DNA Ligaz (Fermentas Life Sciences T4 DNA Ligase, #EL0016)
Taq DNA Polimeraz (DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit , F-551S)
Transfeksiyon Reaktifi (Lipofectamine™ 2000 Reagent Invitrogen,11668-027)
Tripsin
Trypton (Pronadisa Micro Lab Bio, 1612.00)
TRIZOL® Reagent (Invitrogen™ Life Technologies ,15596-026)
XbaI Restriksiyon Endonükleaz (Jena Biosciences™, EN-143S)

Cihazlar

Mikrodalga fırın (Vestel MD-17, Türkiye)
Mikro santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5417C, Almanya)
Santrifüj (Herolab, Almanya)
Isıl Döngü Cihazı (Biorad MJ Mini Personal Thermal Cyclers, ABD)
İnkubatör (Heraeus Function Line, Almanya)
Çalkalamalı İnkubatör (Shel Lab Shaking Incubator, ABD)
Kuru ısıtıcı blok (HVD, Almanya)
Vorteks (HVD Biovortex, Almanya)

Dijital Fotoğraf Makinası (Canon Powershot G5, Kanada)

Elektroforez tankı (Sunrise, ABD)

Güç kaynağı (Biorad, ABD)

UV görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat TFX-20 M, Fransa)

CO₂ Hücre Kültürü İnkübatörü (Sanyo, Japonya)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Semih Zafer YILMAZ
Doğum Yeri :Samsun
Doğum tarihi :30.08.1983
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili :İngilizce
Eğitim Durumu
Lise :İstanbul Beşiktaş Lisesi (1998-1999)
:Ardahan Lisesi (1999-2001)
Lisans :Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2003-2007)