

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAF7 EKSPRESYONUNUN siRNA İLE
BASKILANMASI SONRASINDA APOPTOTİK
SÜREÇTEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DİLEK GÖKTÜRK

İZMİR 2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAF7 EKSPRESYONUNUN siRNA İLE
BASKILANMASI SONRASINDA APOPTOTİK
SÜREÇTEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DİLEK GÖKTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr ZEYNEP SERCAN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma projeleri Şube Müdürlüğü 2005.KB.SAG.015
No.lu ve TÜBİTAK 106T184 No.'lu projeler ile desteklenmiştir

T.C.
DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

**STUDY OF THE APOPTOTIC PROCESS AND
THE EFFECTS INDUCED BY TAF7 GENE
EXPRESSION SILENCING USING siRNA**

MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS DEPARTMENT
MASTER THESIS

DİLEK GÖKTÜRK

Coordinator of Thesis: ZEYNEP SERCAN MD. PhD.

“TAF7 Ekspresyonunun siRNA ile Baskılanması Sonrasında Apoptotik Süreçteki Değişikliklerin Araştırılması” isimli bu tez 26.07.2007 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Zeynep SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral SAKIZLI
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Neşe ATABEY
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Kemal KORKMAZ
Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Esra ERDAL
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İçindekiler	i
Tablo Listesi	v
Şekil Listesi	vii
Resim listesi	viii
Kısaltmalar	ix
Teşekkür	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 HIV Enfeksiyonu	7
2.2 HIV Virüs Yapısı ve Genleri	9
2.3 HIV – Tat Geni ve İşlevleri	12
2.4. HIV – Tat Geni ve Apoptoz	15
2.5. HIV – Tat Geninin Ökaryotik Homoloğu Olarak TAF7	16
2.6. Transkripsiyon	19
2.7. RNA Polimerazlar	19
2.8. Prokaryotlarda Transkripsiyon Düzenegi	21
2.9. Ökaryotlarda Transkripsiyon Başlama (İnisiyasyon)	
Kompleksinin Oluşturulması	25
2.10 TFIIID' nin Yapısı	30
2.11.TAFII7 ve İşlevleri	31
2.12. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz)	32
2.12.1 Kaspazlar	33
2.12.2 Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu	35
2.12.3 Hücre Yaşam Sinyalleri	36
2.13. RNA Interferans Tekniği	37
2.13.1 RNAi Nedir?	38
2.13.2 RNAi'nin Tarihsel Gelişimi	38
2.13.3 siRNA Oluşturma Yöntemleri	40

2.13.4 RNAi mekanizması	42
2.13.5 RNAi Mekanizması Oyuncuları	43
2.13.6 RNAi'nin Memeli Hücrelerine Uyarlanması	44
2.13.7.Gen Sessizlendirme Belirleme Yöntemleri	46
3. GEREÇLER YÖNTEM	47
3.1.HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	49
3.1.1 Namalwa Hücre Hattı	49
3.1.2.Kelly Hücre Hattı	50
3.1.3. Hela Hücre Hattı	50
3.2.TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ	50
3.3. pEGFP – TAF7 VEKTÖRÜNÜN HAZIRLANMASI	51
3.4. pEGFP - TAF7 VEKTÖRÜNÜN HÜCRE HATLARINA TRANSFEKSİYONU	53
3.5.RNA İNTERFERANS TEKNİĞİ İLE HÜCRE HATLARINDA TAF7 EKSPRESYONUNUN AZALTILMASI	55
3.5.1. siRNA Dizilerinin Belirlenmesi	55
3.5.2. siRNA Transfeksiyonu	55
3.5.3.siGLO RISC İçermeyen siRNA Transfeksiyonu	60
3.6. HÜCRE HATLARINDA siRNA ile BASKILANMIŞ TAF7 EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ	63
3.6.1 Ekspresyonun RNA Düzeyinde Belirlenmesi	63
3.6.1.2.cDNA Eldesi	66
3.6.1.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	67
3.6.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	69
3.6.2. Hücre Hatlarında TAF7 Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Belirlenmesi	69
3.6.2.1. Hücre Lizatı Hazırlanması	70
3.6.2.2. Protein Konsantrasyonu Ölçülmesi	72
3.6.2.3. SDS PAGE Elektroforezi	73
3.6.2.4. Membrana “Yarı Kuru” Yöntem İle Transfer	74
3.6.2.5. Western Blot	75
3.6.2.6. Deteksiyon	76
3.7. HÜCRE HATLARINDA TAF7 GENİNİN SESSİZLENDİRİLMESİNİN APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ	78
3.7.1. CASPASE GLO 3/7 ASSAY İle Apoptotik Davranış Ölçümü	79
3.7.2 CASPASE GLO 8 ve 9 Assay ile Apoptotik Davranış Ölçümü	80

3.7.3 Fluorometric Caspase 3 Assay Kit İle Apoptotik Davranış Ölçümü	81
3.8.İMMÜN PRESİPİTASYON	84
3.9. TUBULIN DENEYİ	86
4.0. BULGULAR	89
4.1 APOPTOTİK AJANLARIN OPTİMUM DOZ VE SÜRELERİ	89
4.1.1.ETOPOSİT OPTİMİZASYONU	89
4.1.2.MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhidrazone)) OPTİMİZASYONU	93
4.1.3. RADYASYON OPTİMİZASYONU	95
4.1.4. MGBG ve Etoposit'in Kaspaz 8 veya 9 Yolaklarından Hangisi Üzerinden etki ettiğinin belirlenmesi	97
4.2. siRNA OPTİMİZASYONU DENEY SONUÇLARI	100
4.2.1. mRNA DÜZEYİNDE LIPID/ siRNA ORANI OPTİMİZASYONU SONUÇLARI	100
4.2.2 siGLO TRANSFEKSİYON KONTROLÜ	102
4.2.3 mRNA DÜZEYİNDE siRNA İLE TAF7 EKSPRESYONUNUN AZALTILDIĞININ GÖSTERİLMESİ	104
4.2.4 PROTEİN DÜZEYİNDE siRNA İLE TAF7 EKSPRESYONUNUN AZALTILDIĞININ GÖSTERİLMESİ	104
4.3. APOPTOZ DENEYLERİ	107
4.3.1. TAF7 Ekspresyonunun Baskılanmasının Etoposit ile Tetiklenmiş Apoptoz Süreci Üzerindeki Etkisi	107
4.3.2. TAF7 Ekspresyonunun Baskılanmasının MGBG (methylglyoxal bis – guanylhidrazone) ile Uyarılan Apoptoz Üzerindeki Etkisi	109
4.3.3. TAF7 Ekspresyonunun Baskılanmasının Radyasyonla Tetiklenen Apoptoz Üzerindeki Etkisi	111
4.3.4. TAF7 Ekspresyonunun pEGFP TAF7 vektörü ile Arttırılmasının Apoptot Etkisi	113
4.4. TAF7 OVER-EKSPRESYONUNUN MİKROTÜBÜL DİNAMİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ	115
4.5. İMMÜN PRESİPİTASYON (IP) DENEYLERİ	118
4.5.1. TAF7' nin BIM ve LIZ 1 ile İLİŞKİSİNİN İMMÜN PRESİPİTASYON İLE BELİRLENMESİ	119
4.5.2. TAF7' nin CIITA ile İLİŞKİSİNİN İMMÜN PRESİPİTASYON	

İLE BELİRLENMESİ	122
5. TARTIŞMA	124
6. KAYNAKÇA	137
EK1	141

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. siRNA oluşturma yöntemlerinin birbirleriyle karşılaştırılması	42
Tablo 2. Transfeksiyon ortamı hazırlamak için gerekli hacimler	60
Tablo 3. cDNA sentezi reaksiyon içeriği	67
Tablo 4. TAF7 ekspresyon kontrolü için kullanılan PCR primerleri	68
Tablo 5. β Actin ekspresyon kontrolü için kullanılan PCR primerleri	68
Tablo 6: Gerçek zamanlı PCR için reaksiyon içeriği	69
Tablo 7: Apoptoz optimizasyonu koşulları	79
Tablo 8. Caspase 8 ve 9 deneyi grupları	80
Tablo 9: AMC kalibrasyon grafiği hazırlanması	82
Tablo 10: 96 gözlü plate metodu ile apoptotik davranışın belirlenmesi	84
Tablo 11 Tubulin boyama deney grupları	87
Tablo 12. Hela hücrelerinde etoposid doz ve süresi optimizasyonu	90
Tablo 13. Kelly hücrelerinde etoposid doz ve süresi optimizasyonu	91
Tablo 14. Namalwa hücrelerinde etoposid doz ve süresi optimizasyonu	92
Tablo 15. Hela hücrelerinde MGBG doz ve süresi optimizasyonu	93
Tablo 16. Kelly hücrelerinde MGBG doz ve süresi optimizasyonu	94
Tablo 17. Namalwa hücrelerinde MGBG doz ve süresi optimizasyonu	94
Tablo 18. Hela Hücrelerinde Radyasyon doz ve süresi optimizasyonu	95
Tablo 19. Kelly Hücrelerinde Radyasyon doz ve süresi optimizasyonu	96
Tablo 20. Namalwa Hücrelerinde Radyasyon doz ve süresi optimizasyonu	96
Tablo 21. Kaspaz 8/9 deneyi grupları	98
Tablo 22. Kelly Hücrelerinde MGBG ve Etopositin Kaspaz 8 Yolağında Etkisi	99
Tablo 23. Kelly Hücrelerinde MGBG ve Etopositin Kaspaz 9 Yolağında Etkisi	99
Tablo 24. Lipid dilüsyonlarının hazırlanması	100
Tablo 25. mRNA Düzeyinde Transfeksiyon optimizasyonu planı	101
Tablo 26. mRNA düzeyinde siRNA/ lipid oranı ve süre optimizasyon sonuçları	101
Tablo 27. siRNA ile TAF7 ekspresyonunun baskılanması gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucu	104
Tablo 28. TAF7 Baskılanmasının etoposid nedenli apoptoz üzerindeki etkisi deneyi grupları	107
Tablo 29. Hela Hücrelerinde TAF7 sessizlendirilmesinin	

etoposit nedenli apoptoz üzerindeki etkisi	108
Tablo 30. Kelly Hücrelerinde TAF7 sessizlendirilmesinin etoposit nedenli apoptoz üzerindeki etkisi	108
Tablo 31. TAF7 Baskılanmasının MGBG Nedenli Apoptoz Üzerindeki Etkisi deneyi grupları	109
Tablo 32. Hela hücrelerinde MGBG nedenli apoptotik davranışta TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi	110
Tablo 33. Kelly hücrelerinde MGBG nedenli apoptotik davranışta TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi	110
Tablo 34. TAF7 ekspresyonu baskılanmasının radyasyon nedenli apoptoz üzerindeki etkisi deneyi grupları	111
Tablo 35. Hela hücrelerinde radyasyon ile tetiklenen apoptozda TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi	112
Tablo 36. Kelly hücrelerinde radyasyon ile tetiklenen apoptozda TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi	112
Tablo 37. TAF7 ekspresyonunun pEGFP TAF7 vektörü ile arttırılmasının apoptotik etkisi deney grupları	113
Tablo 38. Hela Hücrelerinde TAF7' nin yüksek düzeyde ekspresyonunun apoptotik etkisi	114
Tablo 39. Kelly Hücrelerinde TAF7' nin yüksek düzeyde ekspresyonunun apoptotik etkisi	114
Tablo 40. TAF7 over-ekspresyonunun mikrotübül dinamikleri üzerindeki etkisini inceleme amacıyla oluşturulan deney grupları	115

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: HIV yapısının şematik gösterimi	10
Şekil 2: HIV genomunun şematik yapısı	11
Şekil 3: Tat proteininin transaktivasyon sırasında etkileştiği ökaryotik proteinler	14
Şekil 4: Transkripsiyon başlangıcı (inisiyasyonu) sırasında oluşan olayların genelleştirilmiş şeması.	22
Şekil 5: <i>E. coli</i> promotor dizileri	23
Şekil 6: <i>Escherichia coli</i> ’ de transkripsiyon inisiyasyonu.	24
Şekil 7: Ökaryotik promotor yapıları	26
Şekil 8: RNA polimeraz II’ den izole edilen transkripsiyon inisiyasyon kompleksine bağlanma basamakları	29
Şekil 9: siRNA eksprese eden vektörler	41
Şekil 10: GFP ekspresyonunun RNAi ile baskılanması	44
Şekil 11. Hücre içerisinde RNA interferans mekanizması	45

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. Dharmacon' un örnek siGLO transfeksiyonu floresan mikroskopi görüntüsü	102
Resim 2. Kontrol ve siGLO siRNA Transfeksiyon sonrası floresan mikroskopi görüntüleri	103
Resim 3. TAF7 siRNA Transfeksiyonu Yapılan Kelly Hücre Hattında TAF7 proteininin western blot ile gösterilmesi	105
Resim 4. TAF7 siRNA Transfeksiyonu Yapılan Hela Hücre Hattında TAF7 proteininin western blot ile gösterilmesi	106
Resim 5: Normal ve diğer kontrol Kelly hücrelerinin α -tubulin boyama floresan mikroskobisi görüntüleri	116
Resim 6. pEGFP TAF7 transfekte edilen Kelly hücrelerinin α -tubulin boyama floresan mikroskobisi görüntüleri	117
Resim 7. TAF7 siRNA ve taxol uygulanan Kelly hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüsü	118
Resim 8. LIS1 – TAF7 bağlanması immün presipitasyon deneyleri	119
Resim 9. TAF 7- LIS1 bağlanması immün presipitasyon deneyleri	120
Resim 10. TAF 7 antikorları ile immün presipitasyon deneylerinin TAF7 preimmün serum ve negatif kontrol olarak c-Met antikorunu kullanılarak tekrarlanması	121
Resim 11. Namalwa hücrelerinde CIITA ile TAF7 ilişkisini gösteren İmmün presipitasyon görüntüsü	123

KISALTMALAR

Rpm : Rotation per minute (Bir dakikadaki devir sayısı)

Dak. : Dakika

H: Hour (saat)

DNA: Deoksiribo nükleik asit

RNA: Ribo nükleik asit

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)

AT: Asetil transferaz

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)

BCA: Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)

PVDF: Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene fluoride)

NaCl: Sodyum Klorid (Sodium Chloride)

PMSF: Fenil-metil-sülfonil (Phenyl-methyl-sulphonyl)

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

M-MuLV: Moloney Murine Leukemia Virus

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)

FBS: Föetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Ortamı (Dulbecco's Modified Eagles Medium)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

nm: Nanometre

MGBG: methylglyoxal bis-(guanyldrazone)

siRNA: small interfering RNA

CIITA: class II transactivator

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yaptığı her türlü katkı ve yardımlarından dolayı başta danışmanım Yrd. Doç Dr Zeynep SERCAN olmak üzere, TAF7 antikoru hediye eden Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü Deneysel İmmunoloji Dalından Dinah SINGER' e ve Anne Gegonne'ya, Hela hücre hattını hediye eden Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Kemal KORKMAZ' , Namalwa hücre hattını hediye eden Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr.İhsan GÜRSEL'e, Kelly hücre hattını hediye eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'e ve doktora öğrencisi Nevim AYGÜN'e, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneylerindeki yardımlarından dolayı Yrd.Doç.Dr.H. Ogün SERCAN'a, bakteriyel transformasyon deneylerimizde malzememiz bittiğinde imdadımıza yetişen Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yard.Doç.Dr. Mehmet Ali ÖKTEM'e, radyasyon deneyleri için yardımlarını esirgemeyen Radyasyon Onkolojisi Anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr.İlknur GÖRKEM'e ve Uzm.Zafer KARAGÜLER' e, pEGFP TAF7 vektörü rehberliğinde hazırlanan Yrd.Doç.Dr.Esra ERDAL'a, pEGFP TAF7 vektörünü hazırlayıp hediye eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı yüksek lisans öğrencisi Melek PEHLİVAN'a, teknik desteklerinden dolayı ARLAB'a ve Dr. Memduh BÜLBÜL'e, desteklerinden dolayı doktora öğrencileri Murat Çokaklı ve İmge Kunter'e ve manevi desteklerini benden esirgemeyen canım annem ve canım babama teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Dilek GÖKTÜRK 16/07/2007

ÖZET

Taf7 Ekspresyonunun siRNA ile Baskılanması Sonrasında Apoptotik Süreçteki Değişikliklerin Araştırılması

Dilek GÖKTÜRK, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 35340, Balçova-İzmir, Türkiye.

HIV enfeksiyonunun biyoloji ve immunopatogenezini anlamak, terapötik stratejilerin ve profilaktik aşuların geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. HIV genomundaki 9 genden biri olan Tat, gen ekspresyonu için gerekli olup işlevlerini üç başlık altında toplayabiliriz: 1) Proviral genlerin transkripsiyonel transaktivasyonu, inisiyasyon ve elongasyon süreçlerini desteklemek 2) Kimi konak hücre genlerinin ekspresyonlarını özellikle pre-inisiyasyon kompleks yapısını bozarak transkripsiyon düzeyinde baskılamak 3) Konak hücrelerde apoptozu tetiklemek.

Genel transkripsiyon faktörü TFIID'nin yapısında yer alan TAF7 geninin HIV Tat' ın ökaryotik işlevsel homoloğu olduğu ileri sürülmüştür. TAF7, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Ancak HIV Tat gibi programlanmış hücre ölümünde rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

Apoptoz yollarının tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Fakat apoptoz sürecinin parçası olan genel transkripsiyonun baskılanma mekanizması bilinmemektedir. Hipotezimiz, bir apoptoz bulgusu olan transkripsiyon durdurulmasının TAF7 üzerinden gerçekleştiği yönündedir. Bunu test etmek amacıyla radyasyon, etoposit ve MGBG apoptotik uyarılarını alan hücre kültürlerinde siRNA oligonükleotidleri kullanılarak TAF7'nin ekspresyonunu baskılanıp, apoptotik cevapları ölçüldü. TAF7 ekspresyonu baskılanan HeLa ve Kelly hücre hatlarında radyasyon, etoposit ve MGBG uygulamaları karşısında apoptotik davranışın kontrol grubu hücrelerine göre 4-6 kat azaldığı gözlemlendi. TAF7 over-ekspresyonu yaptığımız çalışmalarda, hücrelerde HIV Tat'a benzer

şeklilde mikrotübül stabilizasyonu yoluyla apoptozu tetiklediğini gösterdik. Ayrıca viral ekspresyonlarda interferon uyarımına cevaben protein düzeyi artan CTIIA'in, HIV Tat proteini ile olduğu gibi TAF7 ile de ilişkili olduğunu immün presipitasyon deneyleri ile gösterdik.

Sonuç olarak TAF7'nin apoptotik süreçte rol aldığı ve apoptozun genel transkripsiyon mekanizması ile ilişkili olduğu ilk kez gösterilmiştir. TAF7'nin, HIV Tat proteini ile olan işlevsel benzerliklerinin farklı alanlarda gösterilmesi HIV araştırmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler:

TAF7, HIV TAT, transkripsiyon inisiyasyonu, RNA interferans tekniği.

ABSTRACT

Study of The Apoptotic Process and the Effects Induced by Taf7 Gene Expression Silencing Using siRNA :

Dilek GÖKTÜRK, Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, 35340, Balçova-Izmir, Turkey.

Understanding the immunopathogenesis and biology of HIV infection is of great importance to introduce new therapeutic strategies and prophylactic vaccines. Tat is one of the nine genes encoded in the HIV genome and its functions can be grouped under 3 topics: 1) The transcriptional transactivation of the provirus 2) Inhibition of the host genes at the transcriptional level mainly 3) Inducing apoptosis in host cells.

It has been proposed that TAF7 – a component of the general transcription factor TFIID - could be a functional homologue of HIV Tat. TAF7 has been shown to support elongation and to inhibit transcription by mechanisms very similar to HIV Tat. But Tat there are no studies reporting a role for TAF7 in apoptosis.

The identification of the apoptotic pathways is very important to health sciences. The mechanism of the general transcriptional blockage observed during apoptosis remains unknown. Previous reports have suggested that TAF7 acts as a transcriptional checkpoint regulator. In accordance with this model we hypothesize that the transcriptional blockage is an integral part of the apoptotic process and is induced via TAF7. To test this hypothesis TAF7 expression was inhibited by siRNA in cell lines induced with radiation, MGBG and etoposide. A 4-6 fold reduction in apoptotic death was observed in the TAF7 siRNA group when compared to controls. On contrast TAF7 induced apoptosis in cells when over-expressed by stabilizing microtubule polymerization; a mechanism very similar to HIV Tat.

This is the first study reporting a role for TAF7 and the transcriptional machinery in apoptosis.

Key Words:

TAF7, HIV TAT, transcription initiation, RNA interference.

1.GİRİŞ ve AMAÇ:

Günümüzde pek çok viral genin ökaryotik homologları bilinmektedir. HIV Tat için ise DNA dizi düzeyinde bir ökaryotik homolog gen bulunamamıştır. Ancak işlevsel bir homolog olarak TAF7 geni ileri sürülmüştür. Benzer özellikler gösterebilen, hem elongasyonda aynı faktörlerle etkileşerek rol oynayan hem de PIC'de bulunan proteinler ile Tat'a benzer şekilde ilişki kuran bilinen tek ökaryotik gen ürünü TAF7'dir (eski adıyla TAFII55).

Gen transkripsiyonu, büyük ölçüde kendilerine özgü sekans motiflerini tanıyan transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelere bağlanması, transkripsiyonda görev alan kompleksleri kendisine çekmesi ve aktive etmesi ile gerçekleşir. Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için öncelikle RNA polimeraz II'nin genel transkripsiyon faktörleri (GTF) ile bir kompleks oluşturarak promotöre bağlanması gerekmektedir. GTF'ler olan TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ve TFIIH bir araya gelerek promotör üzerinde bir karmaşık yapı oluşturur ve RNA polimeraz II'nin karboksil terminalini fosforilleyerek transkripsiyonun başlamasını sağlar. Promotöre ilk bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID'dir. Promotörün TATA kutusu bölgesine bağlanan TFIID, TBP'den (TATA binding protein) ve TAF'lerden (TBP associated faktörleri) oluşmaktadır. Pek çok farklı TAF'lerden biri de TAF7'dir. Yapılmış çalışmalar TAF7'in transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev alabileceğini ileri sürmektedir. Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, transkripsiyon üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermekte, elongasyonda mRNA uzamasını desteklemektedir. Özetle TAF7, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Ancak HIV Tat'ın aksine programlanmış hücre ölümünde bir rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), hücre dışarıdan yaşamına devam etmesi için gerekli sinyalleri alamadığında veya hücre hasarı olduğu zaman gerçekleşir. Apoptoz yollarının

aydınlatılması ve farklı patolojilerde apoptozun rolü konusunda sayısız araştırma yapılmış olmasına rağmen halen ölüme giden hücrede transkripsiyonun nasıl bloke edildiğine dair fazla bir veri bulunmamaktadır. Hipotezimiz, bir apoptoz bulgusu olan transkripsiyon blokajının TAF7 üzerinden gerçekleştiği (HIV Tat'ın kullandığı transkripsiyonel baskılama mekanizmalarını kullanarak) ve TAF7'nin yine HIV Tat proteini ile benzer şekilde mikrotübüller ile ilişkiye geçerek apoptozun geç evrelerinde rol oynadığı yönündedir. Bunu test etmek amacıyla farklı apoptotik uyarılar alan hücre kültürlerinde siRNA (small interfering RNA) kullanılarak TAF7'nin ekspresyonunun baskılanması ve apoptotik cevabın ölçülmesi planlanmıştır. Hipotezimize göre TAF7 yokluğunda transkripsiyon bloğu oluşmayacağından kullanılacak hücre hatlarında belli uyaranlarda apoptoza direnç gelişecektir. Yüksek düzeyde TAF7 ekspresyonunun (over-ekspresyon) olduğu durumlar da ise mikrotübül dinamikleri etkilenecek artmış apoptoz izlenecektir. Hipotezimizin doğrulanması halinde arştırmamız apoptotik yolları genel transkripsiyon mekanizması ve transkriptozoma bağlayan ilk çalışma olacaktır. Hemen tüm patolojilerde rol oynadığından apoptoz yollarının tanımlanması sağlık bilimleri için büyük önem taşımaktadır. Bu konuda dünyada son 20 yıl içinde büyük bir birikim sağlanmış ve farklı yolların elemanları tanımlanmıştır. Ancak apoptoz sürecinin bir parçası olan genel transkripsiyonun baskılanma mekanizması bilinmemektedir. Daha önceki yayınlarda TAF7'nin transkripsiyon başlangıcında bir kontrol noktasında görev aldığını öne süren model göz önünde tutulduğunda, apoptoz sürecinde transkripsiyon baskılanması için benzer bir kontrol noktasında rol alabileceği hipotezi tutarlılık kazanmaktadır. Ayrıca TAF7'nin, HIV Tat proteini ile olan işlevsel benzerliklerinin farklı alanlarda gösterilmesi, diğer bir ifadeyle HIV Tat proteininin bir “*ökaryotik işlevsel homoloğu*” olabilecek bir proteinin tanımlanması, HIV araştırmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1 HIV Enfeksiyonu:

İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1'in (human immunodeficiency virus type 1; HIV-1) 1983'de (1-3) ve HIV-2'in 1986'da (4) tanımlanmasından sonra bu iki virüs, edinsel immün yetmezlik sendromunun (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) başlıca iki etkeni olarak kabul edilmektedir. Dünyada AIDS'den öncelikle sorumlu olan etken HIV-1'dir. Bugün dünyada HIV ile enfekte birey sayısının çoğunluğu Asya, Afrika ve Güney Amerika'da olmak üzere 40 milyonu geçmektedir.

1995'de proteaz ve non-nükleotid revers transkriptaz inhibitörlerinin kullanıma girmesiyle uygulanan etkin anti-retroviral tedavi HIV enfeksiyonunun mortalite ve morbiditesinde çok önemli iyileşmeler sağlamıştır. Ancak tedavide sağlanan tüm ilerlemelere rağmen bir kere enfekte olan bireyden virüsün eradikasyonu halen imkânsızdır (5).

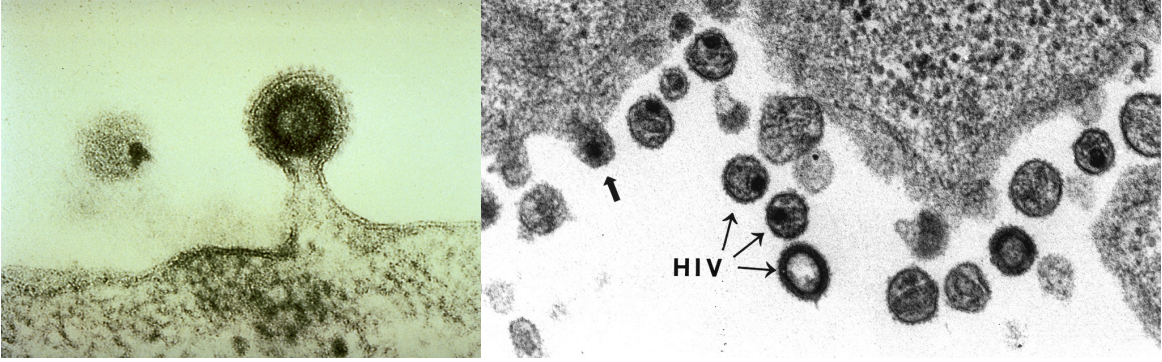
HIV/AIDS esas olarak cinsel yolla, kan ve kan ürünleriyle ve anneden bebeğe vertikal bulaş olmak üzere üç ana yolla bulaşır. Virüs vücuda alındıktan 1-6 hafta içerisinde ilk çoğalma döneminde akut enfeksiyona neden olur. Bu dönemde ateş, lenfadenopati, farenjit, ishal, bulantı ve kusma gibi özgül olmayan belirtiler izlenir. Bütün bu bulgular 2 – 4 hafta içerisinde tedavi gerektirmeden geçer. Akut enfeksiyon döneminden itibaren kişi bulaştırıcıdır (6). Virüsün vücuda girişini takiben, % 95 vakada 6-12 hafta içerisinde HIV'e karşı antikorlar gelişir. Bu dönem serokonversiyon dönemi olarak adlandırılmaktadır (6). Bu dönemden sonra enfekte kişiler belirti ve bulgu vermeyen (klinik açıdan latent) ancak bulaştırıcı olan "asemptomatik dönem"e girerler. Bu dönemde lenfatik dokularda virüs çoğalmaya devam etmekte ve CD4 hücre sayısı progresif olarak azalmaktadır (6). Erken semptomatik dönem hastalarda ilk kez doktora başvurmalarına neden olan belirtilerin başladığı dönemdir. Halsizlik, baş ağrısı, vücut ağırlığının %10'undan

fazla kilo kaybı, nedeni bulunamayan ateş, bir aydan daha uzun süren ve tedavi edilemeyen ishal, deride pullanmalarla seyreden bir hastalık olan seboreik dermatit, yaygın ve sik herpes virüs enfeksiyonları, ağızda mantar enfeksiyonları en sik karşılaşılan belirti ve bulgulardır (6). CD4 hücre sayımı ile beraber kandaki virüs miktarını gösteren viral yük tayininin yapılması ve tedavinin bu parametrelere göre planlanması gerekir. Geç semptomatik dönemde ise bağışıklık eksikliği iyice belirgin bir hale gelir, fırsatçı enfeksiyon veya kanserler ortaya çıkabilir.

HIV enfeksiyonunun immunopatogenezini anlamak terapötik stratejilerin, immunoterapilerin ve profilaktik aşıların geliştirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. Diğer tüm viral enfeksiyonlar gibi HIV enfeksiyonunun bireylerdeki seyri hem viral hem de konak faktörlerine bağlıdır. Primer enfeksiyon kaynağı aynı olsa dahi HIV ile enfekte bireylerde enfeksiyonu seyri çok büyük farklılıklar sergileyebilmektedir. Konak ve viral faktörlere bağlı olarak bireyde klinik düzeyde hızlı bir immun yetmezlik gelişebileceği gibi birey uzun dönem gelişim göstermeyen hasta grubunda (long-term non-progressors) da olabilir (5).

HIV virüsü hücre içine almaç bağımlı endositoz yoluyla girmektedir. Birincil almaç, immun sistemin T hücrelerinde bulunan CD4 hücre yüzey almaçtır. CD4 T hücrelerinin % 60'ının yüzeyinde ifade edilen 58 kD'luk monomerik bir glikoproteindir (5). CD4'ün HIV-1, HIV-2 ve SIV (simian immunodeficiency virus) için birincil almaç olduğu 1984 yılında karakterize edilmiştir (7). Ancak insandan türetilmemiş hücre hatlarında CD4 transfekte edilerek yapılan deneyler CD4'ün tek başına virüsün girişi için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar monositotrofik virüsler için CCR5; T-hücretropik virüsler için CXCR4 kemokin reseptörlerinin CD4'e ek olarak eş-almaç (koreseptör) olarak gerekliliğini ortaya koymuştur (8-11). Hücreye girişinden sonra HIV virüsü, revers transkriptaz enzimi ile RNA nükleid asidini DNA'ya çevirir. Viral DNA nükleusa geçerek integras enzimi sayesinde hücre DNA'sına entegre olur. Bu aşamada provirüs adını alır. Enfekte hücrenin transkripsiyon

düzenini kullanarak genomunu tekrar RNA'ya çeviren provirüs bu şekilde kor nükleik asidinin replikasyonunu ve hücrenin translyasyon düzeneklerini kullanarak yapısal proteinlerini oluşturur. Yapısal viral parçalar ve RNA nükleik asit yine hücresel mekanizmalar kullanılarak bir araya getirilir ve yeni oluşan virüsler tomurcuklanma yoluyla hücreden ayrılarak başka hücreleri enfekte eder (Resim1).

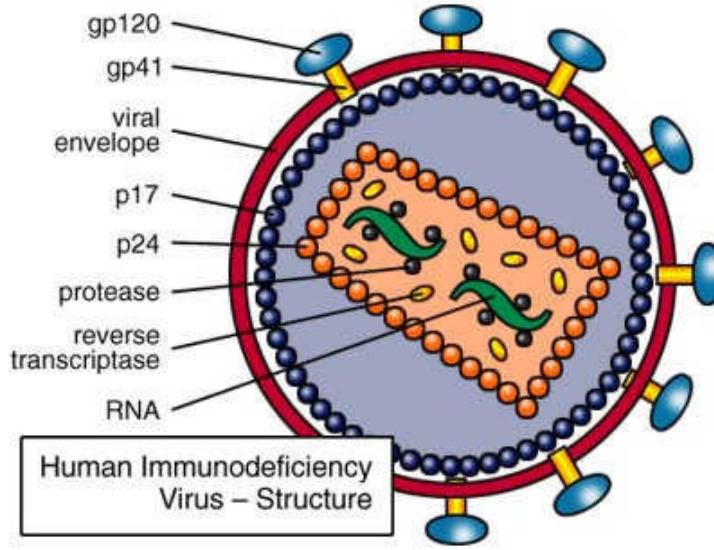


Resim 1: Hücre kültürlerinde HIV'in hücre plazma membranından tomurcuklanmasını gösteren elektron mikroskopi fotoğrafı (<http://it.stlawu.edu/~tbudd/virus.html> adresinden alınmıştır)

2.2 HIV Virüs Yapısı ve Genleri:

HIV-1 lentivirus ailesine ait bir retrovirüstür. Viral partiküller 100nm çapında olup bir lipoprotein zar ile çevrilidir. Nükleik asit olarak iki adet pozitif sense tek iplikli RNA molekülü içerir. Bu iki adet RNA molekülü birbirlerine tutunarak genomik RNA dimerini oluştururlar. RNA dimeri nükleokapsid (NC) proteini (p9/6) ile ilişki halindedir. NC proteini ve RNA nükleik asidinin oluşturduğu ribonükleoprotein kapsid proteininden (p24) oluşmuş bir kapsid yapısı ile çevrilidir. Kapsid ortamı ribonükleoproteinin yanı sıra integraz ve revers transkriptaz gibi başka viral proteinleri de içermektedir. Viral proteinlerin yanı sıra konak hücreden alınmış, revers transkripsiyon için primer görevi gören tRNA_{lys3} gibi makromolekülleri de barındırır. Kapsidin

kendisi de matriks proteininden (MA – p17) oluşmuş bir tabaka ile çevrilidir. En dışta ise konak hücre membranından tomurcuklanma sırasında edinilmiş olan viral zarf bulunur. Viral zarf köken aldığı hücre zarının lipid ve protein kompozisyonunu taşımakla beraber dışarıya doğru çıkıntılar oluşturan viral proteinleri de barındırır. Viral zarf yapısında yer alan başlıca HIV proteini, giriş yapılacak hücrenin CD4 almaçlarına bağlanarak bir anti-reseptör işlevi gören gp120/41'dir. gp41 zarfı boydan boya kat ederken, gp120 dış yüzeyde gp41'e non-kovalent bağlarla bağlı halde bulunur. HIV yapısının şematik temsili Şekil 1'de verilmiştir.



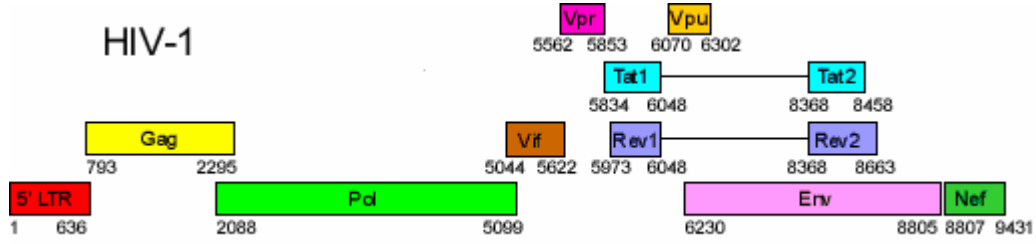
Şekil 1: HIV yapısının şematik gösterimi ([Los Alamos HIV Lab](#) 'dan alınmıştır)

HIV genomunda sadece 9 adet gen bulunur (bkz Şekil 2). Bunlardan üçü –gag, pol ve env- yeni viral partiküllerin oluşumu için gerekli yapısal bilgiyi barındırır. Diğer 6 gen tat, rev, ref, vrf, vpr ve vpu HIV'in hücreyi enfekte etmesi, hücresel düzenekleri kullanabilmesi, kendini kopyalayabilmesi ve hastalığın oluşmasına neden olan protein ürünlerini kodlar. HIV genlerinin işlevlerini kısaca özetlersek:

GAG: Kapsid proteinlerini kodlayan genomik bölgedir. P55 miristile bir prekürsör olarak ifade edildikten sonra viral proteaz tarafından p17 (MA), p24 (CA), p7 (nükleokapsid) ve p6 proteinlerini oluşturacak şekilde kesilerek işlenir.

POL: Revers transkriptaz, proteaz ve integraz viral enzimlerinin kodlandığı bölgedir.

ENV: Viral proteaz tarafından transmembran gp41 ve yüzey gp120 zarf proteinlerini oluşturacak şekilde işlenecek gp60 prekürsörünü kodlar



Şekil 2: HIV genomunun şematik yapısı ([Los Alamos HIV Lab](#) 'dan alınmıştır)

REV: Lentivirüsler arasında işlevsel düzeyde en iyi korunmuş regülatuar bir proteindir. Nükleusta yerleşik 79kD'luk bir fosfoproteindir. Viral mRNA'ların nükleer eksportu ve stabilizasyonundan sorumludur.

VIF: 26 kD'luk bazik bir proteindir. Enfektivite faktörü olarak da anılır. Viral partiküllerin üretiminden değil ama enfekte etme özelliğinden sorumludur. Vif yokluğunda hücre-hücre bulaşı olmasına rağmen hücreyi enfekte etme ve provirüs oluşumu defektiftir.

VPR: Viral protein R olarak da bilinir. Öne sürülen işlevleri arasında preintegrasyon komplekslerinin nükleusa hedeflenmesi, hücre döngü aresti, bazı hücrel genlerin transaktivasyonu bulunmaktadır.

VPU: Viral protein U olarak da isimlendirilir. En az iki önemli işlevi keşfedilmiştir. Birincisi CD4'ün endoplazmik retikulumda degradasyonuna neden olmakta; ikincisi HIV ile enfekte hücrelerin plazma membranından virüs tomurcuklanmasını uyarmaktadır.

NEF: Enfekte hücrelerde üretilen ilk viral proteinlerden biri olup tüm HIV proteinleri arasında en immunojenik olanıdır. Konak hücre sinyal ileti yollarıyla etkileşerek CD4 ve MHC sınıf I gibi pek çok genin ekspresyonunun baskılanmasına; öte yandan da HIV replikasyonunu destekleyecek genlerin yüksek düzeyde ifade edilmelerini sağlar (bu bölümdeki tüm bilgiler 5 no.'lu referanstan özetlenmiştir).

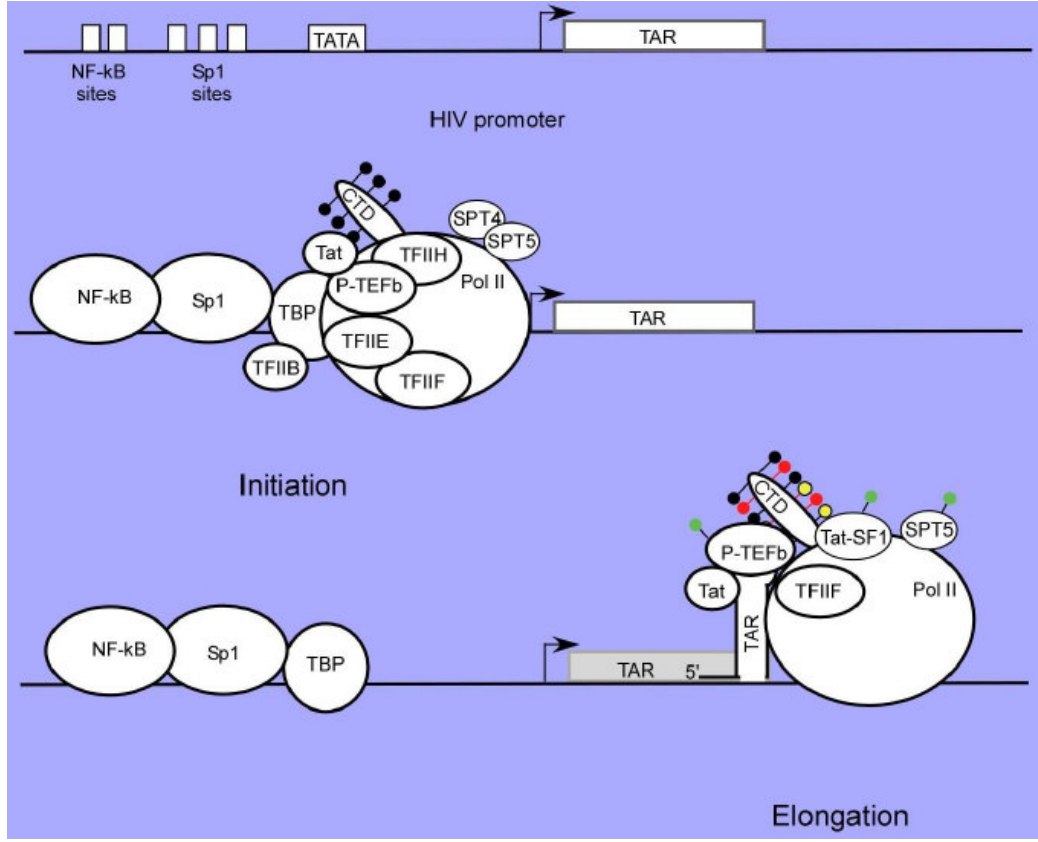
HIV genomunda bulunan dokuzuncu gen olan TAT geni araştırma konumuz ile ilgili olduğundan daha geniş olarak ayrı bir bölümde anlatılacaktır.

2.3 HIV – Tat Geni ve İşlevleri:

Tat proteini HIV gen ekspresyonu için gerekli iki faktörden (tat ve rev) biri olup, temel olarak gen ekspresyonu için transaktivatör işlevi bulunmaktadır (12). İki formu bulunmaktadır: 72 amino asit uzunluğundaki Tat-1 ekzon (minör form) ve 86 amino asit uzunluğundaki Tat-2 ekzon (majör form). Enfekte hücrelerde her iki form da saptanabilmektedir (12). İmmunofloresans ve immunohistokimyasal boyamalarda temel olarak nükleus ve nukleolusda lokalize olduğu gösterilmiştir. HIV nükleik asidi proviral formda hücre DNA'sına entegre olduktan sonra, provirüsün LTR promotöründe bulunan TAR (transactivation responsive region) elementine bağlanarak transkripsiyonel inisiyasyon ve elongasyonu etkinleştirdiği gösterilmiştir

(13,14). TAR'ın, tanımlanmış ilk cis-etkili RNA enhancer olması, Tat'ın da bir RNA enhancer'ı ile etkileşebilen tanımlanmış ilk transkripsiyon faktörü olması ilgi çekicidir. Tat varlığında LTR'den provirüs transkripsiyon verimliliğinin birkaç yüz kat arttığı deneylerle bulgulanmış ve günümüze kadar yapılmış tüm in vitro hücre kültür sistemlerinde viral replikasyon için gerekliliği gösterilmiştir (5).

Tat transkripsiyonel etkilerini TAR elementine bağlandıktan sonra inisiyasyon ve elongasyonu uyararak gerçekleştirir. Bu işlemleri gerçekleştirebilmek için hücrel proteinlerle etkileşime girer ve konak hücrenin transkripsiyonel düzeneğini kullanır. Tat'ın elongasyon uyarımı ile ilgili daha fazla bilgiye sahibiz. Tat'ın siklin T ve cdk9'dan oluşmuş bir elongasyon faktörü olan P-TEFb, TAR ve yine elongasyonda rol oynayan Brd4 proteinleriyle doğrudan etkileşime girerek RNA polimeraz II'in C-terminal bölgesinin hiperforforilasyonunu tetikleyerek transkripsiyon inisiyasyonunu ve elongasyon devamını uyardığı gösterilmiştir (15,16)(ökaryotlarda transkripsiyon düzeneği ve regülasyonu ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılacaktır) . Elongasyonun yanı sıra Tat'ın preinisiyasyon kompleksinin (PIC) oluşumunda da rol oynadığı bilinmektedir. Tat'ın PIC yapısında yer alan TBP (TATA bağlayan protein), TATA kutusu, Sp1, TFIIF gibi moleküllerle; siklin E/cdk2 'le ve CBP/p300, p/CAF gibi koaktivatör ve kromatin modelleme kompleksleriyle doğrudan etkileştiği gösterilmiştir (17-22). Ayrıca Tat histon asetilazları da PIC'e çağırarak, transkripsiyon daha başlamadan özel nükleozomal bölgelerde H3 ve H4 lizin asetilasyonunun gerçekleşmesinden de sorumludur (22). Tat proteininin transaktivasyon sırasında etkileştiği ökaryotik proteinler Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3: Tat proteininin transaktivasyon sırasında etkileştiği ökaryotik proteinler (12. referanstan alınmıştır)

Transkripsiyonel aktivasyonun yanı sıra Tat'ın çeşitli hücrel genleri transkripsiyonel düzeyde baskılama (represyon) işlevi de olduğu bugün bilinmektedir (12). Bu işlevi, ilgili genlerin PIC yapı ve kompozisyonlarını bozarak gerçekleştirmektedir. Örneğin MHC sınıf I genlerinin bazal ekspresyonu PIC yapısında işlevsel bir TAF1 (TBP asosiye faktör 1) molekülünün varlığına bağlıdır. Tat TAF1'e bağlanarak asetiltransferaz aktivitesini ortadan kaldırmakta ve bu yolla MHC sınıf I ekspresyonunu baskılayabilmektedir (23,24).

HIV Tat proteininin üzerinde durmak istediğimiz bir diğer özelliği de CTIIA (class II transactivator) ile olan etkileşimidir. CTIIA bağışıklık sistemi açısından çok önemli bir proteindir. MHC sınıf II genleri için transkripsiyonel bir aktivatör işlevi görür ve yokluğunda

MHC sınıf II proteinleri eksprese olmaz; dolayısıyla CD4 T lenfositleri timusta gelişemez. HIV Tat ile CIITA arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir (38). Tat, CIITA ve MHC sınıf II ekspresyonunu baskılayabilirken; CIITA over-ekspresyonu da Tat'ı ve bu yolla da HIV replikasyonunu baskılayabilmektedir. Sonuç olarak HIV enfeksiyon gelişiminde bu iki protein arasındaki denge önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak Tat proteini gerek proviral gerekse hücrel genlerin, kromatin modifikasyonları, transkripsiyonel inisiyasyon, elongasyon, transkripsiyonel baskılanma dahil neredeyse genetik regülasyonun tüm süreçlerinde etkili olmaktadır. Ancak Tat proteininin etkileri sadece transkripsiyonel transaktivasyon ile sınırlı değildir. HIV enfeksiyonunun çok belirgin bir özelliği olan hücre ölümünde Tat proteininin rolü bir sonraki bölümde tartışılmıştır.

2.4. HIV – Tat Geni ve Apoptoz:

HIV enfeksiyonu CD4 T hücrelerinin apoptoz yoluyla progresif kaybı ile karakterizedir. Bu progresif kayıp sadece virüs ile enfekte hücrelerde değil, enfekte olmayan hücreler içinde geçerlidir (25). Özellikle virüs ile enfekte olmayan hücrelerin apoptoz yoluyla kaybindan HIV Tat proteininin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tat proteininin bir diğer özelliği de hücre dışına sekrete olası ve komşu hücreler tarafından içe alınabilmesidir. Virüsle enfekte olmayan hücrelerin bu ekstraselüler Tat proteinini kendi içlerine almaları pek çok farklı yolla apoptoz sürecinin uyarılmasına neden olur (26). Tat proteininin apoptotik süreçleri uyarabildiği bilinen mekanizmalar arasında, Fas ligandının artmış ekspresyonunu uyarmak (27), çeşitli sitokinleri kodlayan genlerin uyarılması veya baskılanması (28), Bcl-2 gibi hücre yaşam faktörlerinin ifadesinin uyarılması (29), manganez bağımlı süperoksit dismutaz (30) ve p53 ekspresyonunun baskılanması (31) ve CDK aktivasyonu (32) sayılabilir.

Araştırmamıza konu olması nedeniyle özellikle üzerinde durmak istediğimiz bir mekanizma da Tat proteininin hücre mikrotübül polimerizasyonunu etkileyerek apoptozu tetiklemesidir (33). Mikrotübüller tubulin polimerlerinden oluşmuş, hücre morfoloji, hücre içi organel yapı ve yerleşimi, mitoz sırasında kromozom göçü, hücre farklılaşması ve hücre içi transportta rol oynayan hücre iskelet yapılarıdır. Bu denli çok ve önemli işlevleri olan mikrotübül yapısının bozulması, hücrede apoptozu tetiklemektedir (33). Mikrotübül yapısını bozan ajanlar (MDA-microtubul damaging agents) etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılmaktadır: taxanlar gibi mikrotübül stabilizasyon ajanları ve vinca alkaloidleri gibi mikrotübül depolarizasyon ajanları. MDA'lar hücre içi mikrotübül dinamiklerini bozduklarından programlanmış hücre ölümüne yol açarlar ve bu özellikleri nedeniyle de çeşitli kanserlerde tedavi amaçlı kullanım alanları bulunmaktadır.

HIV Tat proteininin hücre mikrotübüllerine bağlandığı ve stabilize edici MDA'lar benzeri bir etki göstererek hücre mikrotübül dinamiğini bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca mikrotübüllere bağlandıktan sonra pro-apoptotik Bcl-2 aile üyesi olan Bim ile de doğrudan etkileştiği ve intrinsik mitokondrial apoptoz yolağını uyardığı bulgulanmıştır (34). Yine bir diğer çalışma Tat'ın, bir mikrotübül ilişkili (asosiye) protein (MAP) olan ve mikrotübül dinamiklerinde düzenleyici protein kabul edilen, mutasyonlarının lisensefaliye yol açtığı bilinen LIS1 fosfoproteini ile hücre içinde doğrudan etkileşebildiği bildirilmiştir (35). Tüm bu çalışmalar HIV enfeksiyonunda özellikle enfekte olmamış hücrelerde gözlenen artmış hücre ölümünün bir nedeninin de ekstrasellüler ortama salgılanan Tat proteini olduğunu ortaya koymaktadır.

2.5. HIV – Tat Geninin Ökaryotik Homoloğu Olarak TAF7

Yukarıda HIV Tat'ın bazı genlerin transkripsiyonel düzeyde baskılanmasından sorumlu olduğunu bahsetmiştik. HIV Tat'ın bu baskılayıcı etkisinin en detaylı tanımlandığı gen MHC

sınıf I genidir. MHC sınıf I geninin bazal ekspresyonu PIC’de TAF1’in (eski adıyla TAFII250) bulunmasını gerektirmektedir. TAF1 asetiltransferaz ve kinaz işlevlerine sahip bir moleküldür. Kinaz işlevinin substratı halen bilinmemekle beraber asetilaz özelliğiyle histon ve PIC’de bulunan diğer proteinlerin asetilasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. HIV Tat TAF1’e doğrudan bağlanarak asetilaz özelliğini baskıladığı ve MHC sınıf I geninin TAF1’e bağımlı bazal transkripsiyonunu engellediği gösterilmiştir. Buna ek olarak P-TEFb ile etkileşerek proviral elongasyonu tetiklediği bildirilmiştir. Benzer özellikler gösterebilen, TAF1’e bağlanarak asetiltransferaz özelliğini baskılayabilen (36), P-TEF ile etkileşerek elongasyonda rol oynayan (37) ve PIC’de bulunan proteinler ile Tat’a benzer şekilde ilişki kuran tek bir ökaryotik gen bilinmektedir: TAF7 (eski adıyla TAFII55)

Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için GTF’lerin promotöre bağlanması gerekmektedir. Promotöre ilk bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID’dir. TFIID, TBP’den (TATA binding protein) ve TAF’lerden (TBP associated faktör) oluşmaktadır. İnsan genomundaki genlerin sadece %30’unun promotöründe “TATA” kutusu bulunmaktadır. “TATA” kutusu bulunmayan promotör bölgelerinde önemli başka bir sekans elementi olan initiator (Inr) sekansı bulunur. TATA kutusu içermeyen fakat Inr dizisi bulunan promotörlerin çoğunda ayrıca DPE (downstream promoter element) elementi de bulunmaktadır. DPE yaklaşık olarak transkripsiyon başlama bölgesinden 30 bp aşağıda yer alır. TATA kutusu bulunmayan promotörlerde TFIC’in (TBP free TAF containing complex) TFIID’in yerini aldığı invitro koşullarda gösterilmiştir. TBP olsun veya olmasın her promotörün kendine has bir TAF kompleksi oluşturduğu, gene özgü olan bu kompleks oluşumunun transkripsiyonun ön koşulu olduğu bugün bilinmektedir. Pek çok farklı TAF’lerden biri de TAF7’dir.

Literatürde TAF7 ile ilgili çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Bir tarama yapıldığı takdirde içinde TAF7 geçen toplam 19 makale çıkmaktadır. Bunların çoğu TFIID kompleksinin farklı

ökaryotlardaki yapısını ve diğer TAF'ler ile olan ilişkileri kapsayan çalışmalardır. İki TAF7 promotörü ve ekspresyonu ile ilgili olup protein fonksiyonu ile ilgili bilgi vermemektedir. TAF7 proteinin işlevi ile ilgili ancak 4 makale bulunmaktadır. Bunlardan biri TAF7'nin, HIV Tat proteinine benzer şekilde TAFII250'yi bloke ettiğini ve böylelikle transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev aldığını ileri sürmektedir (36). Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, TAFII250 üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermektedir. Ayrıca HIV Tat proteini gibi elongasyon faktörü P-TEFb ile etkileşerek elongasyonu desteklemektedir (37). Özetle TAF7, HIV Tat proteinine benzer şekilde elongasyonu destekleme veya transkripsiyonu baskılayabilme özelliklerini barındırmaktadır. Ancak HIV Tat'ın aksine programlanmış hücre ölümünde bir rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

TAF7'nin apoptoz sürecinde bir rolü olabileceğine ait tek bir yayın bulunmaktadır. 2004 yılında Fukuchi ve arkadaşları TAF7'nin poliamin transport aktivitesini düzenleyerek poliamin analogları ile indüklenen apoptozda rol oynadığını ileri süren bir çalışma yayınladılar. Bu çalışma kapsamında poliamin transport aktivitesinde rol oynayan genleri tanımlayabilmek amacıyla öncelikle MGBG (methylglyoxal bisguanylhydrazone) dirençli CHO hücreleri oluşturulmuştur. MGBG, bir poliamin transport inhibitörü ve hücelere eklenmesi programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. MGBG dirençli hücrelerde retroviral gen tuzağı (retroviral gene trap) metoduyla direncin oluşumunu sağlayan gen, bu çalışmada TAF7 olarak tanımlanmıştır. Yazarlar verilerini TAF7'nin poliamin transportunda düzenleyici olarak rol aldığı ve bu yolla indüklenen programlanmış hücre ölümünde işlevi olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Ancak bu çalışmadaki verileri farklı yorumlamak mümkündür ve TAF7'nin apoptozda rolü olabileceği hipotezini desteklemektedir. Kullanılan yöntem, hangi genin ekspresyon kaybında MGBG'ye karşı direnç geliştiğini saptamaya yöneliktir. Sonuç olarak da TAF7 ekspresyon

kaybında MGBG ile indüklenen apoptoza karşı bir direnç oluşumu gözlenmiştir. Eğer TAF7, transkripsiyonu durdurma işlevi ile apoptoz yolağında görev alıyorsa, yokluğu bu yolaktaki ardışık sinyal iletiminde bir duraklamaya yol açarak direnç gelişimine neden olacaktır. Diğer bir ifadeyle gözlenmiş olan apoptoza karşı direnç, TAF7 poliamin transport yolunda rol oynadığı için değil, genel olarak programlanmış hücre ölümünde bir fonksiyonu varsa da gözlenebilir.

TAF7'nın işlevlerini daha iyi anlamak için parçası olduğu genel transkripsiyon mekanizması üzerinde kısaca durmak gerekmektedir.

2.6. Transkripsiyon:

Gen ekspresyonunun düzenlenmesi hücrenin çevresel koşullardaki değişikliklere adaptasyonunu ve farklılaşmış hücrelerin farklı görevleri yerine getirmelerini sağlamaktadır. Örneğin kas ve karaciğer hücreleri aynı genleri taşımalarına rağmen işlevleri farklıdır. Hücre işlev ve özellikleri, genomlarındaki farklılıklar ile değil, gen ekspresyonu paternlerindeki farklılıklar ile belirlenmektedir.

Bir genin ekspresyonundaki ilk aşama DNA'nın RNA'ya transkripsiyonudur. Ökaryotik hücrelerde RNA sentezlendikten sonra değişik yollarla modifiye edilir. Örneğin intronlar "splicing" ile çıkarılır. Farklı tipte RNA'lar farklı görevler üstlenmiştir. Mesajcı RNA (mRNA)'ların protein sentezi için kalıp görevi, ribozomal RNA'ların (rRNA) ve transfer RNA'ların ise protein translasyonunda görevleri vardır (41).

2.7. RNA Polimerazlar:

RNA sentezinden sorumlu enzim RNA polimerazdır. DNA kalıp olarak alıp ribonükleosid 5' – trifosfatların (NTP) polimerizasyonunu 5' – 3' doğrultusunda katalizler. DNA polimerazdan

farklı olarak RNA polimerazlar RNA sentezini başlatmak için primere gereksinim duymaz. Bunun yerine transkripsiyon genin başlangıcında belirli bölgelerden *de novo* olarak başlar. RNA polimerazın bağlanıp, transkripsiyonu başlattığı gen ifadesinin düzenlendiği DNA bölgeleri “promotör” olarak isimlendirilir. RNA polimeraz çoklu protein polipeptid zincirlerinden oluşan kompleks bir enzimdir.

Prokaryotik RNA polimeraz beş farklı alt üniteden oluşmaktadır. Bunlar; α , β , β' , ω ve σ dır. σ alt ünitesi diğerlerine göre daha zayıf bağlıdır ve diğer alt ünitelerden kolayca ayrılabilir. Merkezi polimerazı α , β , β' ve ω alt üniteleri oluşturur. Merkezi polimeraz NTP'lerin polimerizasyonunun katalizleme yeteneğine sahiptir. Bu da σ alt biriminin temel katalitik aktivite için gerekli olmadığını belirtmektedir. σ alt birimi transkripsiyon inisiyasyonun başlama bölgesinin tanınması için gereklidir (41).

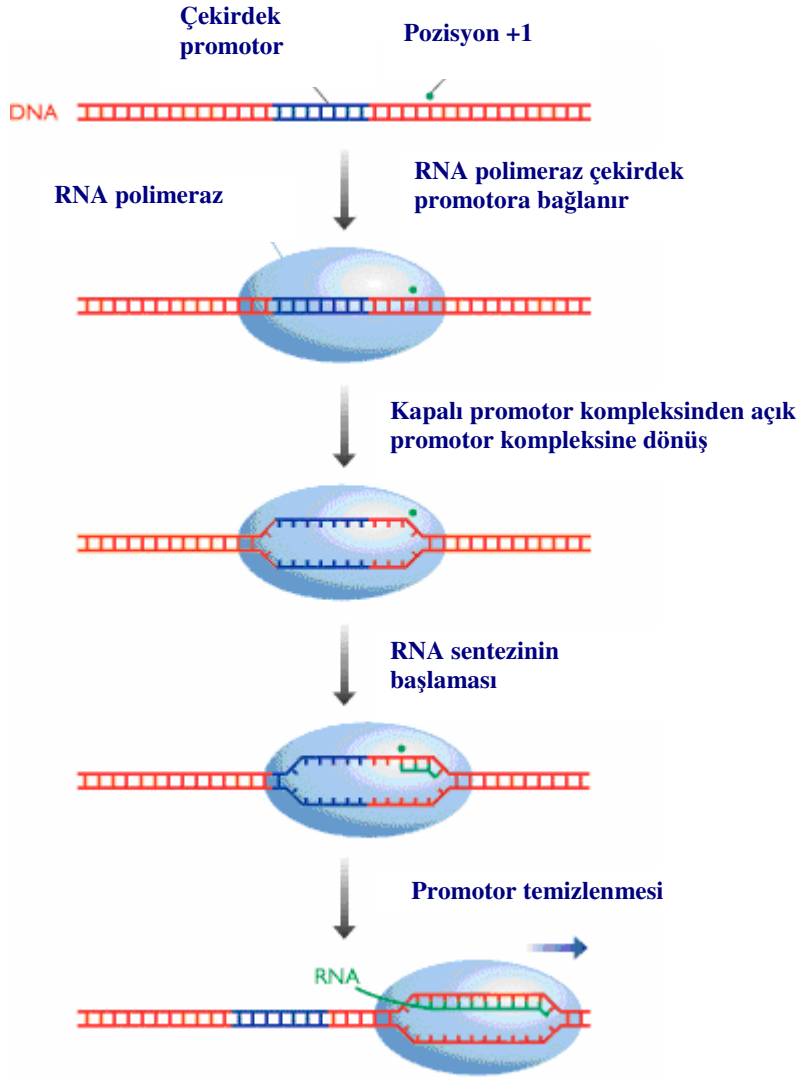
Ökaryotlarda transkripsiyon prokaryotlardakiyle aynı temel mekanizmaya dayanmakla birlikte daha karmaşıktır. Prokaryotlarda tüm genler tek bir RNA polimeraz ile transkribe edilirken, ökaryotik hücreler farklı RNA polimerazlar içerir. Ayrıca prokaryotlarda RNA polimeraz direkt olarak promotör sekansa bağlanabilirken, ökaryotik RNA polimerazlar transkripsiyonu başlatmak için başka proteinler ile etkileşime girmek durumundadır.

Ökaryotik hücreler üç farklı RNA polimeraz içermektedir. Protein kodlayan genler RNA polimeraz II ile transkribe edilerek mRNA' ya dönüştürülür. Ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA'lar (tRNA) ise RNA polimeraz III tarafından transkribe edilir. RNA polimeraz I rRNA'ların büyük parçaları olan 28S, 18S ve 5,8S alt birimlerinin transkripsiyonundan sorumludur. RNA polimeraz III ise tRNA ve rRNA' ların 5S alt birimlerinin transkripsiyonundan sorumlu olan polimerazdır. Ökaryotik RNA polimerazlar 12 -17 farklı alt birim içeren kompleks enzimlerdir. Bu üç ökaryotik RNA polimerazlar dokuz adet korunmuş alt birim içermektedir. Bunlardan beş tanesi prokaryotlardaki alt birimler (α , β , β' , ω ve σ) ile benzerlik göstermektedir.

2.8. Prokaryotlarda Transkripsiyon Düzenegi:

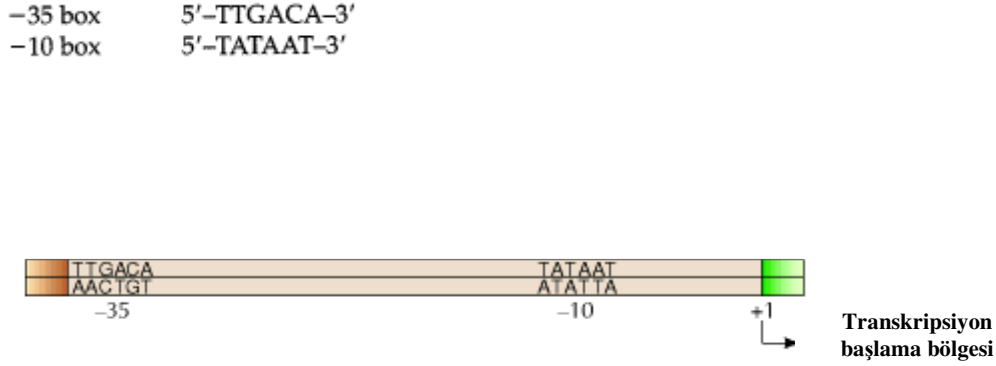
E. coli gibi prokaryotik hücrelerde promotör ve RNA polimeraz arasında doğrudan bir temas oluşmaktadır. Polimerazın dizi özgüllüğünü sağlayan σ alt ünitesidir. σ alt ünitesi olmadığı durumda RNA polimeraz, gevşek ve özgül olmayan bir şekilde DNA'ya bağlanmaktadır.

Prokaryotik hücrelerde promotör ve RNA polimeraz arasında temas oluştuktan sonra kapalı promotör kompleksi transkripsiyon başlama bölgesi civarındaki birkaç baz çifti arasındaki hidrojen bağları kırılarak bir açık promotör kompleks haline dönüştürülür. Sonra da RNA polimeraz promotörden uzaklaşarak transkripsiyonu başlatır (bkz Şekil 4).



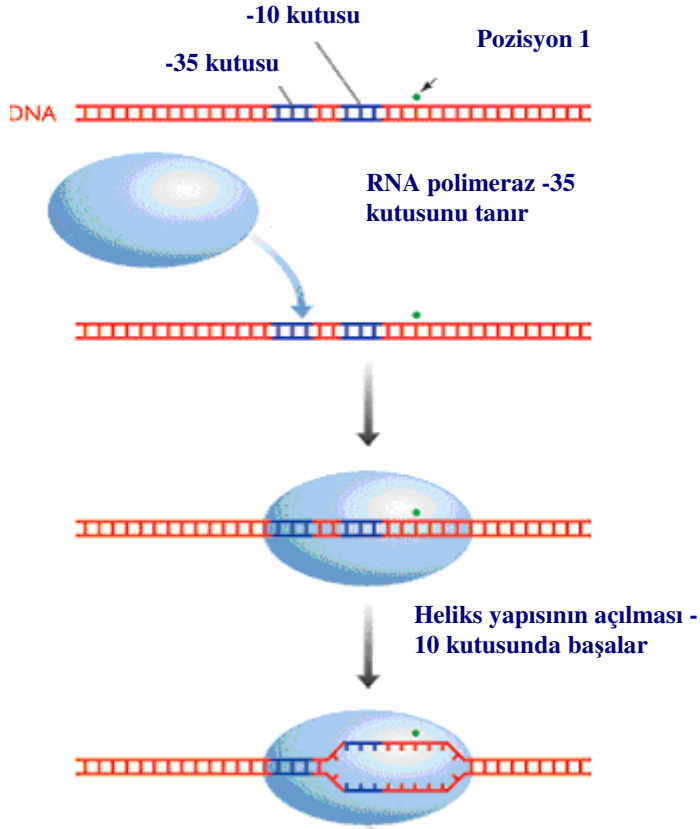
Şekil 4: Transkripsiyon başlangıcı (inisiyasyonu) sırasında oluşan olayların genelleştirilmiş şeması. Çekirdek promotör mavi ile gösterilmiştir ve transkripsiyon başlama bölgesi yeşil nokta ile belirtilmiştir. RNA polimeraz tutunmasından sonra kapalı kompleks, DNA çift sarmal yapısının kısa bir bölümündeki baz çiftleri arasındaki hidrojen bağların kırılmasıyla açık kompleks haline dönüştürülür. RNA sentezi başlar (“Brown T. A. Genomes 2, . Second Edition, New York, John Wiley & Sons Inc., 2002;171-195.” kitabından alınmıştır).

E. coli promotörü altı nükleotidden oluşan iki bölge içermektedir. Bunlara – 35 ve -10 kutuları denilmektedir. Kutuların isimleri transkripsiyonun başlangıç noktasına olan uzaklıklarını belirtmektedir (bkz Sekil 5).



Şekil 5: *E. Coli* .promotör dizileri *E. coli* promotörleri transkripsiyon başlama bölgesinden 10 ve 35 baz yukarda yer alan iki set sekans içermektedir. (“Cooper G., Hausman R. The Cell, Third Edition, Washington DC, ASM Pres, 2004; 231, 260.” kitabından alınmıştır.)

E. coli promotöründe yapılan mutasyon çalışmaları -35 kutusu dizisindeki değişikliklerin RNA polimerazın bağlanma kabiliyetini değiştirdiğini, -10 kutusu sekansındaki değişikliklerin ise kapalı promotör kompleksinden açık forma dönüşümü etkilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar şekil 5’ de gösterilen modelin oluşturulmasını sağlamıştır. Promotör tanınması için ilk önce -35 kutusu ile σ alt ünitesi arasında etkileşim gerçekleşerek kapalı promotör kompleksi oluşturulur. RNA polimeraz -35 kutusunun 60 bp yukarisından, - 10 kutusuna kadar olan bölgeye bağlanır. Bu aşamayı – 10 kutusundaki baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile açık kompleksin oluşturulması takip eder. – 10 kutusu G-C baz çiftlerine göre daha zayıf olan A-T baz çiftlerinden oluşmaktadır (42). Şekil 6’ da *E. Coli* promotöründen transkripsiyon inisiyasyonu anlatılmıştır.

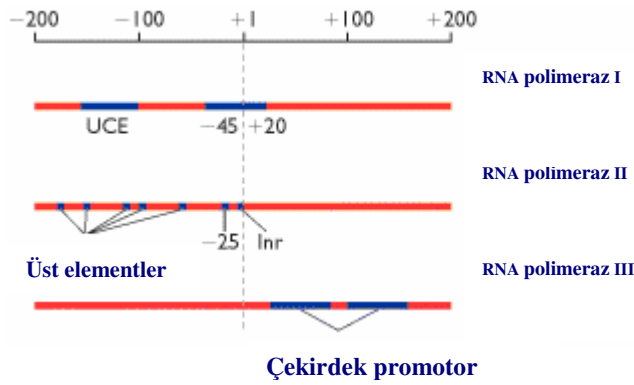


Şekil 6: *Escherichia coli*' de transkripsiyon inisiyasyonu. *E. coli* RNA polimerazı – 35 kutusunu bağlanma bölgesi olarak tanır. DNA' ya bağlandıktan sonra, - 10 kutusundaki AT zengin bölgede baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları kırılarak, kapalıdan açık kompleks formuna dönüş başlar. Polimeraz tek bir yapı olarak gösterilse de σ alt birimi diziye özgül DNA bağlanma aktivitesini sağlamakta ve – 35 kutusu dizilerini tanımaktadır. ("Brown T. A. Genomes 2, . Second Edition, New York, John Wiley & Sons Inc., 2002;171-195." Kitabından alınmıştır.)

2.9. Ökaryotlarda Transkripsiyon Başlama (İnisiyasyon) Kompleksinin Oluşturulması:

Her ne kadar yukarıda tarif edilen transkripsiyon inisiyasyonu genel olarak ökaryotik RNA polimerazlar için de geçerliyse de, her bir ökaryotik RNA polimerazlar için detaylar farklıdır. Esas konumuz olan protein sentezi için gerekli mRNA'ların RNA polimeraz II ile transkripsiyonuna geçmeden önce RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyondan kısaca bahsedelim. RNA polimeraz I ve III promotörlerinden transkripsiyonun başlaması RNA polimeraz II'de görülen benzer olayları içermektedir, fakat detaylar farklıdır. En dikkat çekici benzerliklerden biri TBP'nin RNA polimeraz I ve III ile transkripsiyon inisiyasyonunda da rol oynamasıdır.

RNA polimeraz I inisiyasyon kompleksi dört adet protein faktörü içerir. Bunlardan biri, UBF, çekirdek promotör ve yukarı (upstream) kontrol elementi (UCE) ile etkileşen benzer proteinlerin bir dimeridir (Bkz Şekil 7). UBF, Bazı RNA Polimeraz II TAF'larına benzer şekilde bir histona benzer ve promotör bölgesinde nükleozom benzeri bir yapı oluşturabilir. Bir ikinci protein kompleksi insanlarda SL1 ve farelerde TIF-IB, TBP içerir ve UBF ile birlikte RNA polimeraz I' e etki eder. Son iki protein kompleks olan TIF-IA ve TIF-IC ise promotöre etki eder. Orijinal olarak inisiyasyon kompleksinin basamak basamak oluşturulduğu düşünülmekteydi, fakat son çalışmalar RNA polimeraz I' in bu dört proteine birden promotör tanınması işleminden önce ve DNA' ya sadece tek bir basamakta bağlandığını ileri sürmektedir.



Şekil 7: Ökaryotik promotör yapıları: Promotör bölgeleri mavi ile belirtilmiştir. RNA polimeraz III 5S rRNA genleri ile ilgilidir. RNA polimeraz II promotöründe Inr başlatıcı sekansı, RNA polimeraz I promotöründe UCE (upstream control element) bulunur. (“Brown T. A. Genomes 2, . Second Edition, New York, John Wiley & Sons Inc., 2002;171-195.” kitabından alınmıştır).

RNA polimeraz III promotörleri yapısal olarak değişiktir ve bu da farklı tanınma işlemlerinin var olduğunu düşündürmektedir. RNA polimeraz III promotörünün değişik bölgelerinden transkripsiyon inisiyasyonu, farklı genel transkripsiyon faktör setleri gerektirmektedir. Fakat tüm transkripsiyon başlama süreçleri TFIIB adı verilen bir genel transkripsiyon faktörünü içerir. TFIIB'nin alt ünitelerinden biri TATA bağlayan protein TBP'dir. TATA sekansı içeren, U6 geni ile benzer türde olan promotörlerde TBP doğrudan DNA'ya bağlanır. TATA sekansı içermeyen diğer RNA polimeraz III promotörlerinde ise bağlanmanın ikinci bir protein aracılığı ile olduğu düşünülmektedir.

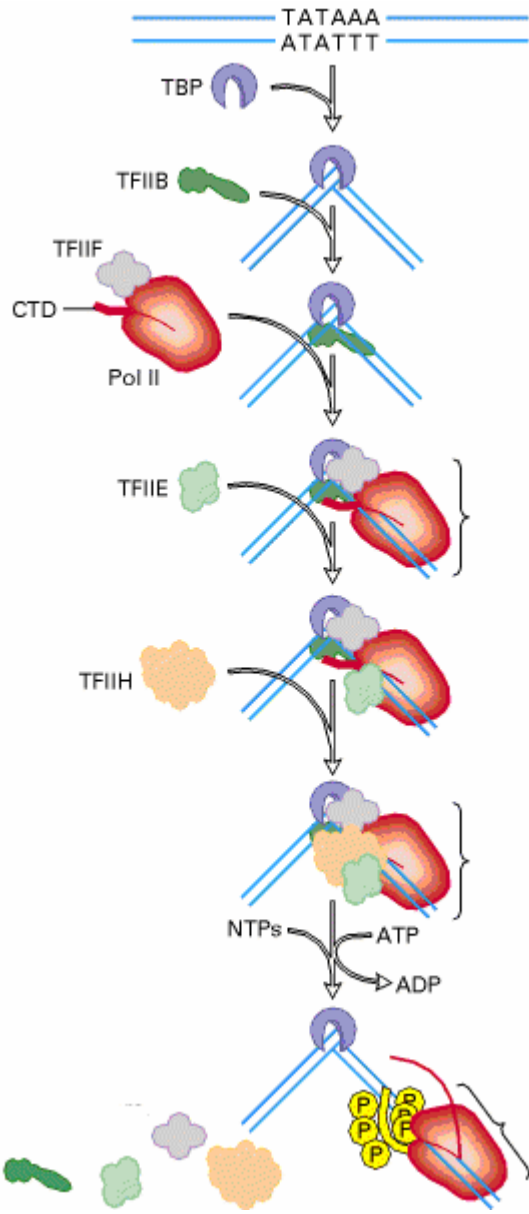
RNA polimeraz II ile transkripsiyon inisiyasyonunda bakteri ve ökaryotlar arasındaki en önemli farklılık ökaryotik polimerazların direkt olarak çekirdek promotör sekanslarını tanınamalarıdır (42). Protein kodlayan genlerin transkripsiyonundan sorumlu olduğu için ökaryotlarda transkripsiyonun mekanizmasının anlaşılması amacıyla RNA polimeraz II'ye çok

önem verilmiştir. 1979 yılında Robert Roeder tarafından RNA polimeraz II'nin bazı yardımcı proteinler eklendiğinde transkripsiyonu başlatabildiğini rapor etmiştir. Bu nedenle ökaryotik transkripsiyon sisteminin bir takım başlatıcı faktörlere ihtiyaç duyduğu (bakteriyel sistemlerdeki “ro” faktörüne karşılık) anlaşılmıştır.

Nükleer ekstraktların biyokimyasal ayrıştırılması yapılarak RNA polimeraz II'nin transkripsiyonu başlatması için gerekli olan (transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan) bir takım özgül proteinler tanımlanmıştır. Genel ve gene özgül olmak üzere iki tip transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Genel transkripsiyon faktörleri tüm polimeraz II promotörlerinin transkripsiyonda yer alır. Bu nedenle temel transkripsiyon makinesinin bir parçasıdır. Gene özgül transkripsiyon faktörleri ise ekspresyon kontrolü için kendilerine özgü cis-etkili dizilere bağlanırlar. Yaklaşık olarak insan genomunun %5'i transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (41).

Genel olarak bakıldığında RNA polimeraz II ile transkripsiyonun başlaması için beş genel transkripsiyon faktörü gereklidir. Polimeraz II ile transkribe edilen pek çok genin promotöründe transkripsiyonun başlangıcından yaklaşık 25 – 30 nükleotid aşağıda TATAA benzeri DNA dizisi bulunur. Bu dizi “TATA kutusu” olarak isimlendirilir. TATA kutusunda mutasyon oluşturulması bazı genlerin transkripsiyonunun sonlanmasına neden olur. Bu durum TATA kutusunun transkripsiyonun başlamasında görevli olduğunu düşündürmektedir. Transkripsiyon kompleksinin oluşturulmasındaki ilk basamak TATA kutusuna genel transkripsiyon faktörlerinden TFIID'nin bağlanmasıdır. TFIID, TATA bağlayan protein (TBP) ve bilinen 12 TBP-asosiyatif faktörün (TAF), transkribe olacak gene özgü birleşiminden oluşmaktadır. TBP, DNA'ya bağlanan bir sekans-özgül proteindir. TATA kutusunda DNA çift ipliğinde minör oluğa bağlanır. TBP, DNA sarmalının çevresini kısmen sarak inisiyasyon kompleksindeki diğer proteinlerin bağlanabileceği eğer biçimli bir proteindir (42).

TFIID'nin bağlanmasıdan sonra diğer genel transkripsiyon faktörleri de bağlanarak pre-inisiasyon kompleksini (PIC) oluşturulur. TFIID'den sonra ikinci bir genel transkripsiyon faktörü olan TFIIB komplekse katılır. TFIIB, TBP ye ve TATA kutusunun yukarı yönünde kendine özgü DNA dizisine (BRE kutusu) bağlanır. TFIIB, RNA polimeraz II için bir köprü görevi görür ve 3' UTR bölgesindeki (UTR- untranslated region) transkripsiyon başlama bazını tayin eder. Üçüncü faktör TFIIIF ile birlikte RNA polimeraz II TBP-TFIIB kompleksine bağlanır. RNA polimeraz II'nin promotöre bağlanmasıdan sonra transkripsiyonun başlaması için TFIIIE ve TFIIH transkripsiyon faktörleri de gereklidir. TFIIH, iki önemli görevi olan çoklu alt birimli bir proteindir. Görevlerinden birincisi transkripsiyonun başlangıç noktasında DNA'nın çift sarmal yapısının açılmasını sağlamaktır. Bu görevi yerine getirmek için TFIIH'nin iki alt biriminin helikaz aktivitesi vardır. İkinci görevi ise RNA polimeraz II'nin en büyük birimi olan C-terminalinin fosforilasyonudur. Bu görevi yerine getirmek için TFIIH'nin bir diğer alt biriminin protein kinaz aktivitesi vardır. RNA polimeraz II, C-terminalinin fosforilasyonundan sonra preinisiasyon kompleksinden ayrılır, uzama (elongasyon) faktörleri ile etkileşerek transkripsiyona başlar. Geride kalan preinisiasyon kompleksinde yer alan proteinler tekrar kullanılmak üzere serbestleşir (bkz Şekil 8) (41).



Şekil 8: RNA polimeraz II' den izole edilen transkripsiyon inisiyasyon kompleksine bağlanma basamakları: Transkripsiyon inisiyasyonu kompleksi oluşturulduktan sonra açık kompleks oluşturulması için ATP hidrolizi gereklidir. Transkripsiyon başlayınca ve polimeraz promotörden uzaklaşınca, CTD fosforile hale gelir ve genel transkripsiyon faktörleri TBP – promotör kompleksinden ayrılır (“Lodish, Harvey; Berk, Arnold;

Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. Molecular Cell Biology, 4th Edition, New York, [W. H. Freeman & Co.](#), 2000.” Kitabından alınmıştır).

2.10 TFIID’ nin Yapısı:

İlk promotöre bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID’dir. Promotörün TATA kutusu bölgesine bağlanan TFIID, TBP (TATA binding protein)’den ve TAF’lerden (TBP associated faktörlerden) oluşmaktadır. “TATA kutusu” promotörlere ek olarak RNA polimeraz II ile transkribe edilen pek çok gen ikinci önemli bir sekans elementi olan “Inr” taşır. Bazı “RNA pol II” promotörleri ise sadece “Inr” elementi içerip, “TATA kutusu” içermez. “TATA kutusu” içermeyip de “Inr” elementi içeren promotörler, transkripsiyon başlangıç noktasından yaklaşık 30 baz çifti aşağıda yer alan ve “Inr” elementi ile kooperatif olarak görev yapan, “downstream promotor element” (DPE) de içerir. TATA kutusu bulunmayan promotörlerde TFIC’ in (TBP free TAF containing complex)’in TFIID’ in yerini aldığı *in vitro* koşullarda gösterilmiştir.

TBP ve TFIID, TATA sekansına direkt olarak bağlanarak promotörleri tanıyamazlar. TFIID’nin diğer alt birimleri olan TAF’lar “Inr” ve “DPE” elementlerini tanıyarak onlara bağlanırlar. TAF’lerin “Inr” ve “DPE” elementlerine bağlanması TBP’yi, TFIIB’ yi, polimeraz II’yi ve diğer transkripsiyon faktörlerini promotöre çağırılmaktadır. TBP bu nedenle hem “TATA” kutusu içeren ve hem de içermeyen promotörlerde polimeraz II transkripsiyonunu başlatmak için merkezi rol oynamaktadır (41).

TAF’ler transkripsiyon inisiyasyonu ve çoklu protein komplekslerinin genoma bağlanmasında değişik roller oynayan ilgi çekici proteinlerdir. TAF’lerin, transkripsiyon inisiyasyonunda TBP’den daha önemli rol üstlendiğini destekleyen bulgular bulunmaktadır.

Ayrıca ökaryotlarda, hücre döngüsü kontrolünde ve hayvanlarda gamet oluşumu ile sonlanan gelişimsel değişikliklerin düzenlenmesinde de rol oynamaktadırlar. Transkripsiyon sırasında TAF' ler TFIID ile TATA kutusuna bağlı durumdadır ve TATA kutusu olmayan promotörlerde “Inr” sekansını tanımada rol oynayan “TAF- and initiator-dependent cofactors (TICs)” olarak isimlendirilen diğer proteinler ile ilişkilidir (42).

TAF'ler için dört önemli göreve sahip oldukları söylenebilir. Birincisi gen ekspresyonu için diğer faktörler ile işbirliği yaparak spesifik ko-aktivatör olmalarıdır. İkincisi, TFIID'nin kararlılığını sağlamaktır (Örneğin TAF10' un histon katlama motifi bulunmaktadır). Üçüncüsü, bazı TAF'ların farklı promotör elementleri ile direkt ilişkiye girerek, onları tanımalarıdır. Sonuncusu ise TAF'ların seçici olarak gen ekspresyonunda görevli olmalarıdır. Örneğin TAF 1 memeli genlerinin %18' inin ekspresyondan sorumludur. MHC Sınıf I genlerinin ekspresyonu için gerekli olduğu bilinen TAF1' in kinaz ve asetiltransferaz aktivitesi bulunmaktadır, fakat bu aktivite rolleri ve TAF1'in fonksiyonu hala anlaşılammıştır (44). TAF6 ve TAF9' un direkt olarak DPE (downstream promotor element) ile etkileşime girdiği bilinmektedir TAF'lerin fonksiyonları hakkında çok az şey bilinmekle birlikte, TFIID yapısı ve kompozisyonunun promotörde transkripsiyonun başlaması için gerekli olan “pre inisiation complex” (PIC) adı verilen genel transkripsiyon faktörleri ve polimeraz II' den oluşan kompleksin oluşturulması için önemli olduğu bilinmektedir (44).

2.11.TAFII7 ve İşlevleri:

HIV Tat proteini TAF 1'in asetil transferaz aktivitesi gösteren (AT) domainine bağlanarak enzimatik aktivitesini inhibe etmektedir. Bir TFIID elemanı olan TAF7' nin de TAF1'e bağlanarak onun AT aktivitesini inhibe ediyor olması ve MHC Sınıf I

transkripsiyonunun represyonuna yol açması oldukça ilginçtir. Bu nedenle, TAF7 MHC Sınıf I transkripsiyonunun bir düzenleyicisidir denilebilmektedir. Bu bulgulardan yola çıkılarak TAF7' nin PIC oluşumu tamamlanmadan transkripsiyonun başlamasına izin vermediği ve dolayısıyla transkripsiyonunun başlamasında bir kontrol noktası düzenleyicisi olduğu hipotezi öne sürülebilir. TAF7' nin PIC' de TFIID ile etkileşimde olduğu ve transkripsiyondan önce PIC' den ayrıldığı rapor edilmiştir. TAF7' nin kompleksten ayrılmasından sonra TAF1 fosforillenir. Böylece tekrar TAF7' nin bağlanması olasılığı azaltılır (45).

Araştırmamızda TAF7' nin apoptoz sürecine olan etkisini incelemektedir. Apoptoz ile ilgili genel bilgi aşağıda verilmiştir.

2.12. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz):

Programlanmış hücre ölümü dokularda ve embriyonik gelişim sırasında yer alan normal fizyolojik bir hücre ölümü formudur. Yetişkinlerde programlanmış hücre ölümü, hücre çoğalmasının kontrolünden ve dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Ayrıca programlanmış hücre ölümü DNA'sı hasar görmüş veya virüs ile enfekte, dolayısıyla potansiyel zararlı hücrelere karşı bir korunma mekanizmasıdır. Böylece programlanmış hücre ölümü, kansere yol açabilecek potansiyel zararlı mutasyonları taşıyan hücrelerin eliminasyonunu sağlamaktadır .

Embriyonik gelişim sırasında, programlanmış hücre ölümü, bir dokuda istenmeyen hücrelerin eliminasyonunda rol oynamaktadır. Örneğin programlanmış hücre ölümü larval dokularda parmak aralarındaki hücrelerin elimine edilmesinde ve dolayısıyla parmakların oluşmasında görevlidir.

Programlanmış hücre ölümü pek çok sinyal yollarının entegre işbirliği ile düzenlenmektedir. Bazı sinyal yolları hücre ölümünde rol oynarken bazıları ise hücrelerin yaşama devam etmesinde görev almaktadır (41, 43).

2.12.1 Kaspazlar

Kaza sonucu meydana gelen hücre ölümlerine karşılık programlanmış hücre ölümü “apoptoz” olarak bilinen, morfolojik bir değişiklik olarak karakterize edilen aktif bir süreçtir. Apoptoz sırasında genellikle kromozomal DNA “nükleozomlar” arasından kesilerek küçük parçalara ayrılır. Kromatin yoğunlaşır ve nükleus küçük parçalara bölünür. Son olarak hücre, membran kaplı küçük parçalara bölünür. Apoptotik hücreler ve hücre parçacıkları hem makrofajlar, hem de komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve fagosite edilirler. Böylece apoptoz sonucu ölen hücreler dokudan uzaklaştırılır. Akut yaralanma sonucu ölen hücreler ise içeriklerine ekstrasellüler boşluğa verirler ve yangıya neden olurlar.

C. Elegans' da programlanmış hücre ölümü çalışmalarında apoptozda görevli üç önemli gen tanımlanmıştır. Nemotod gelişimi sırasında toplam 1090 somatik hücreden 131' i programlanmış hücre ölümü ile elimine edilmektedir. *C. Elegans*' da apoptozun oluşması için iki gen, *ced-3* ve *ced-4* gereklidir. Üçüncü gen, *ced-9*, ise apoptozun negatif kontrolünde rol oynamaktadır. Eğer *ced-9* mutasyon ile inaktive edilirse, normal olarak yaşamaya devam eden hücreler apoptoza gider. Eğer “*ced-9*” anormal yüksek seviyede eksprese edilirse, normal programlanmış hücre ölümü meydana gelemez.

“*Ced-3*”, “*ced-4*” ve “*ced-9*” genleri ile benzer olarak memelilerde de korunmuş efektör ve düzenleyici proteinler tanımlanmıştır. “*Ced-3*” memelilerde “kaspazlar” olarak bilinen bir proteaz ailesinin prototipidir. Çünkü her ikisinin de aktif bölgelerinde “sistein” ©, kestikleri bölgelerde de “aspartik asit” (Asp) amino asitleri bulunmaktadır. Kaspazlar yaklaşık olarak 100

farklı hedef proteini olan, apoptozda görevli bir proteaz ailesidir. Kaspazların anahtar hedefleri, nükleer DNA'nın fragmentasyonudur. Bu nedenle kaspaz ailesi nükleer DNA'nın fragmentasyonundan sorumlu bir Dnase'ı da içermektedir. Ek olarak kaspazlar nükleer laminleri de parçalayarak nükleus ve hücre iskeleti proteinlerin fragmentasyonuna ve hücrenin membran kaplı küçük parçalara fragmentasyonuna da neden olmaktadır.

Kaspazlar, aktif forma proteolitik bir kesim sonucu dönüşebilecek olan inaktif prekürsörler olarak sentezlenirler. Bir başlangıç kaspazının aktivasyonu, diğer kaspazların aktivasyonuna da yol açan zincir reaksiyonunu başlatır ve hücrenin ölümüne yol açar. Kaspazların düzenlenmesi hücrenin yaşamına devam etmesi için çok önemlidir. "Ced-4" ün memeli homologu olan "Apaf-1" kaspazlara bağlanır ve onların aktivasyonunu sağlar. "Ced-9" un memeli homologu olan "Bcl-2" ailesi ise kaspaz aktivasyonunu ve dolayısıyla programlanmış hücre ölümünü inhibe eder. Ayrıca kaspazlar, apoptoz proteinlerinin inhibitörleri olan "IAP" ler olarak isimlendirilen protein ailesi ile de düzenlenirler. "IAP" ler kaspaz aktivitesini direkt olarak inhibe ederler (41, 43).

Memeli hücrelerinde programlanmış hücre ölümü kontrolünde merkezi rol oynayan "Bcl-2" ailesi üyeleri, mitokondriye etki eder. Memeli hücrelerinde anahtar kaspazlardan biri "Kaspaz-9" dur. Kaspaz-9, C. Elegans'da "Ced-3" ün "Ced-4" ile kompleks oluşturması ile aktive olmasına benzer şekilde, "Ced-4" ün memeli homologu olan "Apaf 1" ile kompleks oluşturarak aktive olur. Memelilerde bu kompleksin oluşması için mitokondriden "sitokrom c" nin salınması gereklidir. "Sitokrom c" mitokondriden sitozole apoptotik bir sinyal alınması sonucu salınır. Normal koşullarda "sitokrom c", "apaf-1" ve "kaspaz-9" sitozolde bulunurken, mitokondride intermembran boşlukta lokalizedir. Yani normal koşullarda kaspaz-9 inaktiftir. Herhangi bir DNA hasarı veya büyüme faktörü azlığı gibi apoptotik uyarı nedeniyle mitokondri zarar görür ve sitozole "sitokrom c" salınır. Sitozolde, "sitokrom c" "Apaf-1" e bağlanır ve

“apoptozom” olarak adlandırılan “Apaf-1 / kaspaz-9” kompleksinin oluşmasına neden olur. Böylece “kaspaz-9” aktive olur ve “kaspaz-3” gibi diğer efektör kaspazları da aktive eder ve hücre ölümü gerçekleşir. “Bcl-2” ailesi üyeleri mitokondri membranına etki ederek mitokondriyal bütünlüğü ve “sitokrom c” salınımını düzenler. “Bcl-2” ailesi üyeleri apoptozu inhibe eder ve “sitokrom c” salınımını önler. Bununla birlikte “Bcl-2” ailesi üyeleri mitokondriyal hasara, “sitokrom c” salınımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olarak hücre ölümüne de neden olabilmektedir. İlginç olarak mitokondriyal hasar sadece “sitokrom c” salımına değil, bununla birlikte apoptozu neden olan başka proteinlerin de salınımına neden olmaktadır. Bunlara örnek olarak “Smac/Diablo” proteini verilebilir. Bu protein kaspaz aktivitesini “IAP” ler ile yarışarak gerçekleştirebilir (41, 43).

2.12.2 Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu

Programlanmış hücre ölümünü birtakım salgılanan polipeptidlerin hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanması ile direkt olarak aktive olur. Bu hücre ölümü sinyal polipeptidleri “**tümör nekroz faktör (TNF)**” olarak isimlendirilen bir protein ailesine aittir. TNF ailesi üyelerinden en iyi tanımlanmış olanlarından biri “Fas” olarak isimlendirilen bir hücre yüzey reseptörüdür. “Fas” reseptörünün immün sistemde hücre ölümünün kontrolünde önemli görevleri bulunmaktadır. Örneğin “Fas” reseptörünün indüklenmesi ile aktive edilen apoptoz immün sistemin, kanser ya da virüs ile enfekte olan, hedef hücrelerinin öldürülmesinden sorumludur. Ayrıca “fas” ligandı immün cevap sonunda fazla lenfositlerin eliminasyonunda da görevlidir.

Hücre ölüm reseptörleri kaspazları direkt olarak aktive ederek apoptozu yol açarlar. TNF ve diğer benzer aile üyeleri üç polipeptid zincirinden oluşur. Reseptöre adaptör bir proteinin bağlanması sonucu reseptörün sitoplazmik kısmına “kaspaz-8” bağlanarak aktive olur. Aktive

“kaspaz-8” molekülleri diğer kaspazları da aktive ederek hücrenin ölümü ile sonuçlanan bir kaspaz kaskatını başlatır.

Kaspaz-8 sadece diğer kaspazları değil “Bcl-2” ailesi üyelerinden biri olan Bid” i de aktive etmektedir. Normal olarak “bid” inaktif formda sitozolde bulunur. Bununla birlikte “kaspaz 8” ile aktive edilmesi sonucu mitokondriye geçer ve membran bütünlüğünü bozarak “sitokrom c” nin sitozole geçmesini sağlar. Bu durum “kaspaz 9” un aktivasyonuna neden olur (43).

2.12.3 Hücre Yaşam Sinyalleri:

TNF ve diğer benzer polipeptidler ile sinyal iletimi hücre ölüm reseptörleri ile indüklenen apoptozda aktif rol almaktadırlar. Hücrenin yaşamına devam etmesinde görevli sinyal yolları ise ekstrasellüler büyüme faktörleri ve hücre-hücre etkileşimleri sayesinde apoptoza karşı savaş vermektedir. Pek çok memeli hücresinde hücreler yaşama devam etme sinyalleri diğer hücreler tarafından baskılandığı zaman apoptoza gitmektedir.

Bir önemli intrasellüler yaşam sinyal yolağı, protein tirozin kinazlar ya da G protein kaplı reseptörler ile aktive edilen enzim PI 3-kinaz ile başlatılmaktadır. PI 3-kinaz membran fosfolipid PIP_2 'yi PIP_3 'e fosforiller. PIP_3 “protein-serin/treonin kinaz” “Akt” ı aktive eder. Sonra “Akt” apoptozu düzenleyen pek çok proteini aktive eder. “Akt” ın bir substratı bir “Bcl-2” ailesi üyesi olan “Bad” dır. Bad (Bid'e benzer olarak) mitokondriden sitokrom c' nin salınmasını sağlayarak hücre ölümünü indükler. Akt tarafından Bad'ın fosforilasyonu sitozolde proteinlerin bağlanma bölgelerini oluşturur. Böylece “Bad” ın mitokondri membranına translokasyonu önlenir. Akt ayrıca hücrenin yaşamının devam etmesi sırasında hedef genlerin ekspresyonunun kontrolünde görevli pek çok transkripsiyon faktörünü de fosforile eder. Ayrıca Akt başka bir protein kinaz olan GSK-3' ü de fosforiller. GSK-3 hedef genlerin transkripsiyon ve translasyonunu

düzenleyerek apoptoza etki eder. PI 3- kinaz / Akt yolağı, IAP'ler ve düzenleyicileri sayesinde hücre yaşamı düzenlenir (41, 43).

Hücre yaşamı sadece PI 3-kinaz/Akt yolağı sayesinde değil, Ras/Raf/ERK yolağı gibi diğer sinyal yolakları ile de düzenlenmektedir. RSK olarak isimlendirilen bir protein kinazın ERK tarafından fosforillenmesi ile de apoptoz inhibe edilmektedir. Akt'a benzer olarak RSK Bcl-2 ailesi üyesi Bad'ı fosforiller. Böylece hücrenin yaşamına devam etmesi için gerekli yaşam sinyalleri PI 3-kinaz / Akt ve ERK yolağı ile sağlanır. Ayrıca ERK ve RSK apoptozu düzenleyen genlerin ekspresyonunu etkileyen transkripsiyon faktörlerini de fosforiller (41, 43).

Projemizde TAF7 geninin apoptoz sürecine olan etkisini incelemek amacıyla RNA interferans tekniğı ile ekspresyonu baskılanmıştır. RNA interferans tekniğı ile ilgili genel bilgi aşağıda verilmiştir.

2.13. RNA Interferans Tekniğı

“Human Genom Project” kapsamında insan DNA sekansının belirlenmiş olması, biyoloji ve tıp bilimi için çok büyük öneme sahip olmakla birlikte pek çok probleme tek başına çözüm olmaktan uzaktır. Gen fonksiyonlarının araştırılmasında kullanılan yöntemlerden birisi işlevi araştırılacak olan geni olmayan genetik olarak oynanmış deney hayvanlarının (Knock out deney hayvanları) oluşturulmasıdır. Bu yöntem in vivo koşullarda gen fonksiyonunun araştırılmasını sağladığı için çok önemli bir yöntemdir. Ancak pahalı ve hücre kültürü seviyesinde kullanılması için pratik değildir. Hücre kültürü seviyesinde gen ekspresyonunun baskılanması protein seviyesinde (monoklonal antikorlar gibi) ya da mRNA seviyesinde gerçekleştirilebilir. mRNA seviyesinde gen sessizlendirilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak:

- Yardımcı proteinler olmadan RNA'nın katalitik olarak parçalanması (ribozimler).

Ribozyme ve deoxyribozymler RNA hidrolizi için katalitik aktivite gösterir.

- mRNA'dan translasyonu protein bağlanması ile bloklayarak (miRNA, AS-RNA, AS-ODN).
- RNA'nın spesifik olarak protein-bağımlı degradasyonunu indüklenerek (siRNA, antisense oligonükleotidleri) verilebilir.

Günümüzde kullanılan mRNA yıkımı stratejileri diziye özgü hedef molekül yıkımına dayanmaktadır. Bu stratejiler DNA/RNA hibridizasyonu sonucu RNase H aktivasyonu ile gerçekleşir ve dubleksin sekansları ile homolog RNA parçalanır. siRNA haricindeki mRNA yıkımına neden olan moleküllerden istenilen sonuçlar elde edilememiş ve sadece zayıf baskılama elde edilebilmiştir.

2.13.1 RNAi Nedir?

“Short interfering RNA” veya “siRNA” olarak isimlendirilen, kısa çift sarmal RNA ile gerçekleştirilen, spesifik gen ekspresyonu inhibisyonuna denir.

siRNA, yaklaşık 25 bp uzunluktadır. 5' fosfat, 3'hidroksil gruplarına ve 3' ucunda 2 - 3 nükleotid çıkıntılara sahiptir. Bunlar RISC' e bağlanmaya yardım eder. siRNA RISC aktivitesi ile tek sarmal hale getirilir ve antisens kol hedef mRNA ile bağlanır ve mRNA yıkılır (46).

2.13.2 RNAi'nin Tarihsel Gelişimi

RNAi tekniği gen fonksiyonunun araştırılması için geliştirilmiş ve tedavi amacıyla kullanılması açısından da umut vaat edici olan, doğal olarak hücrede bulunan, viral enfeksiyonlara karşı korunmada görevli olduğu düşünülen bir mekanizmadır.

RNAi tekniğin başlangıcı 1980'lere dayanmaktadır. İlk önce petünya bitkisinde Renkli çiçekler elde edilmesi amaçlanırken beyaz renkli çiçeklerle karşılaşmış ve çift iplikli RNA

varlığı rapor edilmiştir. Daha mor renkli petunya elde etmeye çalışılırken beklenmedik ters etki (beyaz petunyalara) ile karşılaşmıştır. Bir mor pigment biyosentez geni olan Chalcone sentaz ekspresyonunun over eksprese edilmesi amacıyla oluşturulan transgenik petunya sisteminde, over-eksprese CHS (chalcone synthase) geninin ekspresyonunun baskılanmıştır. Bu mekanizma bir sır olarak kalmış fakat çift iplikli RNA yıkım ürünlerinin post-transkripsiyonel gen sessizlendirmede rolü olduğu düşünülmüştür.

Yaklaşık aynı dönemlerde, 1998 yılında, *Caenorhabditis elegans* alanında da benzer tartışmalar yaşanmaktaydı. Gen ekspresyonu direkt olarak “antisens RNA”nın injeksiyonu ile özgül olarak baskılanabiliyordu; bununla birlikte çok miktarda “antisens RNA” enjekte edildiğinde ise işlem etkisiz oluyordu. Buna ek olarak bitkilerde “antisense karşı kosüpresyon” tartışması sürüp gitmekteydi. Çünkü enjekte edilen “sens” RNA, “antisens” RNA kadar güçlü bir ekspresyon durdurulması oluşturmaktaydı. Çift iplikli RNA’ nın gen ekspresyonunu etkili olarak inhibe etmesi mekanizmasına RNA interferans ismi verilmiştir.

C. elegans’da yapılan araştırmalar bu beklenmedik bulguları anlamak için anahtar olmuştur. *C. Elegans*’dan elde edilen RNAi’nin sens ve antisens RNA ipliklerinden oluşan çift iplikli (ds) RNA’ dan oluştuğu anlaşıldı.

Bitkilerde kosüpresyonun araştırılması için yapılan çalışmalardan elde edilen bir ikinci önemli bulgu ise kosüpresyonun RNA seviyesinde nükleotide özgül olduğudur. “Antisens RNA” nın kosüprese edilmiş RNA’ların yıkımında rehber olabileceği düşünüldü. Antisens RNA için yapılan bir başarısız çalışmada 30 nükleotidden daha uzun çift iplikli RNA memeli hücrelerine transfekte edildiğinde özgül olmayan mRNA degradasyonu ve genel bir translasyon durması ile karşılaşmıştır. Bununla birlikte küçük RNA’lar, 25 nükleotidlik antisens parçaları, kullanıldığında ise etkili gen sessizlendirilmesi. Bu kısa RNA’ların bir çift iplikli RNA prekürsöründen kaynak aldığı düşünüldü. RNAi ile kısa çift iplikli RNA’ların ilişkisi *Drosophila*

melanogaster' de kısa RNA'lar bulunduğunda anlaşılmıştır. Ayrıca bir *D. Melanogaster* çalışmasında kısa RNA'ların bir ribonükleaz kompleksi olan RISC'in hedef RNA'yı tanımada da görevli olduğu anlaşılmıştır (49, 53).

2.13.3 siRNA Oluşturma Yöntemleri:

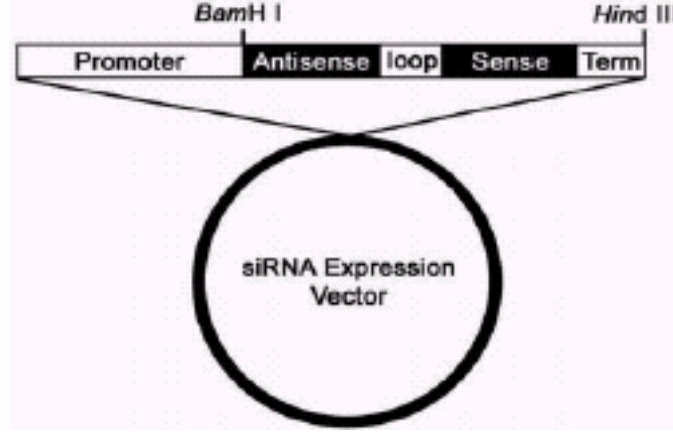
siRNA oluşturma yöntemlerini başlıca iki ana sınıfa ayırabiliriz (54):

- 1 Kimyasal Sentez
- 2 DNA temelli ekspresyon
 - Plasmid temelli vektörler
 - Viral temelli vektörler

Kimyasal sentez ile oluşturulan siRNA oligonükleotidlerinin dizaynı için ekspresyonu baskılanması istenilen geninin başlama kodonundan 50-100 bp aşağıda, yaklaşık 21 nükleotitlik, AA ile başlayıp TT ile sonlanan bir bölge seçilir. Bu bölgenin GC içeriğinin % 30-70 arasında olmasına dikkat edilmelidir. Bu bölgedeki sekans dizisi ile aynı olan çift sarmal RNA molekülü kimyasal olarak sentezlenir. 5' ucuna fosfat, 3' ucuna hidroksil grupları ve 3' ucunda 2 - 3 nükleotid çıkıntıları eklenir (46).

Bu yöntemin pahalı olması ve kalıcı olmaması nedeniyle, vektör ile hücre içerisinde ekspresyon yöntemlerine başvurulmuştur. Plasmid temelli vektörler ve viral temelli vektörler olmak üzere iki tip vektör ile siRNA kodlanabilir. Plasmid temelli vektörler geçici, düşük ve değişken transfeksiyon etkinliğine sahiptir. Plazmid temelli vektörler ile ya iki ayrı (sense ve antisense) kol kodlanır. Transkripsiyondan sonra bu iki kol bir araya gelerek çift sarmal RNA oluşturur; ya da sense ve anti-sense sekansı taşıyan bir "hair-pin" loop kodlanır. İlk önce uzun bir

tek sarmal RNA transkribe olur, sonra katlanır ve küçük saç firketesi (hair-pin) RNA (shRNA) oluşturur. shRNA DICER ile işlenerek bir siRNA oluşturulur (bkz Şekil 9) (46, 54).



Şekil 9 : siRNA eksprese eden vektörler.siRNA ekspresyonu vektöründe iki restriksiyon enzimi kesim bölgeleri (BamH I ve Hind III gibi) arasına antisens ve sens kolları kodlayan siRNA hairpin kaseti yerleştirilir (“Luguan W, Forest YM. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. Bioinformatics, 2004;20:1818-1820” kitabından alınmıştır).

Bundan başka piyasadaki pek çok vektör Pol III promotorlarını (U6, H1 gibi) kullanır. Doğal olarak in vivo’da küçük RNA’lar - tRNA, 5S rRNA, snRNA transkripsiyonunda RNA pol III görevlidir. Pol III vücuttaki tüm hücrelerde aktiftir. Pol II promotör-temelli plasmid vektörleri yeni bir trenddir. Pol II tüm hücrelerde aktif değildir. Pol II’den transkripsiyonun başlaması için bir takım transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle doku spesifik gen sessizlendirmede kullanılabilir.

Plasmid kökenli vektörlerin yanında viral temelli vektörler de kullanılmaktadır. Viral temelli vektörler çok etkili sistemlerdir. Fakat viral olması nedeniyle uygun laboratuvar

biyogüvenliğinin sağlanamadığı durumlarda tehlikeli olabilirler. Adenovirus ve lentivirus gibi virüsler kullanılabilir. Lentivirus ile stabil hatlar oluşturulabilir. İn vivo’da kullanılabilme avantajları bulunmaktadır (46, 49).

Tablo 1: siRNA oluşturma yöntemlerinin birbirleriyle karşılaştırılması

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ	SÜRE
Çift sarmal RNA’nın enzimatik olarak parçalanması	Ucuz	Homolog genlerde çapraz sessizlendirme meydana gelebilir	Geçici
	Etkili molekül İzlenemez		
Kimyasal sentez	Büyük miktarlarda üretilebilir.	Pahalı	Geçici
	Baz modifikasyonları yapılabilir.	Efektör molekülün izlenmesi gerekli	
İn vitro Transkripsiyon	Ucuz	Efektör molekülün izlenmesi gerekli	Geçici
Hairpinin invitro Transkripsiyonu	Ucuz	Efektör molekülün izlenmesi gerekli	Geçici
		Plazmit DNA transfeksiyonu geçicidir.	
		Efektör molekülün izlenmesi gerekli	
Viral Yöntem	Ucuz	Tehlikeli	Stabil

2.13.4 RNAi mekanizması:

RNAi mekanizması ile çift iplikli RNA sayesinde RNA’nın homolog olduğu genin ekspresyonu durdurulabilmektedir. RNAi evrimsel olarak korunmuştur. Hücre içerisine viral enfeksiyon gibi bir nedenle uzun çift iplikli RNA girdiği zaman “Dicer” enzimi ile etkileşime girerek 21-23 nükleotid uzunlukta, 3’ uçlarında iki nükleotidlik çıkıntılı çift iplikli RNA

parçalarına ayrılırlar. Bu parçalar “small interfering RNA” (siRNA) olarak isimlendirilir. . Dicer, dsRNA bağlama bölgesi içeren bir RNase III ailesi üyesidir. RNAi ile gen ekspresyonu sessizlendirmesinde küçük RNA’ların anahtar rol üstlenmesinin bulunması bu işlemin doğal rolünün de anlaşılmasını sağlamıştır. siRNA’lar ile birlikte olan pek çok farklı proteinler de tanımlanmıştır. siRNA hücre içerisinde RISC enzim kompleksi ile etkileşime girer ve tek iplikli hale getirilir. siRNA/RISC kompleksi komplementer olduğu mRNA’ya bağlanarak mRNA’yı degrades eder. Böylece mRNA seviyesinde gen ekspresyonunun sessizlendirilmesi sağlanır.

dsRNA’nın işlenmesi ve RISC’in oluşması için ATP. Bazı durumlarda RNA – bağımlı RNA polimeraz da rol oynamaktadır. RNA – bağımlı RNA polimeraz tek iplikli RNA’yı çift iplikli siRNA prekürsörüne çevirir (48).

2.13.5 RNAi Mekanizması Oyuncuları:

DICER: RNase III enzim ailesindedir. dsRNA’ yı siRNA’ a dönüştürür. Her dicer enzimi bir aminoterminal helikaz bölgesine, iki RNase III katalitik bölgesine ve bir dsRNA bağlama bölgesine sahiptir. Dicer iki enzim dimeri olarak düşünülür.

siRNA’in 25 bp uzunlukta olduğunu biliyoruz. dsRNA parçalanması RNase III’ün katalitik domainleri sayesinde olur. Tek bir dicer enzimi dsRNA’i 12-13 bp’lik fragmentlere ayırır. Bir dicer enzimi dimerinde ise yan yana iki katalitik bölge non-fonksiyonel olur ve kalan katalitik bölgeler 25 bp uzunlukta parçalar oluşturacak şekilde kesim yapar (52).

RISC (RNA-induced silencing complex):

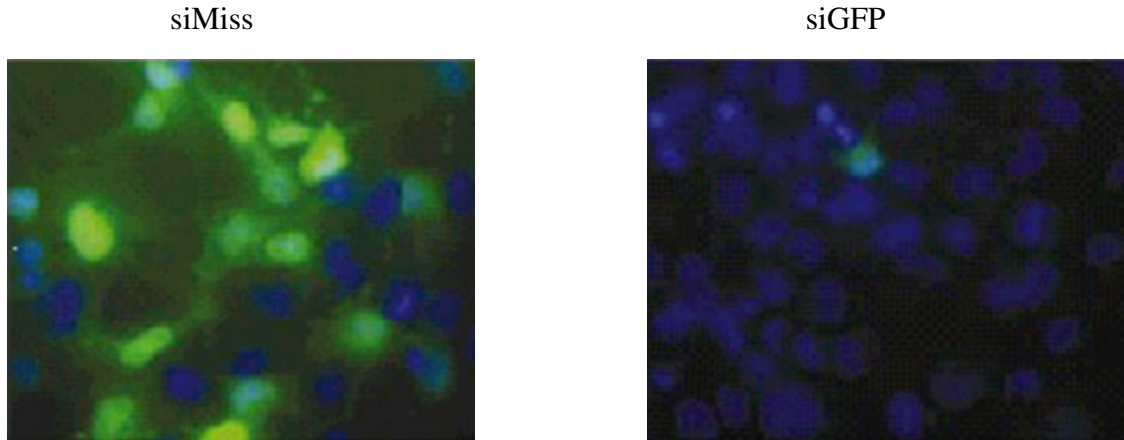
RISC’in komponentleri hala bilinmemektedir. İki RNA’ya bağlanan protein siRNA’ ya bağlanır. RNA/DNA Helikaz aktivitesine sahiptir. siRNA’i tek sarmal hale getirir. Translasyon

başlatıcı faktör olma özelliği vardır. Bu komponentte meydana gelen mutasyonlar başlangıç basamağını etkiler. Aynı zamanda bir RNA-Bağımlı RNA polimeraz olma özelliği vardır. Bu özellik sadece c.elegans'da gösterilmiştir. (Sistemik RNAi yayılmasının gösterildiği tek hayvandır). Sessizlendirme etkisinin çoğaltılmasının tetiklenmesinde önemli bir rol oynar (52).

2.13.6 RNAi'nin Memeli Hücrelerine Uyarlanması:

Uzun RNAi memeli hücrelerinde antiviral savunma mekanizmasını aktive eder ve spesifik olmayan gen sessizlendirilmesine ve hücrede protein sentezinin genel olarak kaybına yol açar. Kısa (25 bp'lik) RNAi'ler (siRNA) spesifik gen sessizlendirilmesini sağlar (52, .53, 54).

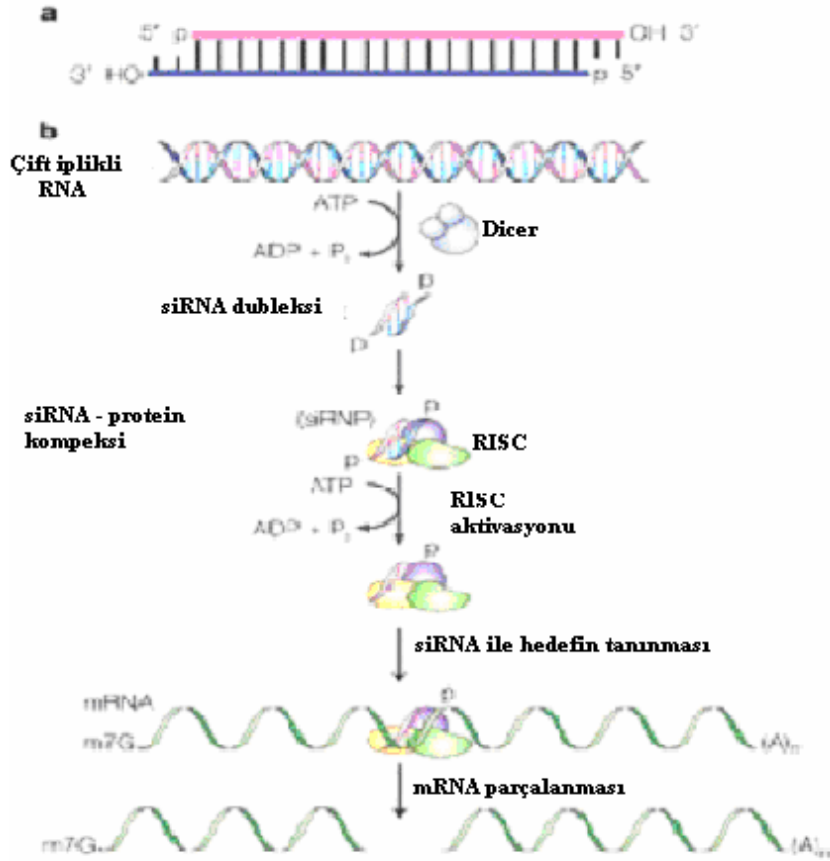
Şekil 10' da GFP proteinlerinin memeli hücrelerinde RNAi tekniği ile baskılanması görüntüsü verilmiştir



Şekil 10: GFP ekspresyonunun RNAi ile baskılanması: Şekiller GFP ve siRNA ekspresyon vektörü ile transfekte Cos-7 hücrelerini gösterir. Solda GFP ekspresyonu baskılanamayan, yanlış hedeflenmiş siRNA'leri içeren (siMiss) negatif kontrol, sağda ise GFP ekspresyonu siRNA ile etkili olarak baskılanan hücreler (siGFP) görülmektedir

(<http://www.ambion.com/techlib/presentations/ExpVectors.pdf> adresinden alınmıştır).

Hücre içerisinde viral enfeksiyon gibi herhangi bir nedenle çift sarmal RNA bulunması RNAi cevabına neden olmaktadır. Sonuç olarak çift sarmal RNA ve komplementer mRNA yıkılır. Böylece viral gen ekspresyonu sessizlendirilir. RNA induced silencing complex (RISC) aktivasyonu mRNA ile birleşmeye ve hedef transkriptin degradasyonuna neden olur (Bkz şekil 11) (50, 55, 56).



Şekil 11. Hücre içerisinde RNA interferans mekanizması

(<http://www.theses.ulaval.ca/2003/21404/ch03.html#d0e2100> adresinden alınmıştır).

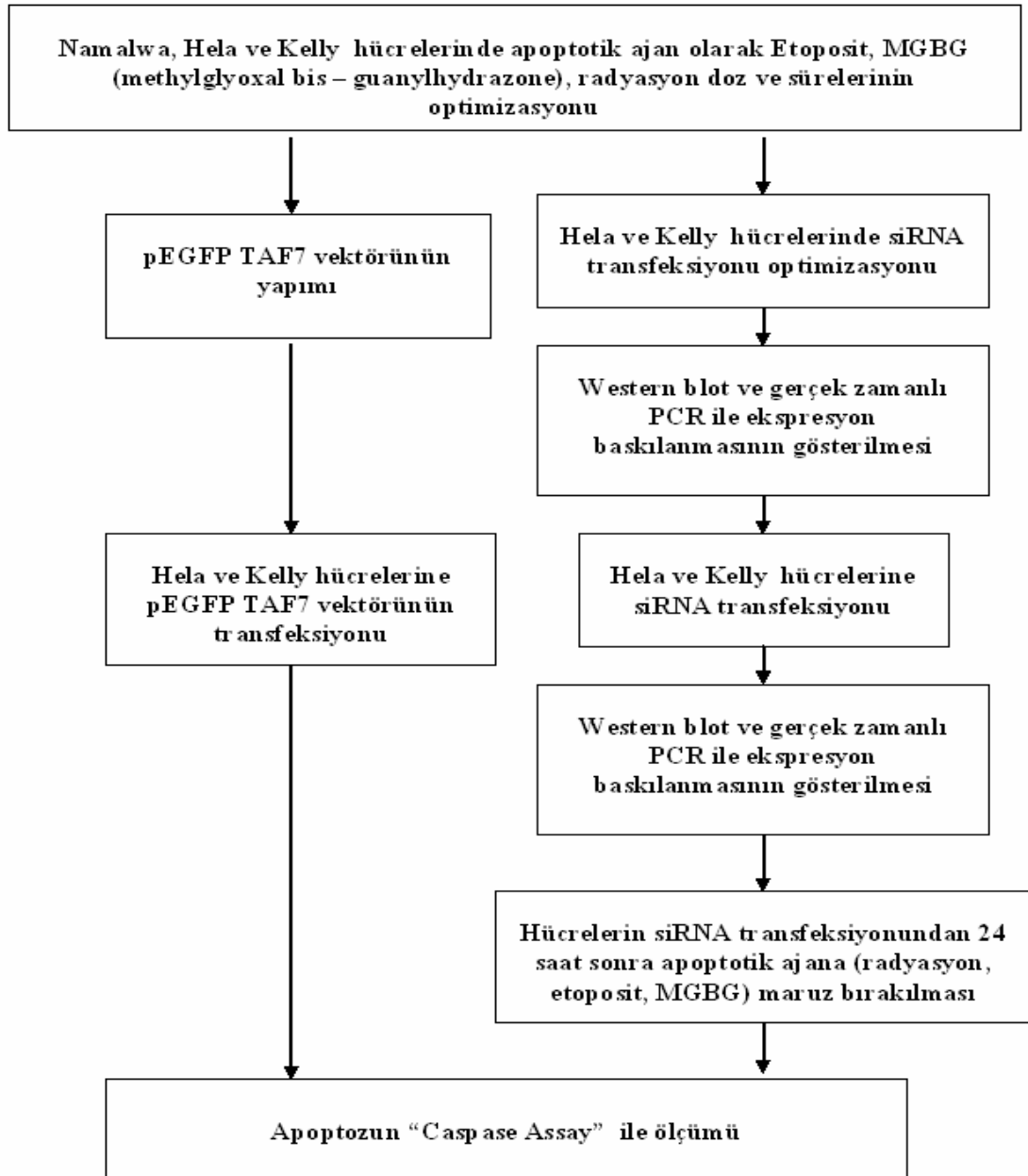
2.13.7 Gen Sessizlendirme Belirleme Yöntemleri:

- **Western Blot:** Protein düzeyinde ekspresyon azalmasının kontrolü için kullanılır. Ayrıntılı olarak gereçler ve yöntem bölümünde anlatılacaktır.
- **Flow Sitometri:** Hücrelerin fiziksel ya da kimyasal özelliklerinin ölçülmesidir. Hücre ya da partiküller bir sıvı akımında tek tek ilerlerken ölçümleri yapılır. Elektriksel ya da mekanik yöntemler ile hücreler birbirinden ayrılır ve kullanıcı tarafından istenilen özellikleri ölçülür.
- **İmmüno Floresans:** Hücrelerin katı bir desteğe (lamel gibi) tutundurulup, ilgilenilen protein floresans işaretli antikor ile boyanması esasına dayanır. Ayrıntılı olarak gereçler ve yöntem bölümünde açıklanacaktır.
- **Northern Blot:** RNA düzeyinde ekspresyon azalmasının kontrolü için kullanılır
Basamakları:
 - RNA izolasyonu
 - Prop tasarımı
 - Denatüre agaroz jel elektroforezi (Formaldehit gibi denaturant ajan içerir).
 - Katı desteğe transfer ve immobilizasyon
 - Prob ile hibridizasyon
 - Yıkama
 - Deteksiyon
- **Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu:** RNA düzeyinde ekspresyon azalmasının kantitatif kontrolü için kullanılır. Ayrıntılı olarak gereçler ve yöntem bölümünde anlatılacaktır (50).

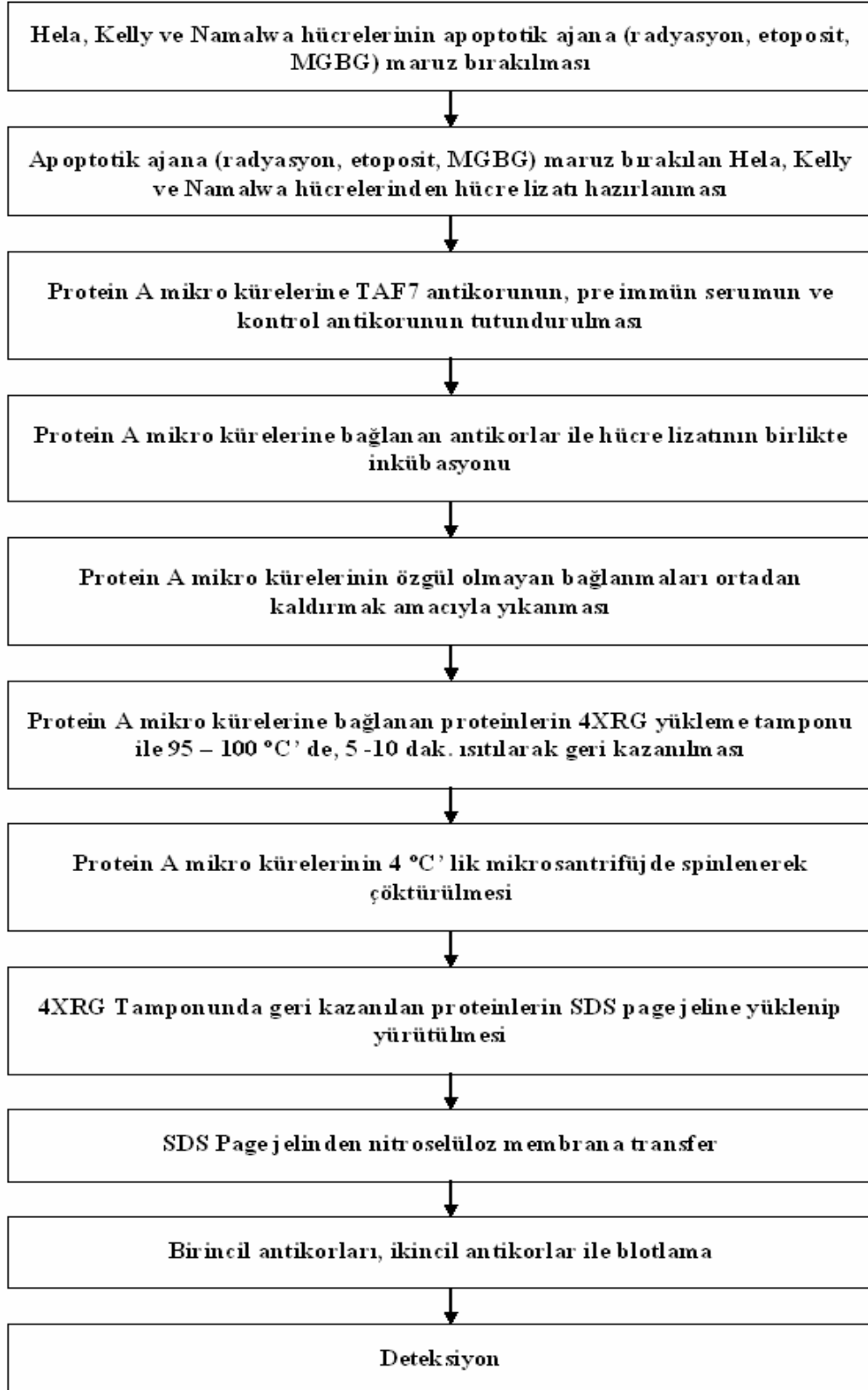
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre hatlarında TAF7 gen ekspresyonunun RNA interferans tekniği ile baskılanmasının apoptoz sürecine olan etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmaların akış şeması aşağıda verilmiştir:

A) Apoptoz Deneylelerinin Akış Şeması:



B) İmmün Presipitasyon Deneylerinin Akış Şeması:



3.1.HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Projede Namalwa, Kelly ve HeLa hücre hatları kullanılmıştır. TAF7 geninin “B” hücreleri-nde ve sinir sisteminde ekspresyonu fazla olması nedeniyle “Namalwa” ve “Kelly” hücre hatları, bir alternatif olarak da “HeLa” hücre hattı tercih edilmiştir.

Gereçler:

- 1 Pipet pompası (Greiner Labortechnik 000424NS – 9)
- 2 İverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)
- 3 10 ml. lik ve 5 ml. lik steril pipetler.
- 4 25 cm², 75 cm², 125 cm² lik filtreli flasklar
- 5 CO₂’ li inkübatör.
- 6 DMEM ve RPMI 1640 besi ortamları.
- 7 L glutamin
- 8 FBS (Fetal bovine serum)
- 9 Penisilin/streptomisin

Besi Ortamı Hazırlanması:

500 ml.’ lik DMEM ya da RPMI besi ortamı içerisine 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml. konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve % 15 oranında FBS eklenir.

3.1.1 Namalwa Hücre Hattı:

Namalwa hücre hattı (ATCC# CRL 1432), Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof Dr İhsan GÜRSEL tarafından sağlanmış, insan Burkitt Lenfoma hücrelerinden elde edilmiş bir “B hücre” hattıdır. Kültürde süspansiyon olarak üreyen hücrelerdir. İnkübe süreleri 20 – 30 saattir. Hücre kültüründe %5 CO₂’li ve 37 °C’lik ortamda RPMI 1640 besi ortamı (Biochrom AG - FG 1385) + %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom,

S0125), ile üretildiler. 1 ml.'deki hücre sayısı $0,5 - 1,5 \times 10^6$ 'da sabit tutulmak üzere 2 – 3 günde bir 1/2 veya 1/3 oranında pasajları yapıldı. Hücre sayı ve canlılığı tripan mavisi canlılık testi ile belirlendi.

3.1.2.Kelly Hücre Hattı:

Kelly hücre hattı (ATCC# HTB 18), Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma görevlisi Nevin Aygün tarafından, Yrd. Doç. Dr Oguz Altungöz' ün izniyle sağlanmıştır. Kelly, insan nöroblastom hücrelerinden elde edilmiş hücre hattıdır. Yüze tutunarak monolayer halde üreyen hücrelerdir. İkenme süreleri 30 – 40 saattir. Hücre kültüründe %5 CO₂'li ve 37 °C'lik ortamda RPMI 1640 besi ortamı (Biochrom AG - FG 1385) + % 15 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), ile üretildiler. Hücreler kültür kabının yüzeyini % 70 oranında kapladıkça pasajları yapıldı.

3.1.3. HeLa Hücre Hattı

HeLa hücre hattı (ATCC# CCL 2), Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr Kemal Korkmaz tarafından sağlanmıştır. HeLa, insan serviks karsinoma hücrelerinden elde edilmiş bir hücre hattıdır. Yüze tutunarak monolayer halde üreyen hücrelerdir. Hücre kültüründe %5 CO₂'li ve 37 °C'lik ortamda DMEM besi ortamı (Biochrom AG - FG 0415) + %15 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), ile üretildi. Hücreler kültür kabının yüzeyini %70 oranında kapladıkça pasajlandılar.

3.2.TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ

Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisi boyasını geçirmezler. Fakat ölü hücrelerin membran bütünlükleri bozulduğu için boyayı geçirir. Bu testte bir hücre süspansiyonu tripan mavisi ile karıştırılır ve hücrelerin boyayı alıp almadığı mikroskopta kontrol edilir. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplâzmaya sahip olarak görülürken, ölü hücreler ise mavi sitoplâzmalı olarak görülür.

Gereçler:

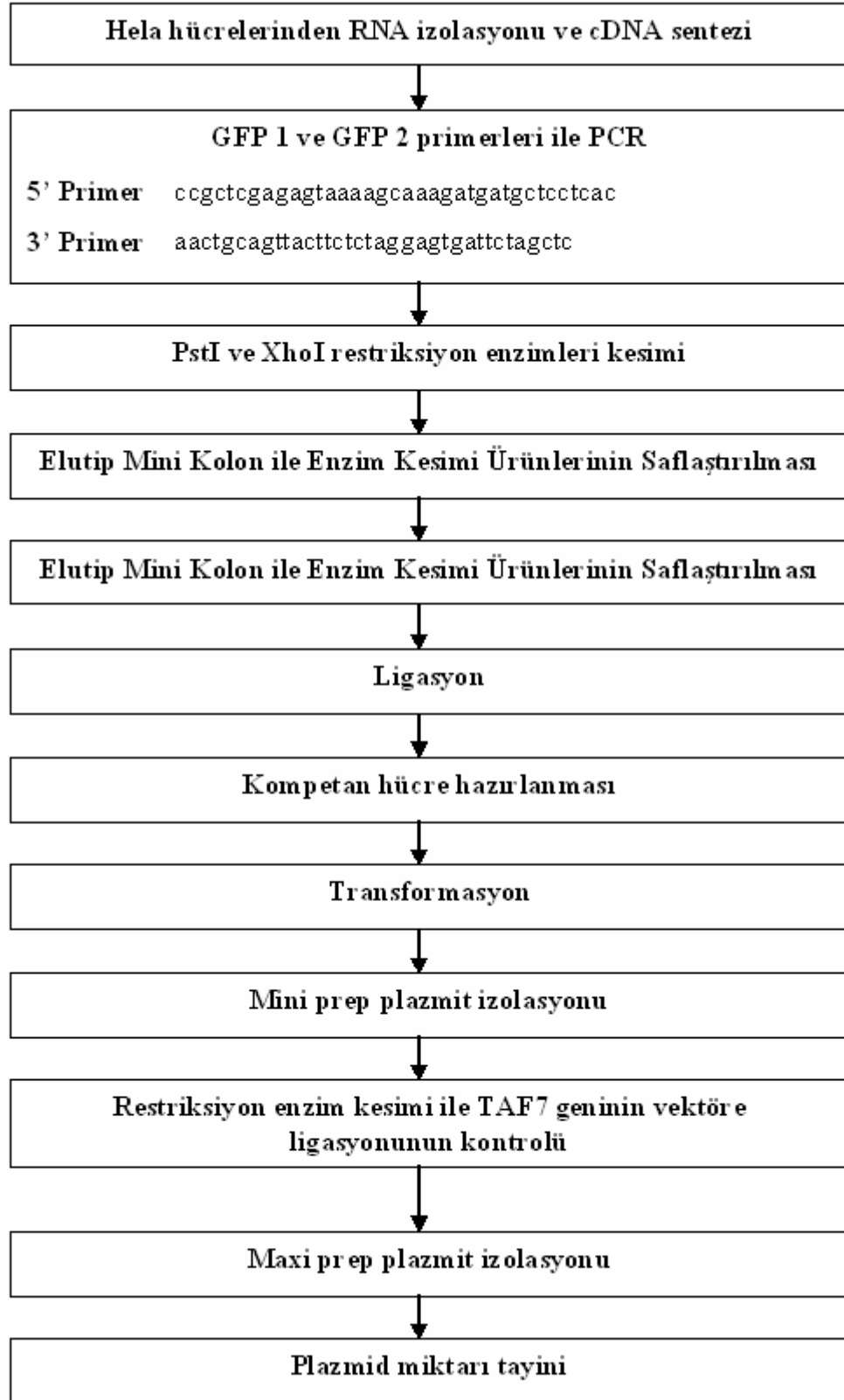
1. Tripan mavisi %0,5 (Biological Industries – Lot 420488)
2. 0,5 ml hücre süspansiyonu
3. Neubauer lamı (Marienfeld – Ref 0610110, Lot 409104)
4. 20’lik ve 1000’lik pipet (ependorf 273747, 1854995) ve pipet ucu (Greiner bio – one FT 20 E, G)
5. Mikrosantrifüj tüpü
6. İverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)

Yöntem:

- 1 Süspanse hücre kültüründen 0,5 ml örnek alındı.
- 2 1:1 Oranında tripan mavisi ve PBS bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
- 3 Tripan mavisi + PBS karışımından 0,5 ml alınıp 0,5 ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı.
- 4 Neubauer lamının kenarlarına 1’er damla su damlatılıp üzerine lamel kapatıldı.
- 5 Lamel ile lam arasındaki boşluktan 10 µl tripan mavisi + hücre karışımından eklendi.
- 6 Işık mikroskobunda 10 X objektifte sayım yapıldı.
- 7 Mavi boyayı almamış olan hücreler canlı, almış olanlar ise ölü olarak değerlendirildi.
- 8 Canlı hücre sayısı = 1 büyük karede sayılan canlı hücre x dilüsyon faktörü x 10^4 formülü ile belirlendi.

3.3. pEGFP – TAF7 VEKTÖRÜNÜN HAZIRLANMASI:

pEGFP – TAF7 ekspresyon vektörü bölümümüz yüksek lisans öğrencilerinden Melek Pehlivan tarafından, Yrd. Doç. Dr Esra ERAL’ ın “Moleküler Biyoloji’ de Özel Konular” dersinde hazırlanmış olup tarafımıza hediye edilmiştir. pEGFP – TAF7 ekspresyon vektörünün hazırlanması için Melek Pehlivan tarafından yapılan çalışmaların akış şeması aşağıda verilmiştir.



DNA Miktar Tayini:

İzole edilen plazmidin 1/250 oranunda dilusyonu yapıp, spektrofotometre (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) ile 260 ve 280 nm de absorbansları ölçüldü.

$A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 50 \mu\text{g/ml}$ formülü ile konsantrasyonları hesaplandı.

A_{260} / A_{280} oranının 1.8 ile 2.0 arasında olması DNA'nın saf olduğunun göstergesidir.

A_{260} / A_{280} oranı hesaplanarak DNA'nın saflık derecesi belirlendi.

3.4.pEGFP - TAF7 VEKTÖRÜNÜN HÜCRE HATLARINA TRANSFEKSİYONU:

pEGFP - TAF7 vektörünün hücre hatlarına transfeksiyonu için FUGENE (Roche – Diagnostics) kiti kullanılmıştır. FUGENE kiti lipozom temelli bir transfeksiyon kitidir. Transfekte edilecek olan plazmid DNA' sı lipozomlar içerisine alınır. Sonra bu lipozomların kültür ortamına verilerek, hücre membranı yapısına katılmaları sağlanır; Bu şekilde içerdikleri plazmidlerin hücre içerisine girmesi sağlanmaktadır.

pEGFP - TAF7 vektörünün hücre hatlarına transfeksiyonu deneyi için üçer adet altı gözlü plate gözünden oluşan aşağıdaki transfeksiyon grupları oluşturulmuştur:

- **Normal kontrol:** Hiçbir işlem uygulanmayan gruptur.
- **Lipid kontrol:** Sadece Fugene uygulanan fakat plazmit kullanılmayan gruptur.
- **Plazmid kontrol:** Boş pEGFP plazmidi ile transfeksiyonu yapılan gruptur.
- **pEGFP – TAF7:** pEGFP – TAF7 plazmidinin transfeksiyonu yapılan gruptur.

Bu gruplara transfeksiyon yapıldıktan 24 saat sonra, bölüm 7' de anlatıldığı gibi kaspaz assay ile apoptotik davranışları ölçülmüştür.

Gereçler:

- Fugene kiti (Roche, - Cat. No. 11 815 091 001)
- Serumsuz ve antibiyotiksiz besi ortamı
- 6 gözlü plate
- CO₂' li inkübatör
- %15 oranında FBS eklenmiş DMEM/RPMI besi ortamı
- 5 ml.'lik ve 10 ml.' lik pipetler.
- 1000 ve 100 µl.' lik otomatik pipet ve pipet uçları.

Yöntem:

- 97 µl serumsuz besi ortamına 3 µl Fugene eklenir.
- 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Fugene/besi ortamı karışımına 1 µg plazmid eklenir ve karıştırılır. Tüpün kapağı kapatılıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Hücre kültürleri üzerindeki ortam 900 µl yeni serumlu ortam ile değiştirilir.
- Serumsuz ortam/DNA/Fugene karışımı hücre kültürlerine eklenir.
- Bir gece 37 °C' de CO₂' li inkübatörde inkübe edilir.
- Ertesi gün ortamları değiştirilir.

3.5.RNA İNTERFERANS TEKNİĞİ İLE HÜCRE HATLARINDA TAF7 EKSPRESYONUNUN AZALTILMASI:

3.5.1. siRNA Dizilerinin Belirlenmesi:

Ekspresyonunun baskılanması istenilen geninin mRNA sekansında, start kodonundan 50-100 bp aşağıda, yaklaşık 21 nükleotitlik, AA ile başlayıp TT ile sonlanan bir bölge seçilir. Bu bölgenin GC içeriğinin % 30-70 arasında olmasına dikkat edilmelidir. Bu bölgedeki sekans dizisi ile aynı olan çift sarmal RNA molekülü kimyasal olarak sentezlenir. 5' ucuna fosfat, 3' ucuna hidroksil grupları ve 3' ucunda 2 – 3 nükleotid çıkıntıları eklenir. Dizi, manüel olarak belirlenebileceği gibi web temelli siRNA dizayn programlarından da yararlanılabilir.

Bir siRNA oligonükleotidi tek başına ortalama %50 oranında sessizlendirme sağlayabilirken dört farklı siRNA oligonükleotidi birden hücreye transfekte edildiğinde ekspresyon sessizlendirme oranı % 75 – 95' lere kadar çıkabilmektedir. Bu nedenle araştırmalarda 2- 4 adet siRNA' nın belirlenmesi önerilmektedir.

3.5.2. siRNA Transfeksiyonu:

Projemizde TAF7 ekspresyon baskılanması için dört adet siRNA kullanılmıştır. Bunlardan üç tanesi (TAF7-1, 2, 3) Dharmacon firması tarafından tasarlanmış siRNA kütüphanesinden temin edilmiştir. % 80 oranında baskılanma sağladığı deneylerle belirlenmiş olan bir siRNA oligonükleotid dizisi (TAF7-D) ise Dinah Singer laboratuvarı, Deneysel İmmünoloji Dalı, NCI, NIH'de tasarlanmıştır. TAF7' nin baskılanmasına özgü siRNA dizilerinin yanı sıra aşağıda açıklanan kontrol siRNA'ları da kullanılmıştır.

- DHARMACON siCONTROL LAMİN A/C siRNA İnsan/Fare (Cat # D-001050-01) (5 nmol): İnsan ve fare LAMİN A/C genine özgüdür. Transfeksiyonun pozitif kontrolü olarak, LAMIN A/C geninde baskılanmaya yol açıp açmadığı kontrol edilir.
- DHARMACON siCONTROL Non Targetting siRNA (Cat #D-001210-02) (5 nmol) (Negatif kontrol) : Hiçbir genin RNA' sının hedef almayan siRNA' lardır. Bu nedenle hücre içerisine gönderildiğinde ekspresyon düzeyi azalması beklenmez.
- DHARMACON siCONTROL RISC-İçermeyen siRNA (Cat #D-001220-01) (5 nmol) (Negatif kontrol): Hücre içerisine gönderildiğinde RISC ile etkileşime girmeyen siRNA' lardır. Bu nedenle hücre içerisine gönderildiğinde ekspresyon düzeyi azalması beklenmez.
- DHARMACON siCONTROL siGLO RISC-İçermeyen siRNA (Cat#D-001 600-01) (5 nmol) (Pozitif transfeksiyon kontrolü): Floresan işaretli RISC – İçermeyen siRNA' lardır. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin görsel kontrolü için kullanılmıştır. siGLO transfeksiyonu yapıldıktan sonra hücrelerin nükleusları DAPI ile boyanıp, floresan mikroskobunda incelenmişlerdir.

Projemizde siRNA transfeksiyonu için bir lipozom temelli tansfeksiyon ajanı olan DHARMAFECT kullanılmıştır.

Gereç:

- DHARMACON siGENOME duplex TAF7 (Cat # D-013669-01) (10 nmol)*
- DHARMACON siGENOME duplex TAF7 (Cat # D-013669-02) (10 nmol)*
- DHARMACON siGENOME duplex TAF7 (Cat # D-013669-03) (10 nmol)*

* DHARMACON siGENOME duplex Taf7 siRNA' ları Dharmacon tarafından dizayn edilmiş siRNA kütüphanesinden temin edilmiştir. Baz dizilimini bildirmek için ek ücret talep edilmektedir. Projeden bu kalem için bütçe ayıramadığımız için baz dizilimini verememekteyiz.

- DHARMACON TAF7 hazır siRNA A4 (UUAGUAGACCUGCCCCUGUGUU) (TAF7-D) (75 nmol)
- DHARMACON siCONTROL Lamin A/C siRNA İnsan/Fare (Cat #D-001050-01) (5 nmol) (Pozitif kontrol)
- DHARMACON siCONTROL Non Targetting siRNA (Cat #D-001210-02) (5 nmol) (Negatif kontrol)
- DHARMACON siCONTROL RISC-İçermeyen siRNA (Cat #D-001220-01) (5 nmol) (Negatif kontrol)
- DHARMACON siCONTROL siGLO RISC-İçermeyen siRNA (Cat#D-001 600-01) (5 nmol) (Pozitif transfeksiyon kontrolü)
- DHARMACON 5X siRNA Tamponu (Cat #B-002000-UB-015)(siRNA' lar ile birlikte Dharmacon arafından gönderilmiştir)
- DHARMAFECT Transfeksiyon Lipozomları 1 (Cat#T-2001-03)

Yöntem:

siRNA Cözetilerinin Hazırlanması:

Dharmafect lipozom kitiyle birlikte gelen 5X siRNA tampon üzerine 4 katı hacimde RNAase içermeyen su eklenerek 1 X siRNA tamponu hazırlandı. (200 µl 5X siRNA tampon üzerine 800 µl RNAase içermeyen su eklenir).

5 nmol siGLO üzerine 1 ml 1 X siRNA tampon eklenerek 5 µM siRNA çözeltisi hazırlandı.

5 nmol DHARMACON siCONTROL' ler üzerine 200 µl 1X siRNA tamponu eklenerek 25 µM siRNA çözeltisi hazırlandı.

10 nmol DHARMACON siGENOME duplex TAF7' ler üzerine 400 µl 1X siRNA tamponu eklenerek 25 µM siRNA çözeltisi hazırlandı.

75 nmol DHARMACON TAF7 Custom siRNA A4 üzerine 1500 µl 1X siRNA tamponu eklenerek 50 µM siRNA çözeltisi hazırlandı.

siRNA çözeltileri alikatlanarak -80°C' ye kaldırıldı.

siRNA' ların Ana Karışımlarının Hazırlanması:

Son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde TAF7-D siRNA, 250' şer nM olacak şekilde siCONTROL siRNA' lar, 50' şer nM olacak şekilde siGENOME dupleks TAF7' ler serumsuz ve antibiyotiksiz ortama eklendi. Aşağıda son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde TAF7-D siRNA ve 50' şer nM olacak şekilde siGENOME dupleks TAF7 ana karışım ve son konsantrasyonu 250 nM olacak şekilde siCONTROL ana karışım hazırlama örnekleri verilmiştir.

TAF7 Ana Karışımı Hazırlanması Örneği:

$$25 \mu\text{l} \times 1 \mu\text{M} = X \times 50 \mu\text{M}$$

$$X = 0,5 \mu\text{l}$$

0,5 µl 50 µM TAF7-D siRNA çözeltisi ve

$$25 \mu\text{l} \times 0,5 \mu\text{M} = X \times 25 \mu\text{M}$$

$$X = 0,5 \mu\text{l}$$

0,5' er µl 25 µM siGENOME duplex TAF7 çözeltileri karıştırılıp, üzerine 22,9 µl serumsuz ve antibiyotiksiz ortam eklenerek 2,5 µM siRNA konsantrasyonunda master mix hazırlandı.

siCONTROL Ana Karışımı Hazırlanması Örneği:

$$25 \mu\text{l} \times 2,5 \mu\text{M} = X \times 25 \mu\text{M}$$

$$X = 2,5 \mu\text{l}$$

2,5 µl 25 µM siCONTROL siRNA çözeltilerinden 22,5 µl serumsuz ve antibiyotiksiz ortama eklenerek 2,5µM siRNA konsantrasyonunda master siCONTROL mix hazırlandı.

Dharmafect Dilüsyonlarının Hazırlanması:

1:2 Dilüsyonu :

Eşit hacimde Dharmafect ile serumsuz ortam karıştırıldı.

1:4 Dilüsyonu:

Eşit hacimde 1:2 dilüsyon ile serumsuz ortam karıştırılır.

1:8 Dilüsyonu:

Eşit hacimde 1:4 dilüsyon ile serumsuz ortam karıştırılır.

Transfeksiyon Karışımı Hesapları:

Tablo 1' de anlatıldığı oranlarda transfeksiyon ortamları hazırlandı. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hacimleri 250 şer µl' ye serumlu ve antibiyotiksiz ortam ile tamamlandı. Hücre kültürlerindeki besi ortamı çekilip üzerine eklendi (51).

Tablo 2: Transfeksiyon ortamı hazırlamak için gerekli hacimler

	Serumsuz Ortam	Lipit	siRNA ANA KARIŞIMI	Son Hacim
1	50 µl	-	-	50 µl
2	25 µl	-	25 µl	50 µl
3	22,5µl	2,5µl 1:2	25 µl	50 µl
4	22,5µl	2,5µl 1:4	25 µl	50 µl
5	22,5µl	2,5 µl 1:8	25 µl	50 µl
9	25 µl	-	-	50 µl
11	22,5µl	2,5 µl 1:2	-	50 µl
12	22,5µl	2,5 µl 1:4	-	50 µl
13	22,5µl	2,5 µl 1:8	-	50 µl

3.5.3.siGLO RISC İçermeyen siRNA Transfeksiyonu:

siGLO; floresan işaretli, RISC içermeyen siRNA' lardır. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin görsel kontrolü için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Transfeksiyon yapılacak olan hücreler bir gün önceden lamel üzerine ekilmiştir. siGLO ve lipid transfeksiyonu yapılmış ve normal (hiçbir işlem uygulanmamış) olan hücreler transfeksiyon yapıldıktan 24 saat sonra, nükleusları DAPI ile boyanıp, floresan mikroskobunda incelenmişlerdir.

Gereç:

- Altı gözlü plate
- Hücre kültürüne uygun hale getirilip, sterilizasyonu yapılmış 22 x 22 mm.' lik lameller.
- Steril penset
- Neubauer lamı (Marienfeld – Ref 0610110, Lot 409104)
- HeLa hücre hattı
- Dharmafect Transfeksiyon Lipozomları 1 (Cat#T-2001-03)
- siGLO flüoresan işaretli RISC içermeyen siRNA

- Otomatik pipet ve pipet uçları
- Lamel yıkama solüsyonu (194 ml %70. lik etanol + 6 ml HCl)

Yöntem:

Hücre Kültürüne Uygun Lamel Hazırlanması:

- 22 x 22 lik ya da 24 x 24 lük 5 kutu lamel bir beher içerisine alınıp üzerine yıkama solüsyonu eklenir.
- Beherin ağzı parafilmleir. Bir gece bekletilir.
- Ertesi gün 1-2 saat akan çeşme suyu altında bekletilir.
- 10 defa distile sudan geçirilir.
- Son kez 18 ohm luk distile sudan geçirilir.
- Moleküler Biyolojik teknikler için uygun (Merk) metanolden iki kez geçirilir.
- Penset yardımıyla kurutma kâğıdı üzerine tek tek alınır.
- Kurutulur.
- Bir petri kabı içerisinde, otoklavda 121 °C' de 15 dak. sterilize edilir.

Hücrelerin Lamel Üzerine Ekilmesi:

- Steril penset yardımı ile altı gözlü plate' in her bir gözüne birer adet lamel alınır.
- HeLa hücreleri tripsinizasyon ile flask yüzeyinden kaldırılır. Bir miktar (500 – 1000 µl) hücre süspansiyonundan örnek alınır.
- Tripan mavisi ve Neubauer lamı ile canlılık testi ve hücre sayımı yapılır.
- Lameller üzerine 250' şer bin hücre düşecek hacimde hücre ekimleri yapılır.
- Bir gece 37 °C' de %5 CO₂' li inkübatörde inkübe edilirler.

siGLO Ana Karışımı Hazırlanması Örneği:

$$50 \mu\text{l} \times 1 \mu\text{M} = X \times 5 \mu\text{M}$$

$$X = 10 \mu\text{l}$$

10 μl 5 μM siGLO siRNA çözeltilerinden 40 μl serumsuz ve antibiyotiksiz ortama eklenerek 1 μM siRNA konsantrasyonunda ana siGLO karışımı hazırlandı. Tablo 1' de anlatıldığı gibi hazırlanan ½ dilüsyon lipid karışımı ile eşit hacimde (50 μl) karıştırılıp 30 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi.

Transfeksiyon Ortamı Hazırlanması :

Bu karışım 200 μl serumlu ortama eklendi. Transfeksiyon yapılacak olan lameller üzerindeki besi ortamı çekilip atıldı. Lameller üzerine 500' er μl transfeksiyon karışımından eklendi. 37 °C' de %5' lik CO₂' li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

DAPI İle Boyama:

Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler fiske edilip, DAPI ile boyandılar.

- Beher bardaklarına PBS ve metanol eklendi.
- Lamel iğne ucu ile kaldırıp, penset yardımıyla PBS' e daldırıldı.
- 3 Dakika metanol içerisinde bekletildi.
- PBS içerisinde 5–10 dak. yıkandı.
- 1/4000 oranında dilüe edilen DAPI (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda) lamelin üzerini kaplayacak miktarda hücrelerin üzerine eklendi. 1 dakika bekletildi.
- PBS ile yıkandı.
- Lamel hücrelerin bulunduğu yüzey alta gelecek şekilde lam üzerine kapatıldı.

- Flüoresans mikroskopunda (Nikon Y- FL 074778) dapi (NP 16), rhodamin/texas red (ND8) ve FITC (ND4) filtreleri ile incelendiler.

3.6. HÜCRE HATLARINDA siRNA ile BASKILANMIŞ TAF7 EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ:

siRNA ile transfeksiyon işlemi ardından TAF7 geninin ekspresyonun düzeyinin belirlenmesi için şu işlemler yapılmıştır:

- TAF7' ye özgül siRNAlar ile transfekte edilen, sadece lipid ile transfekte edilen, Kontrol siRNA' ları ile transfekte edilen ve hiçbir işlem uygulanmamış olan üçer kuyudan oluşan hücre kültürü grupları oluşturulmuştur.
- siRNA transfeksiyonundan 24 ve 48 saat sonra RNA izolasyonları ve hücre lizati hazırlanması işlemleri yapılmıştır.

3.6.1 Ekspresyonun RNA Düzeyinde Belirlenmesi:

TAF7 geninin mRNA ekspresyonunun belirlenmesi için şu işlemler yapılmıştır:

- Hücre hatlarından RNA izolasyonu
- Reverse transkriptaz enzimi ile RNA' dan cDNA eldesi
- Polimeraz zincir reaksiyonu

RNA İzolasyonu:

Gereçler:

- 1 Hücre kültürü

- 2 PBS
- 3 % 96'lık etanol
- 4 Standart masa üstü mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R).
- 5 Mikrosantrifüj tüpleri
- 6 "High pure" RNA izolasyon kiti (Roche - Cat. No. 11 828 665 001)

Kit içeriği:

- Liziz/Bağlama Tamponu
- DNase I
- DNase inkübasyon tamponu
- Yıkama tamponu I
- Yıkama tamponu II
- Elüsyon Tamponu
- Filtre tüpleri
- Toplama Tüpleri

Yöntem:

Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması:

- 1 DNase I 0,55 ml elüsyon tamponu içerisinde çözüldü. Alikatlanarak -20 °C'ye kaldırıldı.
- 2 Yıkama tamponu I' e 20 ml. % 96'lık etanol eklendi.
- 3 Yıkama tamponu II' ye 40 ml. % 96'lık etanol eklendi.

Kültür Hücrelerinden Total RNA'nın İzolasyonu:

- 1 Yüzeyle tutunarak üreyen hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı. Besi ortamı içerisinde homojenize edildi.
- 2 Hücreler 1100 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldüler.
- 3 200 µl PBS içerisinde süspanse edildiler.
- 4 Üzerine 400 µl liziz/bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
- 5 Filtre tüpü toplama tüpü içerisine yerleştirilip üzerine tüm hücre süspansiyonu eklendi.
- 6 8000 g.'de 15 sn. santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
- 7 Bir ependorfta 90 µl Dnase I inkübasyon tamponu ve 10 µl Dnase I eklendi ve karıştırıldı. Karışım filtre tüpünün üzerine aktarıldı.
- 8 Oda sıcaklığında 15 dak. inkübe edildi.
- 9 500 µl Yıkama tamponu I eklendi.
- 10 15 sn 8000 g.'de santrifüj edildi. Tüpte biriken sıvı döküldü.
- 11 500 µl Yıkama tamponu II eklendi.
- 12 15 sn 8000 g.'de santrifüj edildi. Tüpte biriken sıvı döküldü.
- 13 200 µl Yıkama tamponu II eklendi.
- 14 2 dak. En yüksek hızda santrifüj edildi.
- 15 Filtre tüpü toplama tüpünden çıkarılıp temiz bir 1,5 ml.'lik mikrosantrifüj tüpe aktarıldı.
- 16 Filtre tüpü üzerine 50 -100 µl elüsyon tamponu eklendi.
- 17 1 dak. 8000 g.'de santrifüj edilerek RNA elde edildi.
- 18 İzole edilen RNA – 80 °C'de saklandı.

RNA Miktarı Tayini

İzole edilen RNA'ların belli oranda dilusyonları yapıp, spektrofotometre (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) ile 260 ve 280 nm de absorbansları ölçüldü.

$A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40 \mu\text{g/ml}$ formülü ile RNA konsantrasyonları hesaplandı.

A_{260} / A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması RNA'nın saf olduğunun göstergesidir.

A_{260} / A_{280} oranı hesaplanarak RNA'ların saflık dereceleri belirlendi.

3.6.1.2.cDNA Eldesi

Gereçler:

- 1 Total RNA
- 2 “RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptaz” enzimi (#EP0441)
- 3 5X RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptaz tamponu (#EP0441)
- 4 Sekans spesifik primer

Yöntem:

- 1 cDNA sentezi reaksiyon içeriği Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: cDNA sentezi reaksiyon içeriği

	Kimyasal	Marka	Konsantrasyon	Eklenen Miktar
	Distile Su			10 µl
I. Karışım	Sekans Spesifik Primer	Metabion	10 pmol/µl	1 µl
	Total RNA			5 µl
	Distile Su			6.5 µl
II. Karışım	dNTP	Larova	2.5 mM	1 µl
	5 X Reaksiyon Tamponu	Fermantas	5 X	6 µl
	Reverse Transkriptaz Enzimi	Fermantas	200 u/µl	1 µl

- 2 Tablo 2’de anlatıldığı gibi hazırlanan 1. Karışım 37 °C’de 5 dakika ve ardından buzda 2 dakika bekletildi.
- 3 Tablo 2’de anlatıldığı gibi hazırlanan 2. karışım 1. karışım ile karıştırılıp
 - o 42 °C’de 60 dak.
 - o 70 °C’de 10 dak.

PCR cihazında bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.6.1.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Gerçek zamanlı PCR Light Cycler ® 2.0 (Roche Diagnostics) cihazı ve Light Cycler Fast

Start DNA Master SYBR Green 1 (Roche Diagnostics) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. TAF7 geninin Vector NTI programından yararlanılarak ekspresyon kontrol primerleri tasarlanmıştır. β Actin geni iç kontrol ve rölatif kantitasyon için kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan β Actin primerleri bölümümüz öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr Ogün Sercan tarafından sağlanmıştır. Kalıp kontrol olarak da H₂O kullanılmıştır.

Tablo 4: TAF7 ekspresyon kontrolü için kullanılan PCR primerleri

5' Primer CCG CTC GAG AGT AAA AGC AAA GAT GAT GCT CCT CAC

3' Primer CCA TAA CAC AGG GCA CT

Tablo 5: β Actin ekspresyon kontrolü için kullanılan PCR primerleri

5' Primer CCT TCC TGG GCA TGG GCA TGG AGT CCT G

3' Primer GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC

Erime eğrileri 40. döngüde 95 °C' de 0 sn ve 65 °C' de 15 sn sonrasında 0,1 °C/sn hızla 95 °C' ye çıkarken kaydedilen sürekli floresan ölçümü, Light Cyler Software 4.0.0.23 (Roche Diagnostics) tarafından yapılmıştır. Cam kapiller ler içerisindeki örnekler %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından kontrol edilmiştir.

PCR için reaksiyon içeriği Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Gerçek zamanlı PCR için reaksiyon içeriği

Kimyasal	Marka/İsim	Konsantrasyon	Eklenen miktar
SYBR Green reaksiyon karışımı	Roche	10 X	2 µl
5' Primer	Gfp I	10 nM	1 µl
3' Primer	Taf 7 R	10 nM	1 µl
MgCl ₂	Roche	25 mM	1 µl
Kalıp	cDNA		4 µl
Distile su			11,5 µl

3.6.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Cam kapillerlerdeki PCR ürünleri yükleme boyası ile 1 µg/µl konsantrasyonda etidyom bromür içeren %1'lik (w/v) agaroz jelde, RunOne™ System (Versn 021704) DNA elektroforezinde, 10 V/cm potansiyel fark ile yürütüldü. Elektroforez sonuçları EagleSight Software (Stratagene) ve Bio Imaging Systems (SynGene) kullanılarak görüntülendi.

3.6.2. Hücre Hatlarında TAF7 Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Belirlenmesi:

Hücre hatlarında Taf7 geninin ekspresyonunun protein düzeyinde belirlenmesi için western blot tekniği kullanılmıştır. Yapılan işlemler, aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- TAF7 geninine spesifik siRNA' lar ile transfekte edilen hücrelerden hücre lizatu hazırlanmıştır.
- Protein konsantrasyonları Pierce' ın BCA Protei Assay' i (Ürün kodu 232279)

kullanılarak ölçülmüştür.

- Mini-PROTEAN® 3 Cell (Katalog Numarası: 165-3301) cihazı kullanılarak SDS page elektroforezleri yapılmıştır.
- “Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Biorad - Katalog numarası: 170–3940) cihazı kullanılarak yarı kuru yöntem ile sds page jelinden PVDF membrana transfer yapılmıştır.
- TAF7 antikoru ile blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” (Pierce – Katolog no 34080) kiti ile deteksiyon yapılmıştır.
- “Restore™ Western Blot Stripping Tampon” (Pierce – Katolog no 21059) ile membrana bağlanan antikoların uzaklaştırılması işlemi yapılmıştır.
- Eşit yükleme yapıldığının kontrol edilmesi amacıyla TBP antikoru ile blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” (Pierce – Katolog no 34080) kiti ile deteksiyon yapılmıştır.

3.6.2.1. Hücre Lizatı Hazırlanması:

Gereçler:

- Lizis Tamponu (İçeriği için bkz. Ek1)
 - 1 M Hepes (pH: 7,6) çözeltisi,
 - 2M. KCl,
 - 1M. MgCl₂
 - 500 µM EDTA

- Gliserol
- %20 NP40 solüsyonu
- PMSF
- 1M. DTT
- Proteaz inhibitör kokteyli
- İnsülin şırıngası
- PBS
- Hücre kazıyıcı
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R)

Yöntem:

- Yüzeğe bağımlı hücreler tripsinizasyon ya da hücre kazıyıcısı kullanılarak kaldırılır.
- Bir kez PBS (phosphate tamponed saline) ile yıkanılır.
- 400 g' de, 4 °C' de 5 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
- Üst faz dikkatlice çekilir.
- Pellet üzerine üç katı hacminde lizis tamponu eklenir.
- 10 Dakika buz üzerinde inkübe edilir.
- Bir insülin şırıngasının ucu ile üç kez çekilip bırakılarak genomik DNA kırılır.
- 10 dakika daha buz üzerinde inkübe edilir.
- 20 dakika en yüksek hızda (20000 g) 4 °C' de santrifüjlenir.
- Üst faz önceden buzda soğutulmuş temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- Lizat kullanılana kadar - 80 °C' ye kaldırılır.

3.6.2.2. Protein Konsantrasyonu Ölçülmesi:

“BCA™ Protein Assay” bichinonic asit (BCA) temelli, kolorimetrik olarak total protein konsantrasyonu ölçülmesi için formüle edilmiş bir testtir. Bu yöntem Cu^{+2} , nin Cu^{+1} , e alkali ortamdaki protein ile indirgenmesi (biuret reaksiyonu) esasına dayanmaktadır. BCA’ nın iki molekülü ile bir bakır iyonunun (Cu^{+1}) şelat oluşturması ile mor renkli ürün açığa çıkar. Bu suda çözünebilir kompleks 562 nm.’ de güçlü bir absorbands verir. Konsantrasyonu bilinen standartların 562 nm.’ de verdiği absorbandlardan yararlanılarak standart grafiği çizilir. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin verdiği absorbandların standart grafikten karşılığı okunarak, protein konsantrasyonları belirlenebilir.

Gereçler:

- Protein konsantrasyonları Pierce’ ın BCA Protei Assay’ i (Ürün kodu 232279) kullanılarak ölçülmüştür.

Yöntem:

- 50 kat hacimde A solüsyonu, 1 kat hacimde B solüsyonu karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.
- 96 well plate’in her bir gözüne 200’er μl reaksiyon karışımı eklendi.
- 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 ve 125’er $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında standartlardan ve protein konsantrasyonu belirlenmesi amaçlanan lizatlardan 25 ya da 10’ ar μl reaksiyon karışımları üzerine eklendi.
- 30 dakika 37°C ’ de inkübe edildi.
- Oda sıcaklığına gelmesi için beklendi.
- Plate okuyucuda 562 nm’ de absorbandları ölçüldü.

- Konsantrasyonları bilinen standartların absorbanlarından yararlanılarak standart grafiği çizildi.
- Standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin absorbanlarına karşılık gelen konsantrasyonları belirlendi.

3.6.2.3. SDS PAGE Elektrofözezi:

Western blotta ilk aşama protein makro moleküllerinin SDS PAGE jel elektrofözezi ile moleköl büyüklüklerine göre ayrılmasıdır. Elektrofözede iki farklı jel kullanılır. Bunlar ayrıştırıcı jel ve diğeri ise yükleme jelidir. İlk dökülen jel ayrıştırıcı jeldir. Proteinlerin moleköl büyüklüklerine göre ayrıştırıldığı jeldir. Yükleme jeli, ayrıştırıcı jel üzerine dökölür. Tarak bu jel üzerine yerleştirilir. Hücre lizatı denatüre edildikten yükleme jeline yüklenir. Sonra ayrıştırıcı jele girer.

Gereçler:

- Mini-PROTEAN® 3 Cell (Katalog Numarası: 165–3301) cihazı
- Güç kaynağı
- %10' luk Ayrıştırıcı (resolving) jel ve baca (stacking) jeli (içeriği için bkz ek)
- Yürütme Tamponu (İçeriği için Ek 1'e bakınız)
- 4X ya da 2X yükleme tamponu (içeriği için eke bakınız)
- 50 ml.' lik ve 15 ml.' lik tüpler.
- Protein markerı (İnvitrogen – SeeBlue® Pre-Stained Standard - Catalog no. LC5625)

Yöntem:

- %10' luk Ayrıştırıcı jel ve yükleme jel dökölüdü.

- Tarak yerleştirildi.

Not: Ayırıştırıcı jel döküldükten sonra üzerine %0,1'lik SDS çözeltisi eklenir. Polimerleşene kadar beklenir.

- Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak çıkarıldı. Kuyular %0,1'lik SDS çözeltisi ile yıkandı.
- Her bir kuyuya aynı miktarda (20 – 40 µg) hücre lizatı eklendi. Mikro santrifüj tüplerine 20 – 40 µg protein içerecek hacimde lizat alındı. Üzerine lizatın 1/3' ü hacminde 4X RG (içeriği için Ek1'e bakınız) ya da aynı hacimde 2X RG (içeriği için Ek1'e bakınız) yükleme tamponu eklendi. Mikro santrifüj tüpleri ısı bloğu üzerinde 95 -100 °C' de 5 – 10 dak. inkübe edilerek proteinler denatüre edildi.
- Isı bloğundan alınan ependorflar buzda 5 dakika inkübe edildi.
- Lizatlar ve protein marker' ı poliakrilamit jele yüklendi.
- 70 -110 V.' da marker tamamen açılana kadar Mini-PROTEAN® 3 Cell (Katalog Numarası: 165-3301) cihazında yürütüldü.
- Yükleme jeli kesilip atıldı.
- Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (Biorad - Katalog numarası: 170–3940) cihazında nitroselüloz membrana transferi yapıldı.

3.6.2.4. Membrana “Yarı Kuru” Yöntem İle Transfer:

Gereçler:

- “Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Biorad - Katalog numarası: 170–3940) cihazı

- Nitroselüloz membran (Applichem – Pure Nitrocellulose Unsupported 0,45 µm transfer membrane - A5239, 3020R)
- Towbin transfer tamponu (içeriği için bkz. Ek 1)

Yöntem:

- Jel büyüklüğünde nitroselüloz membran kesildi.
- Towbin Transfer tamponu ile membran, blot kâğıtları ve jel ıslatıldı.
- “Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Biorad - Katalog numarası: 170–3940) cihazına aşağıda belirtilen sırada kâğıt, membran ve jel yerleştirildi:
 - En alta ekstra kalın blot kâğıdı
 - Üzerine poliakrilamit jel
 - Üzerine membran
 - En üste ekstra kalın blot kâğıdı
- 15 V’ da 40 – 50 dakika transfer işlemi yapıldı.

3.6.2.5. Western Blot:

Gereçler:

- TBST (Tris buffered saline – %0,05 Tween 20)
- Transferi yapılmış membran
- Süt tozu
- **Primer antikor:** Anti TAF7 (Dinah Singer laboratuvarı, Deneysel İmmünoloji Dalı, NCI, NIH’da üretilmiş poliklonal tavşan antikorudur. Dinah Singer tarafından sağlanmıştır) / Anti TBP (Santa Cruz) – poliklonal fare antikorudur: Membran üzerindeki proteinlere ilk bağlanan antikordur.

- **Sekonder antikor:** (Anti tavşan keçi) Keçide tavşan antikorlarına karşı üretilmiş antikordur. Sekonder antikorlara HRP (horseradish peroxidase) bağlanmıştır. Primer antikora özgül oldukları için membranda primer antikorun bağlı olduğu bölgelere bağlanırlar. ECL kiti ile HRP reaksiyona girerek lüminesans oluşturur. Oluşan lüminesans, fotoğraf filmi ya da CCD kamera ile görüntülenerek ilgilenilen protein bantları belirlenebilmektedir.

Yöntem:

- % 5 Süt tozu içeren TBST içerisinde 4 °C’ de 1 saat membran blotlandı.
- 4 °C’ de % 5 Süt tozu, 1/1000 oranında primer antikor içeren TBST içerisinde bir gece boyunca membranın blotlanmasına devam edildi.
- Membran iki kez TBST ile bir kez de TBS ile yıkandı.
- 4 °C’ de %1 oranında süt tozu ve 1/2500 oranında sekonder antikor içeren TBST içerisinde iki saat inkübe edildi.
- Membran iki kez TBST ile bir kez de TBS ile yıkandı.

3.6.2.6. Deteksiyon:

Gereçler:

- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” (Pierce – Katalog no 34080) kiti.
- “Exposure Cassette” (Kodak, Biomax - Katalog no:115193)
- Poşet dosya
- Film (Kodak, Biomax Light Film - Katalog no:8761520 ve Kodak Medical X – ray Film Katalog no: 8143059)

Yöntem:

- “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” kitinin peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı.
- Membran 5 dakika boyunca bu karışım içerisinde inkübe edildi.
- Bir poşet dosya içerisine alınıp kaset içerisine yerleştirildi.
- Kaset içerisine karanlık odada film yerleştirildi.
- 10 saniye – 30 dakika’ ya kadar olan farklı zaman aralıklarında film kaset içerisinde tutulup, görüntü elde edildi.

3.6.2.7 Membranın “Strip” Edilmesi:

Bir defa western blot yapılan membranın ikinci kez başka bir antikora blotlanması mümkündür. Bunun için membranın “strip” edilerek bağlı durumdaki antikorların uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu projede RNA interferans tekniği ile TAF7 geninin ekspresyonunun baskılandığı protein düzeyinde gösterildikten sonra, proteinlerin eşit miktarda yüklendiğini kanıtlamak amacıyla membran “strip” edilerek membran üzerindeki proteinlere bağlanan antikorlar uzaklaştırılmış ve tekrar TBP primer antikoru ile western blot yapılmıştır.

Gereçler:

- “Restore™ Western Blot Stripping Tampon” (Pierce – Katalog no 21059).
- 50 ml.’ lik falkon tüp
- Hibridizasyon fırını

Yöntem:

- Önceden 37 °C' ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında 25 dakika boyunca stripping tampon ile birlikte membran bir 50 ml.' Lik falkon tüp içerisinde döndürülerek inkübe edildi.
- Membran üç kez TBST ile bir kez de TBS ile yıkandı.
- %5 oranında süttozu içeren TBST içerisinde blotlamaya alındı.

3.7. HÜCRE HATLARINDA TAF7 GENİNİN SESSİZLENDİRİLMESİNİN APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ:

HeLa, Kelly ve Namalwa hücrelerinde Etoposit, MGBG (methylglyoxal bis – guanylhydrazone) ve radyasyon uygulanması sonrasında apoptoz düzeylerini ölçmek için kaspaz 3 ve 7' yi hedef alan Promega' nın G8092 katalog numaralı Caspase Glo 3/7 Assay ve Sigma' nın kaspaz 3'ü hedef alan CASP–3-F katalog numaralı “Fluorometric Caspase 3 Assay Kit” i kullanıldı.

HeLa Kelly ve Namalwa hücrelerinde optimum koşulların belirlenmesi için farklı doz ve sürelerde etoposit, MGBG (methylglyoxal bis – guanylhydrazone) ve radyasyon uygulaması deneyleri yapılmıştır. Denenen doz ve süreler tablo 7' de verilmiştir

Tablo 7: Apoptoz optimizasyonu koşulları

KOŞULLAR	RADYASYON				ETOPOSİT			MGBG		
DOZLAR	5 Gy	10 Gy	20 Gy	30 Gy	10 µM	25	50	160	320	500
						µM	µM	µM	µM	µM
SÜRELER	0 H.	3 H.	6 H	12 H.	0H.	3 H.	6 H	12 H.		
	24 H.	48 H.			24H.	48H.				

Tabloda verilen koşullarda kaspaz aktivasyonunu ölçen kitlerle yapılan deneyler sonucunda araştırmada kullanılacak olan doz ve süreler belirlenmiştir.

3.7.1. CASPASE GLO 3/7 ASSAY İle Apoptotik Davranış Ölçümü:

Kit tetrapeptit sekans DEVD' i içeren luminogenik kaspaz 3/7 substratını barındırır. Substrat hücre kültürü ortamına eklendiğinde, hücre lizisine yol açar ve kaspaz 3/7 ile etkileşime girdikten sonra ortaya luminogenik ürün olan Z-DEVD çıkar. Bu üründen kaynaklanan lüminesans ölçülerek apoptotik davranış belirlenebilmektedir.

Gereçler:

- Caspase Glo 3/7 Assay (Katalog numarası: Promega- G8092) kiti
- Apoptotik uyarıya maruz bırakılmış ve bırakılmamış hücre kültürü

Yöntem:

- Caspase Glo 3/7 Assay substratı ile Caspase Glo 3/7 Assay tampon çözeltisi karıştırılır.

- Apoptotik uyarıya maruz bırakılmış hücre kültürü üzerine eşit hacimde eklenir.
- 30 dakika 37 °C’de inkübe edilir.
- Lüminometrede ölçüm yapılır.

3.7.2 CASPASE GLO 8 ve 9 Assay ile Apoptotik Davranış Ölçümü:

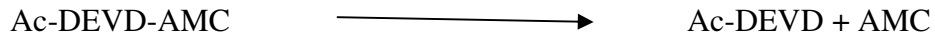
Caspase Glo 8 ve 9’ un çalışma prensibi Caspase Glo 3/7 ile aynıdır. Caspase 8 fas ligandı, Caspase 9 ise mitokondriyel yolaklı apoptotik davranışın belirlenmesinde kullanılır. Projemizde MGBG ve etopositin mitokondriyel mi yoksa fas ligandı üzerinden mi etki ettiğini araştırmak amacıyla Caspase 8 ve 9 kiti kullanılmıştır. Oluşturulan deney grupları tablo 8’ de verilmiştir.

Tablo 8. Caspase 8 ve 9 deneyi grupları

CASPASE GLO 8 UYGULANAN			CASPASE GLO 9 UYGULANAN		
0.Saat Negatif kontrol	0.Saat 500 µM MGBG uygulanan	0.Saat 50 µM etoposit uygulanan	0.Saat Negatif kontrol	0.Saat 500 µM MGBG uygulanan	0.Saat 50 µM etoposit uygulanan
3.Saat Negatif kontrol	3.Saat 500 µM MGBG uygulanan	3.Saat 50 µM etoposit uygulanan	3.Saat Negatif kontrol	3.Saat 500 µM MGBG uygulanan	3.Saat 50 µM etoposit uygulanan
6.Saat Negatif kontrol	6.Saat 500 µM MGBG uygulanan	6.Saat 50 µM etoposit uygulanan	6.Saat Negatif kontrol	6.Saat 500 µM MGBG uygulanan	6.Saat 50 µM etoposit uygulanan
12.Saat Negatif kontrol	12.Saat 500 µM MGBG uygulanan	12.Saat 50 µM etoposit uygulanan	12.Saat Negatif kontrol	12.Saat 500 µM MGBG uygulanan	12.Saat 50 µM etoposit uygulanan
24.Saat Negatif kontrol	24.Saat 500 µM MGBG uygulanan	24.Saat 50 µM etoposit uygulanan	24.Saat Negatif kontrol	24.Saat 500 µM MGBG uygulanan	24.Saat 50 µM etoposit uygulanan

3.7.3 Fluorometric Caspase 3 Assay Kit İle Apoptotik Davranış Ölçümü:

Kaspaz 3 Florometrik assay peptit substrat aacetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC)' nin kaspaz 3 ile hidrolizine dayanır. Hidroliz sonucunda florescent 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) salınır.



AMC' nin eksitasyon ve emisyon dalga boyları 360 ve 460 nm.' dir. Salınan AMC konsantrasyonu ve dolayısıyla kaspaz 3 miktarı, konsantrasyonları bilinen AMC solüsyonlarından elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlenebilmektedir.

Gereçler:

- **5X Lizis tamponu** (Ürün kodu L 2912): Çift distile su ile 1X halinde dilüe edilir. - 20 °C' de saklanır.
- **10X Reaksiyon Tamponu** (Ürün kodu A 0219): Çift distile su ile 1X halinde dilüe edilir. - 20 °C' de saklanır.
- **Kaspaz 3** (Ürün kodu C 5974): 50 µl çift distile su ile 5µg liyofilize toz sulandırılarak 100 µg/µl konsantrasyonda solüsyonu hazırlanır. Alikatlanıp, -80 °C' de saklanır.
- **Ac-DEVD-AMC Substratı** (Ürün kodu A 1086): Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin. 2,5 mg İçerik 370 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek 10mM' lık solüsyon hazırlanır. - 20 °C' de saklanır.

- **Ac-DEVD-CHO İnhibitörü** (Ürün kodu A 0835): Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al. 0,5mg içerik 500 µl DMSO içerisinde çözülerek 20 mM.'lık solüsyon hazırlanır. - 20 °C' de saklanır. Kullanılmadan önce 1X "assay tampon" ile 100 kat, 200 µM.' a dilüe edilir.
- **7-Amino-4-methylcoumarin Standard** (Ürün kodu A 9891): 1 mg içerik 570 µl DMSO' da çözülür. Kalibrasyon eğrisinde standart olarak kullanılır. - 20 °C' de saklanır. AMC kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 1X assay tampon ile 1000 kat dilüe edilerek, konsantrasyonu 10 µM' a getirilir.
- 96 well plate (CELLSTAR, Flat bottom No:655180)
- Apoptotik ajan ile indüklenen hücreler.
- Plate okuyucu (BioTek Synergy HT)

Yöntem:

AMC Kalibrasyon Grafiği Hazırlanması:

- 96 well plate microassay metodu için tablo 9 daki standart solüsyonlar hazırlanır:

Tablo 9: AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) kalibrasyon grafiği hazırlanması

AMC Standard	200 µl Hacim içerisindeki AMC miktarı (nm)	10 µM AMC Solüsyonu miktarı	1X Assay Tampon Miktarı
6 µM	1,2 nmol	180 µl	120 µl
4 µM	0,8 nmol	120 µl	180 µl
2 µM	0,4 nmol	60 µl	240 µl
1 µM	0,2 nmol	30 µl	270 µl
500 nM	0,1 nmol	15 µl	285 µl
100 nM	0,02 nmol	3 µl	297 µl

- Her solüsyondan 200' er µl 96 well plate gözlerine eklenir.
- Referans için bir göze 200 µl 1X assay tampon eklenir.

- Flüoremetrenin eksitasyonu 360 nm, emisyonu 460 nm' ye ayarlanır.
- Solüsyonların flüoresans değerleri ölçülür.
- Flüoresans yoğunluğuna karşı AMC konsantrasyonu grafiği çizilir.

Hücre lizatı Hazırlanması:

- Apoptoz indüklenen hücreler inkübasyon süresi sonunda tripsinizasyon ya da PBS (phosphate tamponed saline) içerisinde hücre kazıyıcısı ile kazıyarak kaldırılır.
- 600g' de 5 dak. + 4 °C' de santrifüjlenerek çöktürülür.
- Bir kez PBS ile yıkanır.
- 250000 hücre başına 40 µl 1 X lizis tampon eklenir. Vorteksle süspanse edilir.
- Buzda 15 – 20 dak. İnkübe edilir.
- Lizis edilen hücreler 14000 g' de 10 -15 dak. 4 °C' de santrifüjlenir.
- Süpernatantlar yeni tüplere aktarılır.
- Lizatlar hemen analiz edilir ya da alikatlanarak – 80 °C' de saklanır.

96 Well Plate Microassay Metodu ile Apoptotik davranışın Belirlenmesi:

- Her 3 ml 1X Assay Tampon başına 5 µl 10 mM Ac-DEVD-AMC eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanır. 96 Gözlü plate' lerin her gözüne 200' er µl reaksiyon karışımı eklenir.
- Tablo 10' da anlatıldığı gibi 96 gözlü plate hazırlanır.

Tablo 10: 96 gözlü plate metodu ile apoptotik davranışın belirlenmesi

	1X Assay Tampon	Kaspaz 3 (0,5 µg/µl)	Hücre Lizati	Kaspaz 3 İnhibitörü Ac- DEVD- CHO	Reaksiyon Karışımı
Blank	5 µl	–	–	–	200 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol	–	5 µl	–	–	200 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol + İnhibitör	–	5 µl	–	2 µl	200 µl
Apoptoz İndüklenmeyen hücre lizati	–	–	5 µl	–	200 µl
Apoptoz İndüklenmeyen hücre lizati + İnhibitör	–	–	5 µl	2 µl	200 µl
Apoptoz İndüklenen hücre lizati	–	–	5 µl	–	200 µl
Apoptoz İndüklenen hücre lizati + İnhibitör	–	–	5 µl	2 µl	200 µl

- Plate' in kapağı kapatılıp karanlıkta oda sıcaklığında 1 – 1,5 saat inkübe edilir.
- Eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm' de plate flüoremetre' de okutulur.
- Kalibrasyon grafiğine göre AMC konsantrasyonları hesaplanır.

3.8.İMMÜN PRESİPİTASYON

İmmün presipitasyon bir protein ile ilişkili olan diğer proteinlerin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Sefadoz boncuklarına antikor – antijen kompleksinin bağlanabilmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemle antikora özgül olan antijen ve ona bağlı olan diğer

proteinler seçici olarak kazanılabilmekte ve western blot tekniği kullanılarak belirlenebilmektedir.

Gereçler:

- Protein A boncukları
- Lizis tamponu (içeriği için eke bakınız)
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Soğutmalı santrifüj
- +4 °C' li soğuk oda.
- Mini protean 3 Cell SDS Page jel elektroforez tankı
- Güç kaynağı
- Nitroselüloz membran
- Protein markeri
- Semi dry transfer cihazı
- Süt tozu
- TBST (içeriği için eke bakınız)
- TBS (içeriği için eke bakınız)
- Towbin transfer tamponu (içeriği için eke bakınız)
- Otomatik pipet ve pipet uçları
- Hücre lizati
- TAF7, CIITA, BIM ve LIS 1 primer antikoru

Yöntem:

- Bir mikrosantrifüj tüpüne 150 µl protein A boncuğu eklenir.

- Dört kez lizis tamponu ile yıkanır.
- Üzerine 100 µl lizis tamponu içerisinde 1/100 – 1/20 dilüsyon oranında immün presipitasyon antikoru eklenir.
- +4 °C’ de dönmeye bırakılır.
- 2-3 saat sonra protein boncuklar spinlenerek çöktürülür.
- Üst faz atılır.
- Boncuklar üzerine 100 µl lizat eklenip gece boyunca +4 °C’ de dönmeye bırakılır.
- Ertesi gün protein boncuklar soğutmalı santrifüjde spinlenerek çöktürülür.
- Bir kez 1 ml lizis tamponu ile yıkanır.
- Boncuklar üzerine 4X yükleme tamponundan 1/3 hacimde yani 150 µl boncuk için 50 µl olacak şekilde eklenir.
- 95 – 100 °C’ de 5 – 10 dakika inkübe edilerek proteinler boncuklardan ayrılır.
- Soğutmalı santrifüjde spinlenerek boncuklar çöktürülür.
- Üst faz SDS page jeline yüklenerek western blot protokolü uygulanır.

3.9. TUBULIN DENEYİ:

Bu çalışmada TAF7 ekspresyonu pEGFP TAF7 ile arttırılan, siRNA ile azaltılan ve kontrol grubu Kelly hücrelerinde mikrotübül yapısında yer alan alfa tübülünün floresan boyanması amaçlanmıştır. Tablo 11’ de verilen deney grupları oluşturulmuştur.

Tablo 11 Tubulin boyama deney grupları:

Normal Kelly
1 Mikromolar taxol eklenen Kelly
pEGFP TAF7 transfekte Kelly
Sadece Fugene uygulanan Kelly
TAF7 siRNA uygulanan Kelly
Negatif kontrol siRNA uygulanan Kelly
TAF7 siRNA ve taxol uygulanan Kelly
Dharmafect uygulanan Kelly
Kolçisin uygulanan Kelly

Gereçler:

- Alfa tubuline özgül farede üretilmiş primer antikor
- Tavşanda üretilmiş, FITC eklenmiş anti fare sekonder antikor
- Fötal dana serumu
- PBS
- DAPI (0,1 µg/ml)
- Lam
- Steril lamel
- Kaplama ortamı (Dako Cytomation REF – S3023, LOT- 095072)
- Floresan mikroskopu (Nikon – Y-FL 074778)

Yöntem:

- 120 şer bin adet Kelly hücresi dokuz adet steril lamel üzerine ekilmiştir.
- Hücrelerin yüzeye tutunması için bir gece inkübasyonda bırakılmışlardır.
- TAF7 siRNA ve pEGFP TAF7 transfeksiyonlar yapılmıştır.
- siRNA transfeksiyonundan 24 saat sonra 1 µM taxol ve 0,18 µg/ml kolçisin Tablo 11' de anlatılan gruplara eklenmiştir.

- Kimyasal eklenmesinden 24 saat sonra hücreler zerindeki ortam çekilip floresan boyama işlemine başlanmıştır.

İmmün Floresan Boyama:

- Besi ortamı çekilen kuyulardaki lameller metanol ile bir kez yıkanmıştır.
- Lamellerin üzerine saf metanol eklenip 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Metanol çekilip PBS ile 5 -10 dakika çalkalayarak yıkanmıştır.
- Hücreler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında, çalkalanarak, %10 FBS içeren PBS ile blotlanmıştır.
- Kuyular 10 dakika boyunca, PBS ile yıkanmıştır.
- Primer antikor % 1,5 oranında FBS içeren PBS içerisinde 1/200 oranında dilüe edilmiştir. Bu karışımdan lameller üzerine 100' er µl eklenip bir saat ıslak havlu içeren kutuda oda sıcaklığında kapağı kapatılarak 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Kuyular 30 dakika boyunca, 10 dakikada bir değiştirilerek PBS ile yıkanmıştır.
- FITC Florokrom işaretli sekonder antikor % 1,5 oranında FBS içeren PBS içerisinde 1/1000 oranında dilüe edilmiştir.
- Bu karışımdan lameller üzerine 100' er µl eklenip bir saat ıslak havlu içeren kutuda oda sıcaklığında kapağı kapatılarak 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Kuyular 30 dakika boyunca, 10 dakikada bir değiştirilerek PBS ile yıkanmıştır.
- 0,1 µg/µl oranında DAPI PBS içerisinde dilüe edilmiştir.
- Bu karışımdan lamelleri içeren kuyulara 1' er ml eklenmiştir. 45 saniye inkübe edilip kuyular PBS ile 5 – 10 dakika yıkanmıştır.
- Kuyulardan lameller bir steril enjektör ucu ile kaldırılıp kurumaya bırakılmıştır.

- Kuruduktan sonra lameller üzerine 1' er damla kaplama ortamı eklenip lamalar üzerine kapatılmışlardır.
- Floresan mikroskopunda dapi (NP 16), rhodamin/texas red (ND8) ve FITC (ND4) filtreleri ile incelenmişlerdir. Dapi filtresi ile nükleuslar mavi olarak, rhodamin/texas red filtresi ile alfa tubulin proteinleri kırmızı ve FITC filtresi ile GFP sinyalleri yeşil olarak görüntülenmiştir.

4.BULGULAR

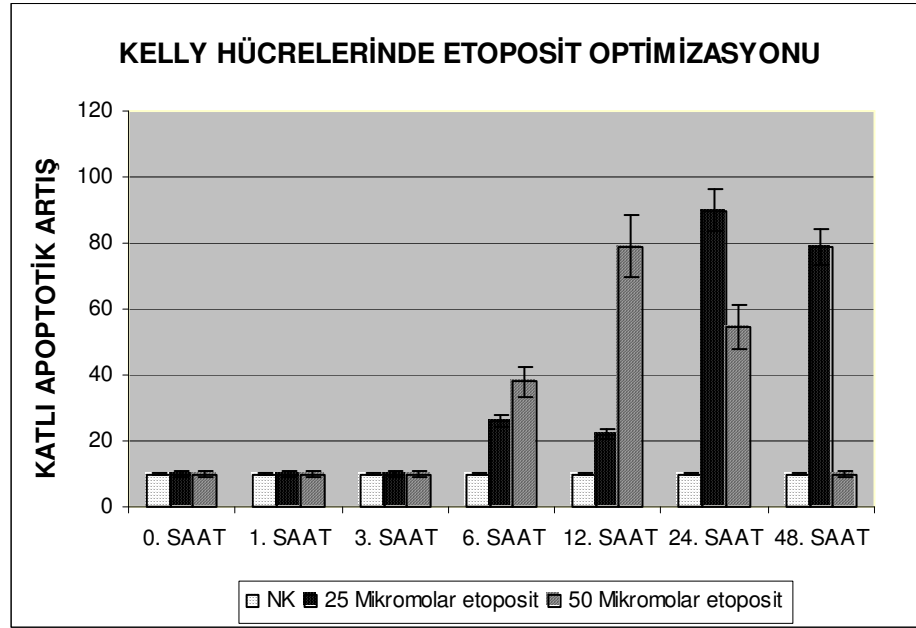
4.1 APOPTOTİK AJANLARIN OPTİMUM DOZ VE SÜRELERİ:

4.1.1.ETOPOSİT OPTİMİZASYONU:

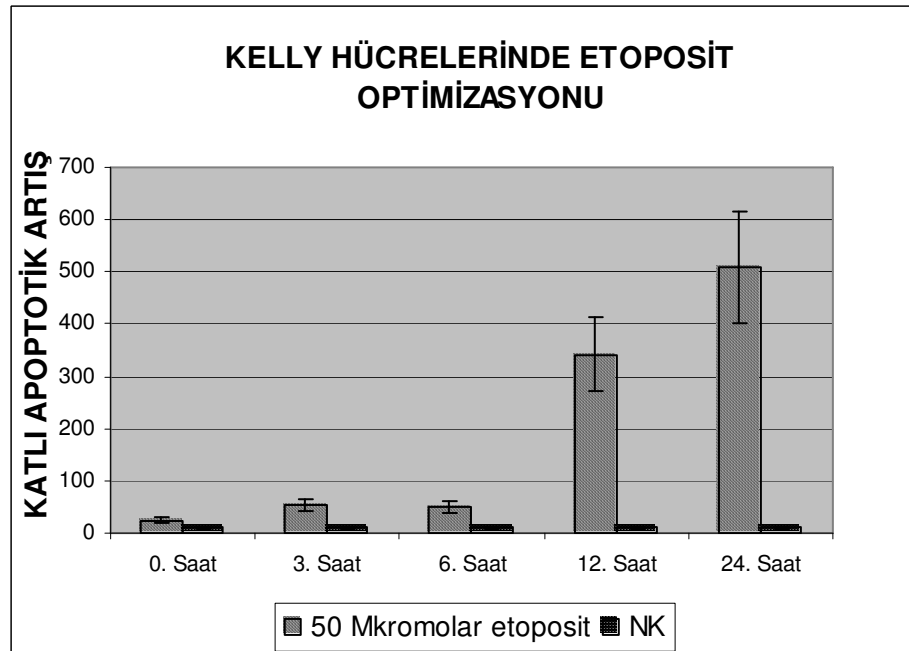
24 gözlü plate'lere sayım yapılarak her bir gözde 250000 hücre olacak şekilde HeLa, Namalwa ve Kelly hücreleri ekildi. 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda etoposit eklendi. Kaspaz ölçümleri 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapıldı. Özetle her bir etoposit konsantrasyonu için yedi farklı zaman diliminde kaspaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen veriler ışığında HeLa, Namalwa ve Kelly hücre hatlarında, 50 mikromolar etoposit konsantrasyonunda 24 saat inkübasyon süresinin en uygun koşullar olduğuna karar verildi. Elde edilen veriler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 12. Kelly hücrelerinde etoposid doz ve süresi optimizasyonu A) 25 ve 50µM konsantrasyonlarda etoposid eklendikten sonra 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK. Normal kontrol). B) 50µM konsantrasyonda etoposid eklendikten sonra 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).

A)

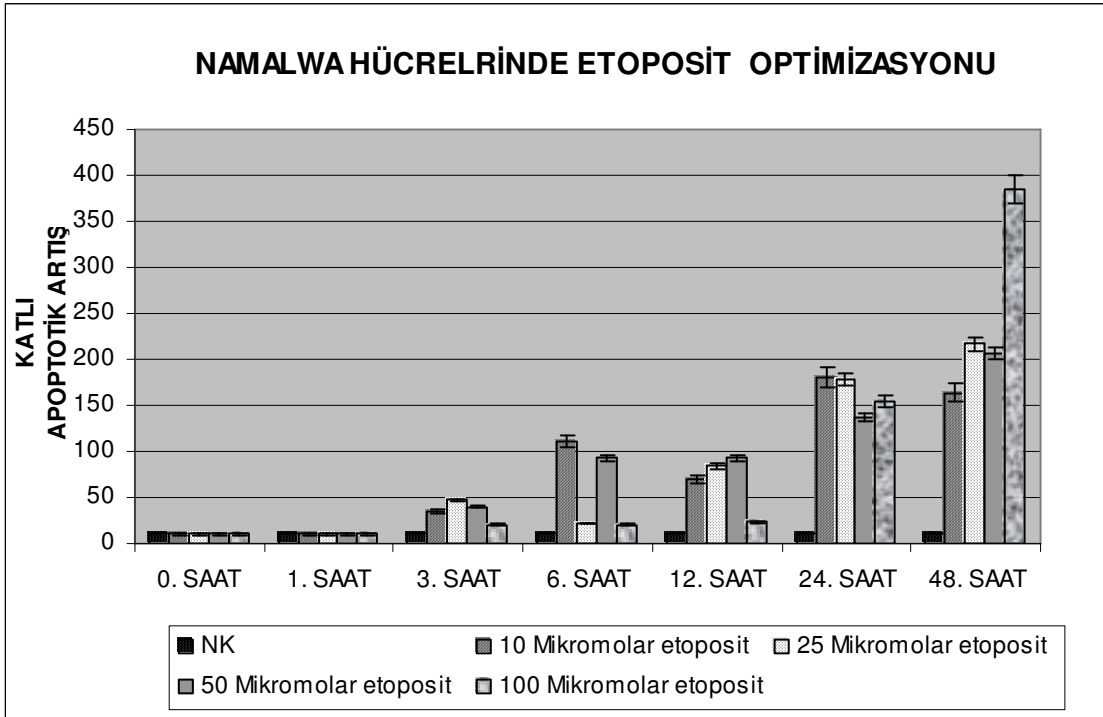


B)

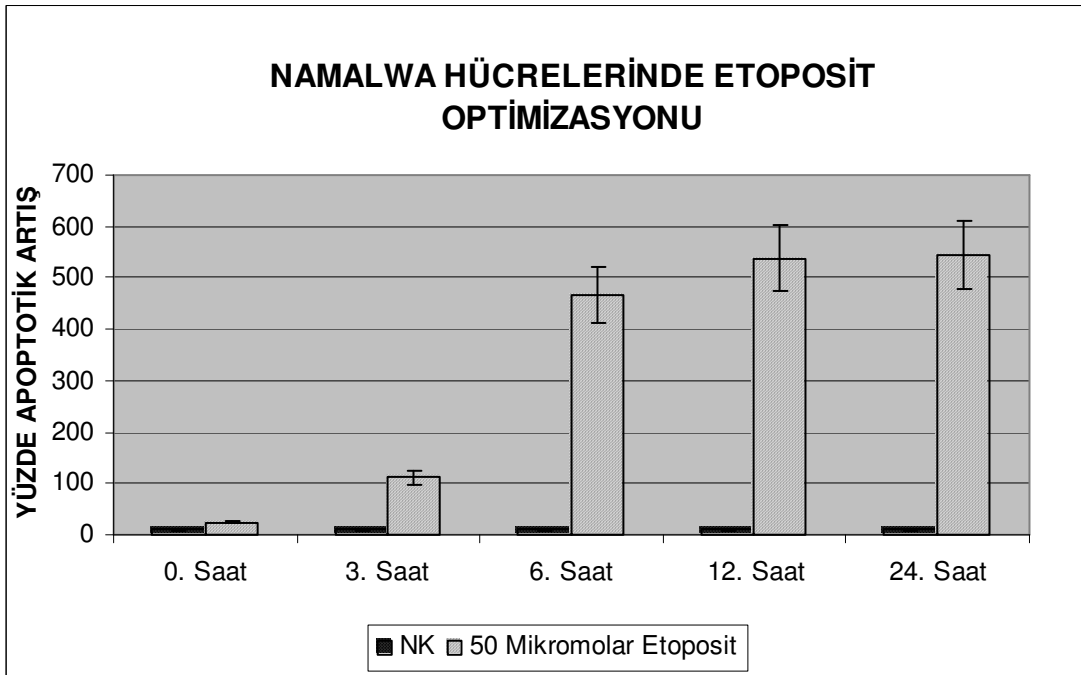


Tablo 13. Namalwa hücrelerinde etoposit doz ve süresi optimizasyonu A) 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda etoposit eklendikten sonra 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK. Normal kontrol). B) 50 μ M konsantrasyonda etoposit eklendikten sonra 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).

A)

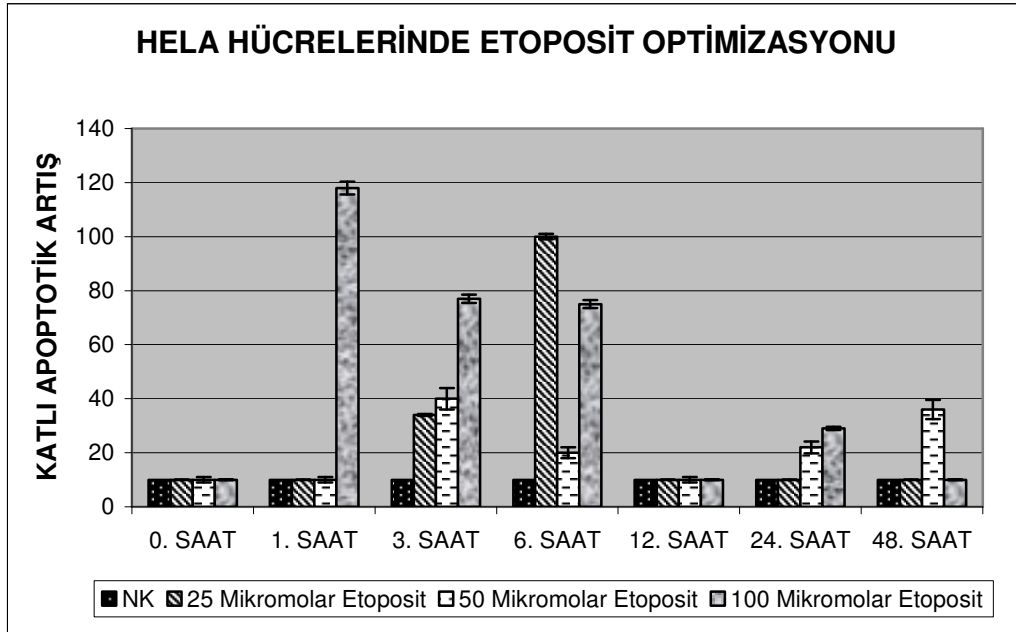


B)

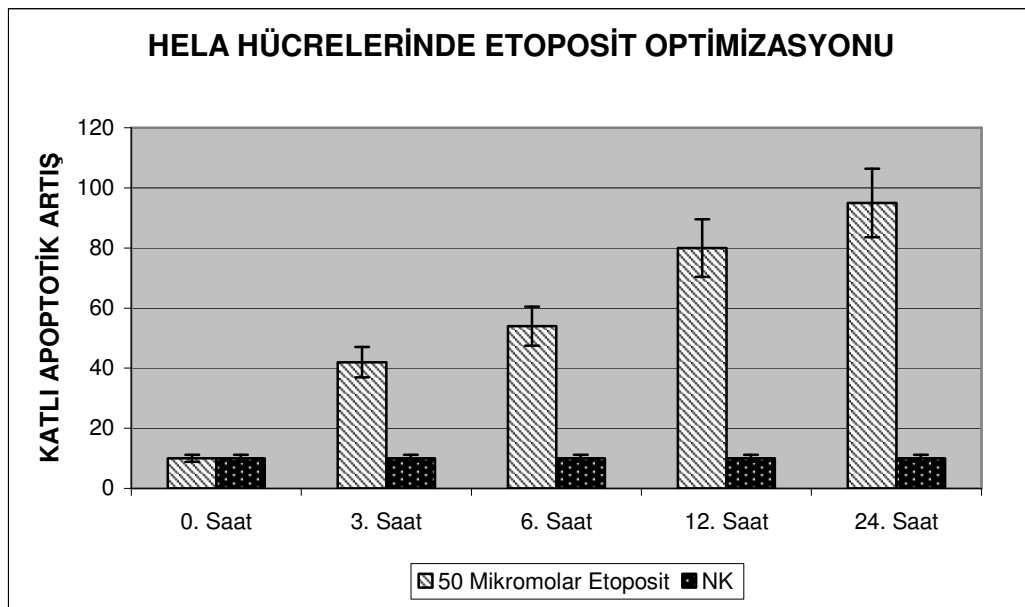


Tablo 14. HeLa hücrelerinde etoposit doz ve süresi optimizasyonu A) 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda etoposit eklendikten sonra 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK. Normal kontrol). B) 50 μ M konsantrasyonda etoposit eklendikten sonra 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).

A)



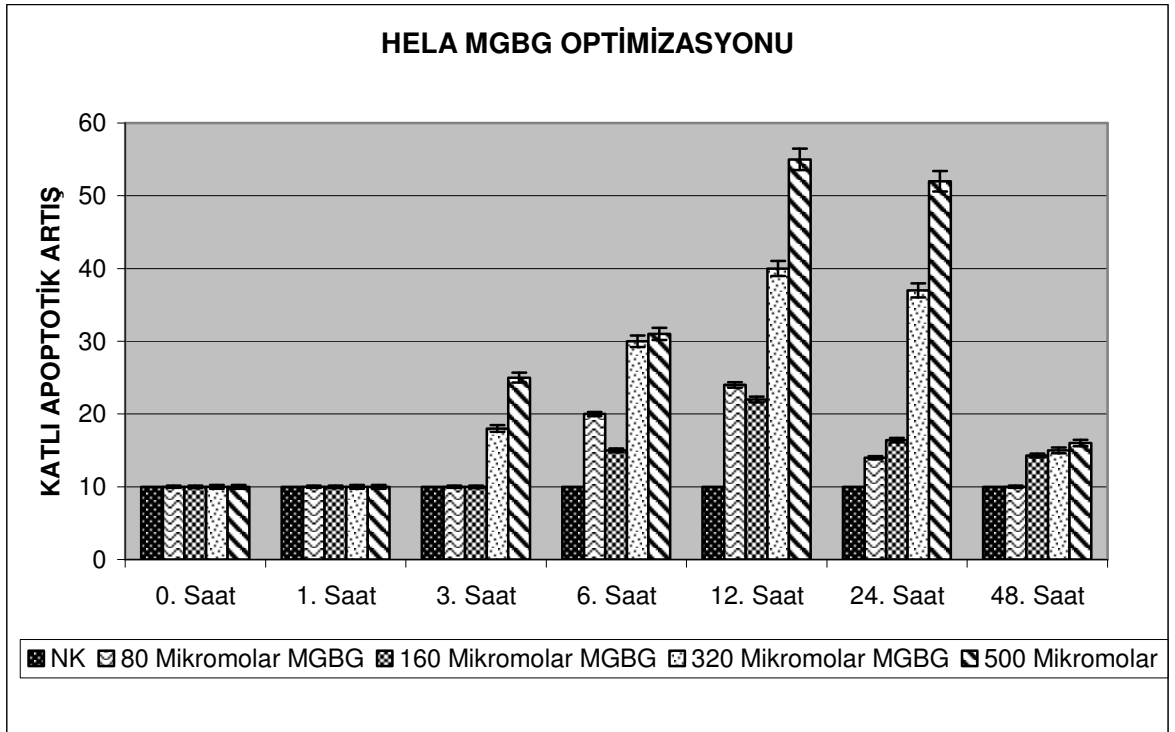
B)



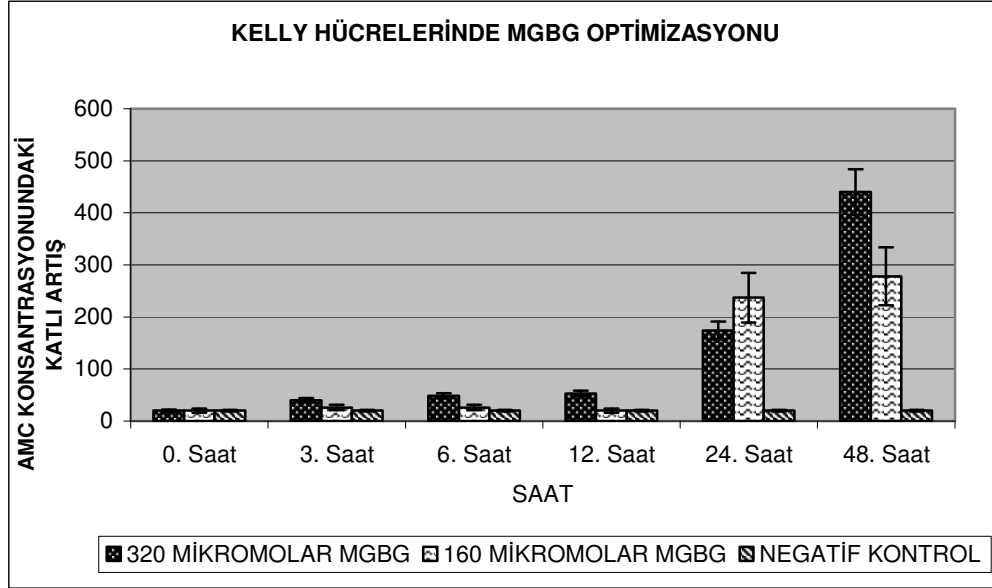
4.1.2.MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhydrazone)) OPTİMİZASYONU:

96 gözlü plate'lere sayım yapılarak her bir gözde 40000 hücre olacak şekilde HeLa, Namalwa ve Kelly hücreleri ekildi. 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 mikromolar konsantrasyonlarda MGBG eklendi. Kaspaz ölçümleri 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapıldı. Özetle her bir MGBG konsantrasyonu için yedi farklı zaman diliminde kaspaz aktivitesi ölçüldü. 320 mikromolar MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhydrazone)) konsantrasyonunda 24 saat inkübasyon süresinin optimum apoptotik etkiyi oluşturduğu görüldü. Elde edilen veriler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

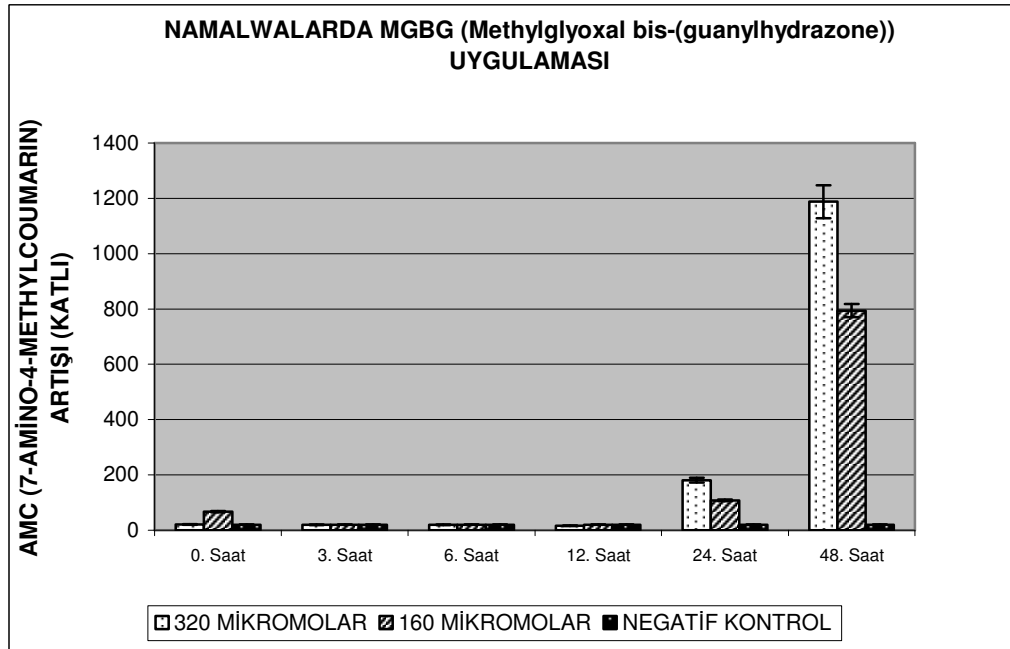
Tablo 15. HeLa hücrelerinde MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhydrazone)) doz ve süresi optimizasyonu. 80, 160, 320 ve 500 µM konsantrasyonlarda etoposit eklendikten sonra 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).



Tablo 16. Kelly hücrelerinde MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhidrazone)) doz ve süresi optimizasyonu. 160 ve 320 µM konsantrasyonlarda etoposid eklendikten sonra 0, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).



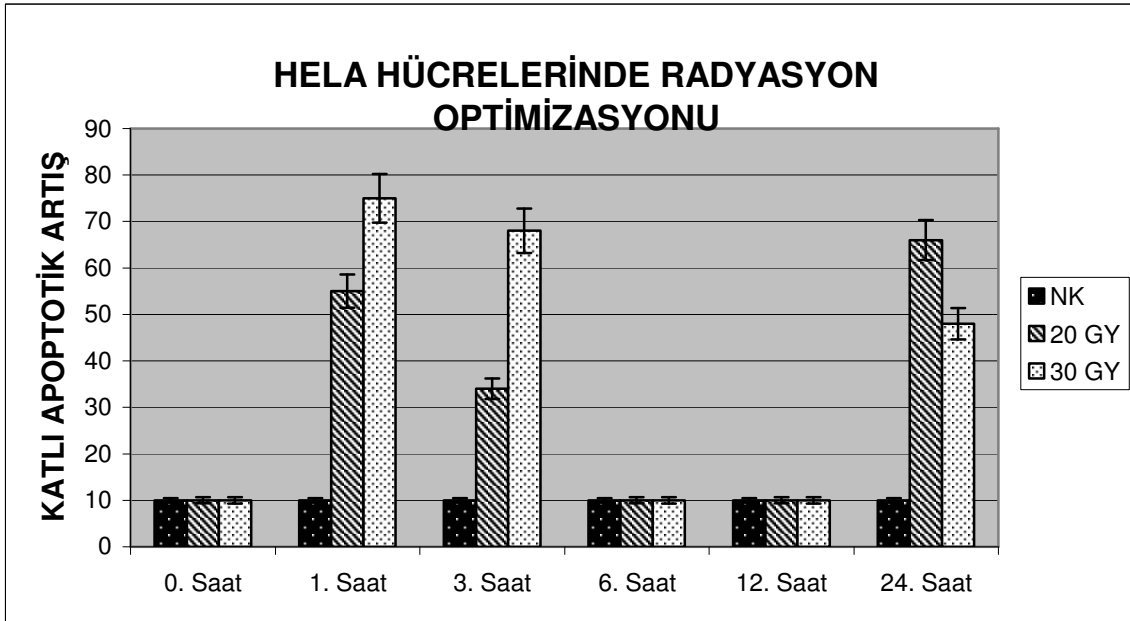
Tablo 17. Namalwa hücrelerinde MGBG (methylglyoxal bis-(guanylhidrazone)) doz ve süresi optimizasyonu. 160 ve 320 µM konsantrasyonlarda etoposid eklendikten sonra 0, 3, 6, 12, 24 ve 48. saatlerde yapılan kaspaz 3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).



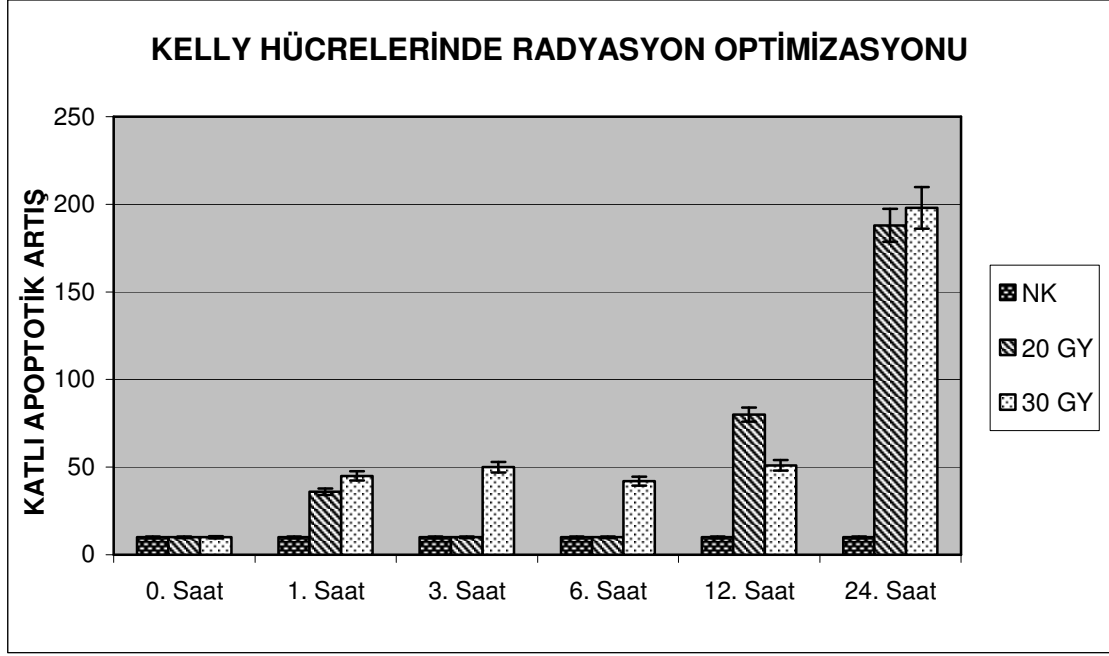
4.1.3. RADYASYON OPTİMİZASYONU:

96 gözlü plate'lere sayım yapılarak her bir gözde 40000 hücre olacak şekilde HeLa, Namalwa ve Kelly hücreleri ekildi. 5, 10, 20 ve 30 Gy Kobalt-60 radyasyonuna maruz bırakıldı. Kaspaz ölçümleri 0, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlerde yapıldı. Her bir radyasyon dozu için yedi farklı zaman diliminde kaspaz aktivitesi ölçüldü. 30 Gy Kobalt-60 radyasyon uygulanmasının ve 24 saat inkübasyon süresinin optimum apoptotik etkiyi oluşturduğu görüldü. Elde edilen veriler aşağıdaki tablolarda verilmiştir (5 ve 10 Gy radyasyon uygulamalarının hücre hatlarında herhangi bir apoptotik etki oluşturmadığı gözlemlendiğinden, 20 ve 30Gy uygulama sonuçları verilmiştir).

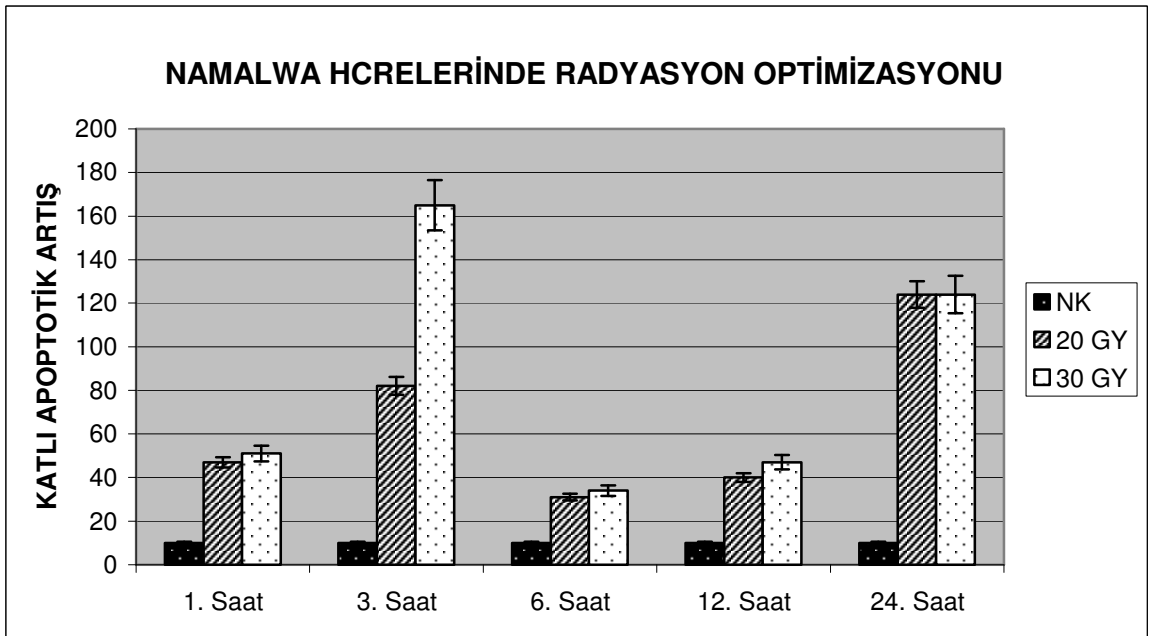
Tablo 18. HeLa hücrelerinde radyasyon doz ve süresi optimizasyonu. 20 ve 30Gy non-fraksiyone radyasyona maruz bırakıldıktan sonra 0, 1, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde yapılan kaspaz-3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).



Tablo 19. Kelly hücrelerinde radyasyon doz ve süresi optimizasyonu. 20 ve 30Gy non-fraksiyone radyasyona maruz bırakıldıktan sonra 0, 1, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde yapılan aspaz-3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).



Tablo 20. Namalwa hücrelerinde radyasyon doz ve süresi optimizasyonu. 20 ve 30Gy non-fraksiyone radyasyona maruz bırakıldıktan sonra 0, 1, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde yapılan aspaz-3 ölçüm sonuçları (NK, Normal kontrol).



4.1.4. MGBG ve Etoposit'in Kaspaz 8 veya 9 Yolaklarından Hangisi Üzerinden Etki

Ettiğinin Belirlenmesi :

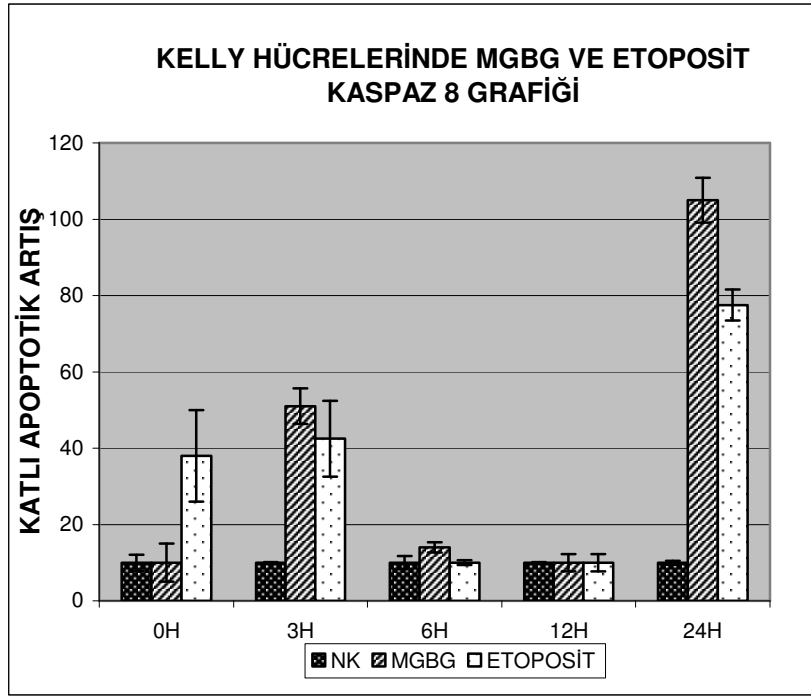
Radyasyonun apoptozu intrinsik yolla kaspaz 9/ mitokondrial yolak üzerinden tetiklediği bilinmektedir. Etoposit de radyasyon gibi çift iplikli DNA kırıklarına neden olması sebebiyle aynı yolla etki etmesi beklenir. MGBG'nin de bir poliamin inhibitörü olması ve hücre ölüm resptörleri ile doğrudan bir ilişkisinin olmaması sebebiyle aynı şekilde etki göstermesi beklenmektedir. Ancak bu beklentilerin deneysel olarak da gösterilmesi amacıyla "CASPASE GLO 8 ve 9" kitleri ile analiz yapılmıştır. Bunun için Tablo 21' de gösterildiği gibi 96 gözlü platelerde 12' şer kuyuya 15' er bin hücre ekilmiştir. 320 Mikromolar MGBG ve 50 mikromolar etoposit eklendikten 0, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktiviteleri plate okuyucuda lüminesansları ölçülerek belirlenmiştir.

MGBG ve etoposit apoptotik ajanlarının Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 deney sonuçları Tablo 22 ve 23' de verilmiştir. Mitokondriyel yolakda önce etkileşen kaspaz 9, MGBG ve etoposit uygulanmış hücrelerde erken evrede belirgin şekilde yükselmiştir. Buna karşın kaspaz 8 aktivasyonunun geç evrede ortaya çıktığı gözlenmektedir. Bu gözlem MGBG ve etopositin mitokondriyel yolak üzerinden apoptotik etki gösterdiği şeklindeki bekletimizi desteklemektedir.

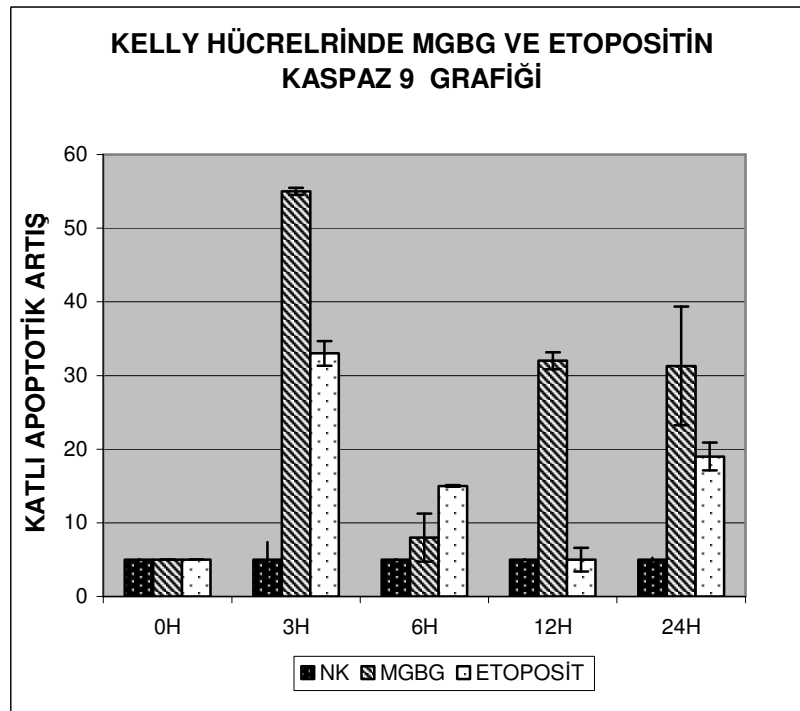
Tablo 21 Kaspaz 8/9 deneyi grupları

CASPASE GLO 8 UYGULANAN			CASPASE GLO 9 UYGULANAN		
0.Saat Negatif kontrol	0.Saat 500 µM MGBG uygulan	0.Saat 50 µM etoposit uygulan	0.Saat Negatif kontrol	0.Saat 500 µM MGBG uygulan	0.Saat 50 µM etoposit uygulan
3.Saat Negatif kontrol	3.Saat 500 µM MGBG uygulan	3.Saat 50 µM etoposit uygulan	3.Saat Negatif kontrol	3.Saat 500 µM MGBG uygulan	3.Saat 50 µM etoposit uygulan
6.Saat Negatif kontrol	6.Saat 500 µM MGBG uygulan	6.Saat 50 µM etoposit uygulan	6.Saat Negatif kontrol	6.Saat 500 µM MGBG uygulan	6.Saat 50 µM etoposit uygulan
12.Saat Negatif kontrol	12.Saat 500 µM MGBG uygulan	12.Saat 50 µM etoposit uygulan	12.Saat Negatif kontrol	12.Saat 500 µM MGBG uygulan	12.Saat 50 µM etoposit uygulan
24.Saat Negatif kontrol	24.Saat 500 µM MGBG uygulan	24.Saat 50 µM etoposit uygulan	24.Saat Negatif kontrol	24.Saat 500 µM MGBG uygulan	24.Saat 50 µM etoposit uygulan

Tablo 22. Kelly Hücrelerinde MGBG Ve Etopositin Kaspaz 8 Yoluğında Etkisi



Tablo 23. Kelly Hücrelerinde MGBG Ve Etopositin Kaspaz 9 Yoluğında Etkisi



4.2. siRNA OPTİMİZASYONU DENEY SONUÇLARI:

4.2.1. mRNA DÜZEYİNDE LIPID/ siRNA ORANI OPTİMİZASYONU

SONUÇLARI:

Altı gözlü platelerin sekiz gözüne 250' şer bin HeLa hücresi ekildi. Gözlerdeki hücrelerin ikişer tanesine ½ ve ¼ oranlarında lipid ve ½ ve ¼ oranlarında lipid + 100 nM TAF7- D siRNA transfekte edildi. Lipid dilisyonları tablo 24 ve transfeksiyon grupları tablo 25' de verilmiştir. Gözlerden birinden 24 saat sonra diğerinden ise 48 saat sonra total mRNA izolasyonu yapıldı. Reverse transkriptaz enzimi ile izole edilen RNA' lardan cDNA elde edildi. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile TAF7 ekspresyon düzeyleri kontrol edildi.

Tablo 24. Lipid dilüsyonlarının hazırlaması:

	Serumsuz			
	Ortam	Lipit	siRNA ANA KARIŞIMI	Son Hacim
½ Lipid + 100 nM siRNA	90 µl	10 µl 1:2 dilüsyon	100µl	200 µl
¼ Lipid + 100 nM siRNA	90 µl	10 µl 1:4 dilüsyon	100µl	200 µl
½ Lipid	190 µl	10 µl 1:2 dilüsyon	-	200 µl
¼ Lipid	190 µl	10 µl 1:4 dilüsyon	-	200 µl

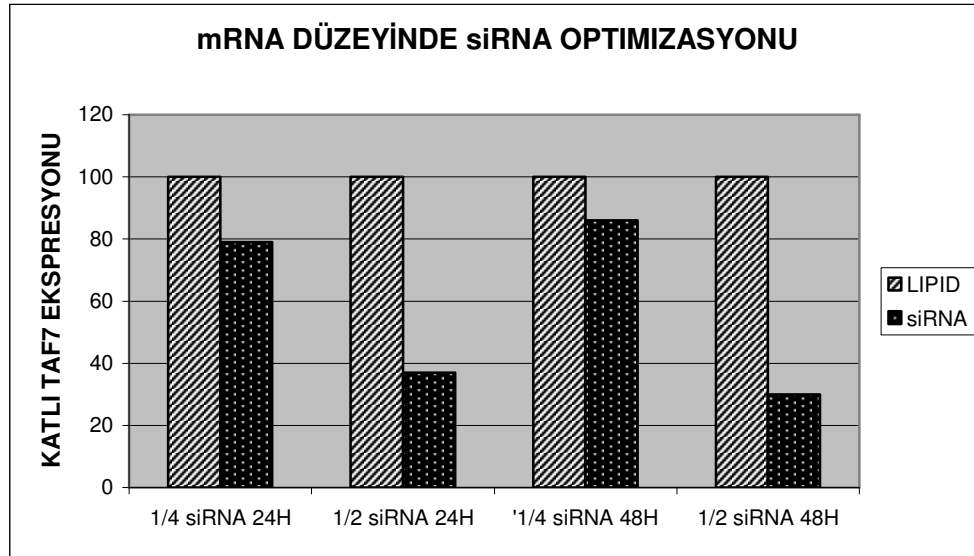
Karışımlar hazırlandıktan sonra 30 dakika bekletilip üzerlerine 800' er µl serumlu besi ortamı eklendi.

Tablo 25. mRNA Düzeyinde Transfeksiyon optimizasyonu planı

24 SAAT	48 SAAT
½ Lipid uygulanan	½ Lipid uygulanan
¼ Lipid uygulanan	¼ Lipid uygulanan

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları Tablo 26 da verilmiştir:

Tablo 26. mRNA düzeyinde siRNA/ lipid oranı ve süre optimizasyon sonuçları



Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına göre 1/2 lipid dilüsyonunun 1/4 dilüsyonuna göre daha fazla baskılanma oluşturduğu görülmüştür. Bu nedenle 1/2 lipid dilüsyonunun kullanılmasına karar verilmiştir. Bundan sonraki deneylerimizde 1/2 lipid dilüsyonu HeLa ve Kelly hücre hatlarında kullanıldı. Namalwa hücre hattının süspansiyon kültür olması nedeniyle, lipozomal transfeksiyonun optimizasyonu halen sürmektedir. Lipozomal yöntemle yüksek verimlilik elde edilememesi halinde bu hücre hattı için elektroporasyon

yöntemine geçilecektir. Bu nedenle bundan sonraki tüm deneyler sadece HeLa ve Kelly hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir.

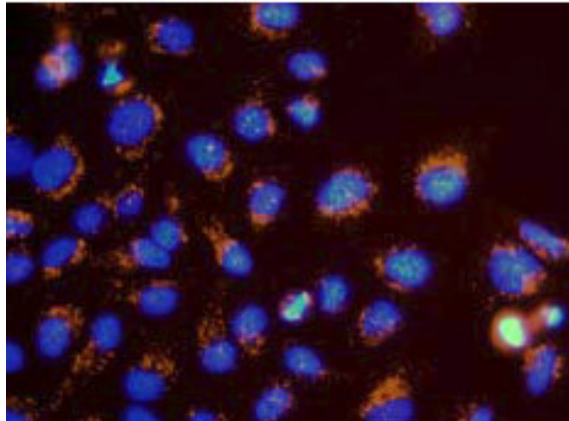
4.2.2 siGLO TRANSFEKSİYON KONTROLÜ:

siGLO, RISC içermeyen siRNA kontrolü, transfeksiyonun gerçekleştiğinin görsel olarak floresan mikroskopunda izlenmesine olanak verdiği için önemlidir. Floresan ışık vermesi nedeniyle transfeksiyon verimliliğinin doğrudan gözlenmesine olanak vermektedir. siRNA deneylerinde transfeksiyon verimliliğinin yüksek olması çok önemlidir. Düşük transfeksiyon verimliliği, siRNA'nın kendisi çok iyi baskılama özelliğine sahip olsa dahi deneylerde sonuç alınmasını engelleyecektir.

Dharmacon firmasının yayınladığı örnek siGLO transfeksiyon görüntüsü Resim 1'de, siRNA transfeksiyon deneylerimiz sonrasında elde ettiğimiz kontrol ve siGLO transfekte hücre görüntülerine tipik birer örnek ise Resim 2' de verilmiştir.

Resim 1. Dharmacon' un örnek siGLO transfeksiyonu floresan mikroskobu görüntüsü

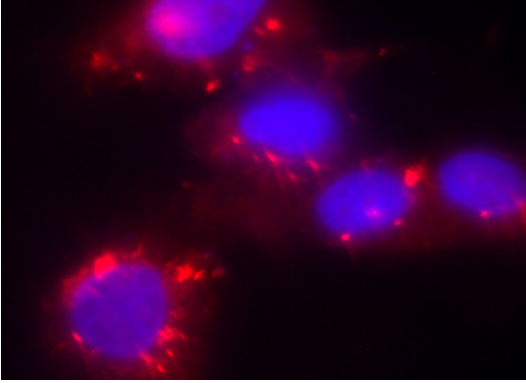
(Dharmacon, Protocol Handbook #00013-05-F-04-U Control Products for RNA Interference, Version 3.2.)



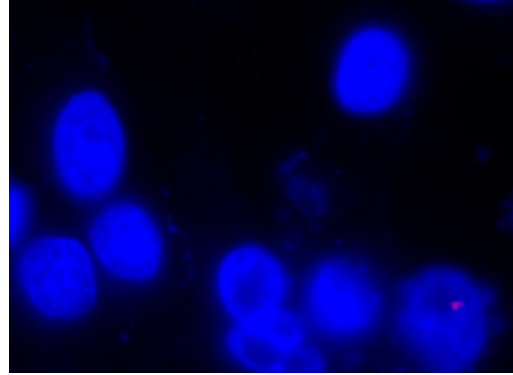
Resim 2. Kontrol ve siGLO siRNA Transfeksiyon sonrası floresan mikroskopi görüntüleri

A) siGLO transfeksiyon görüntüleri B) Sadece lipid transfeksiyon kontrolü (boş transfeksiyon) C) Non-targetting neaktif siRNA kontrolü

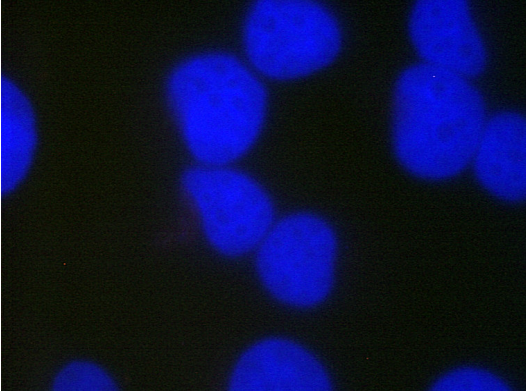
A)



B)



C)

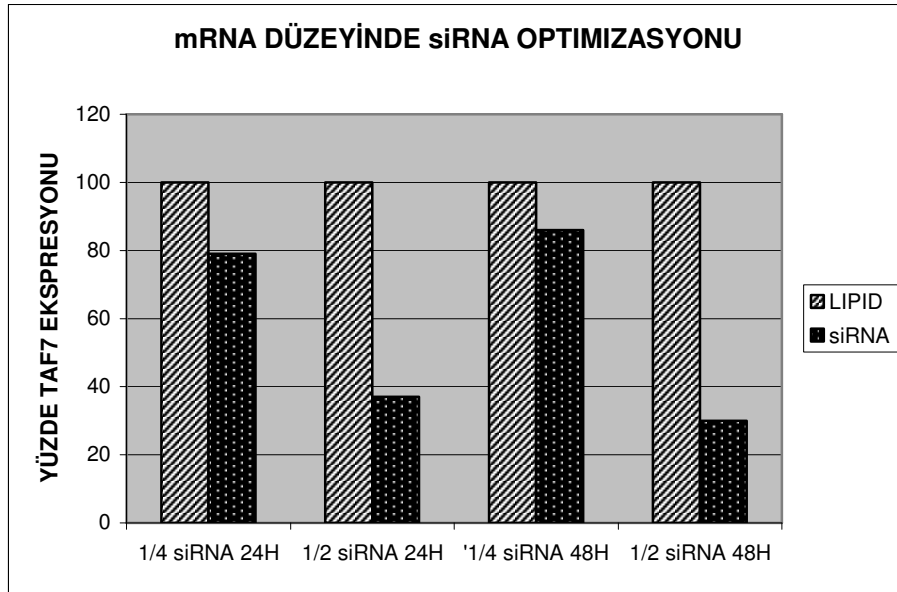


siGLO Transfeksiyonu yaptığımız hücrelerin görüntüleri ile Dharmacon' un örnek siGLO transfeksiyon görüntüleri örtüşmekte tekrarlayan deneyler sonucu transfeksiyon verimliliğimizin %80 ve üstünde olduğunu göstermektedir. Transfeksiyon yöntemimizin siRNA deneyleri için kullanılabilir olduğunu kanıtlamaktadır.

4.2.3 mRNA DÜZEYİNDE siRNA İLE TAF7 EKSPRESYONUNUN AZALTILDIĞININ GÖSTERİLMESİ

TAF7 baskılanmasının mRNA düzeyinde gerçekleştiğini göstermek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi seçilmiştir. mRNA düzeyindeki baskılanmanın ½ lipid dilisyonunda %70'in üstünde olduğu izlenmiştir.

Tablo 27. siRNA ile TAF7 ekspresyonunun baskılanması gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucu



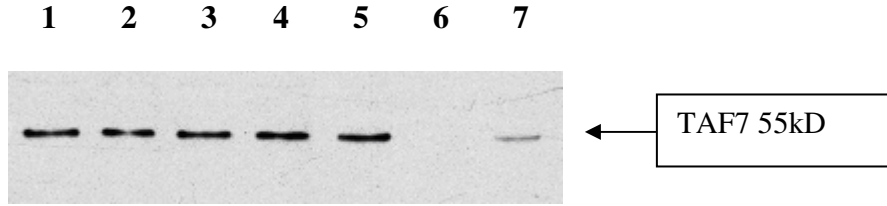
4.2.4. PROTEİN DÜZEYİNDE siRNA İLE TAF7 EKSPRESYONUNUN AZALTILDIĞININ GÖSTERİLMESİ:

Apoptoz deneylerine geçmeden önce TAF7 siRNA transfeksiyonu sonucunda hücre içi TAF7 protein düzeyinde baskılanmanın gerçekleştiğinden emin olmamız gerekmektedir. TAF7 baskılanmasının protein düzeyinde de gerçekleştiğini göstermek amacıyla western blot yöntemi

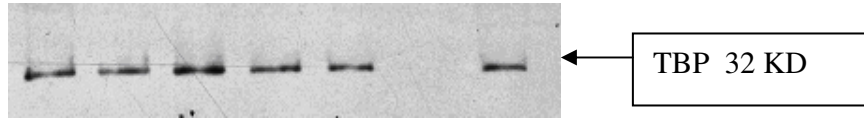
seçilmiştir. Her iki hücre hattında protein düzeyindeki baskılamanın %70'in üstünde olduğu izlenmiştir. TAF7 siRNA transfekte edilen Kelly ve HeLa hücre hatlarının western blot görüntüleri aşağıda Resim 3 ve Resim 4'de verilmiştir:

Resim 3. TAF7 siRNA Transfeksiyonu Yapılan Kelly Hücre Hattında TAF7 proteininin western blot ile gösterilmesi. A) Kuyu 1, Kelly normal hücre lizatı; 2, lipid (boş lipozom) transfeksiyonu uygulanan Kelly hücre lizatı; 3, lamin A/C siRNA transfekte Kelly hücre lizatı; 4, non-targetting siRNA transfekte Kelly hücre lizatı; 5, RISC Free siRNA transfekte Kelly hücre lizatı; 6, boş kuyu; 7, TAF7 siRNA transfekte Kelly hücre lizatı B) Aynı membran "strip" edilib antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra kuyu yükleme kontrolü olarak TBP antikorunu ile tekrar blotlandı. C) Transfeksiyon verimliliği siGLO ile %80 olarak izlenmiştir.

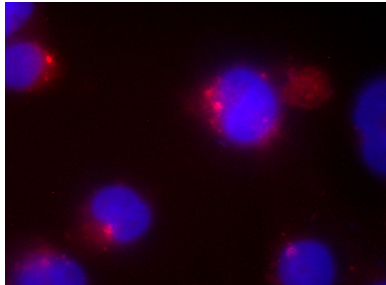
A)



B)

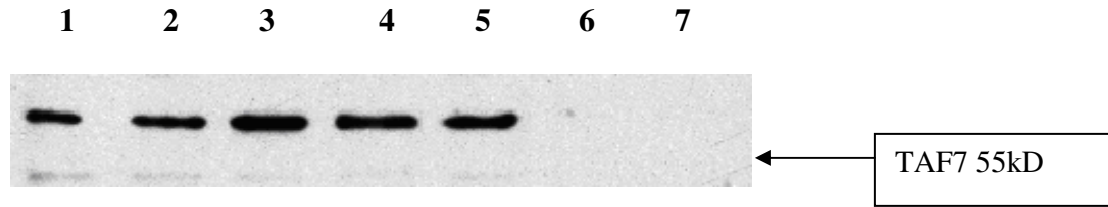


C)

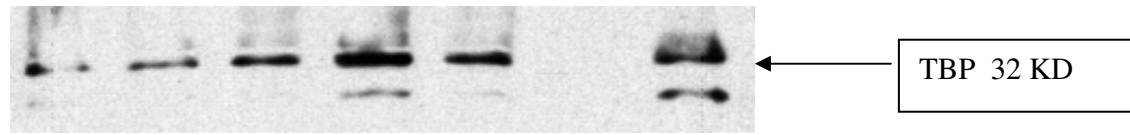


Resim 4. TAF7 siRNA Transfeksiyonu Yapılan HeLa Hücre Hattında TAF7 proteininin western blot ile gösterilmesi. A) Kuyu 1, HeLa normal hücre lizati; 2, lipid (boş lipozom) transfeksiyonu uygulanan HeLa hücre lizati; 3, lamin A/C siRNA transfekte HeLa hücre lizati; 4, non-targetting siRNA transfekte HeLa hücre lizati; 5, RISC Free siRNA transfekte HeLa hücre lizati; 6, boş kuyu; 7, TAF7 siRNA transfekte HeLa hücre lizati B) Aynı membran “strip” edillip antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra kuyu yükleme kontrolü olarak TBP antikoruna ile tekrar blotlandı. C) Transfeksiyon verimliliği siGLO ile %75 olarak izlenmiştir.

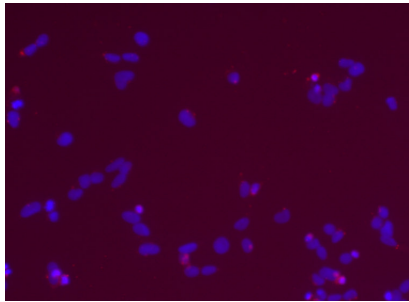
A)



B)



C)



HeLa ve Kelly hücrelerinin TAF7 antikoruna ile western görüntülerine göre TAF7 protein ekspresyonu, normal, sadece lipid uygulanmış ve kontrol siRNA transfeksiyonları yapılmış olan hücrelerde eşit seviyede iken, TAF7 siRNA' ları ile transfekte edilen hücrelerde çok büyük oranda azalmıştır. Aynı membran TBP antikoruna ile blotlandığında ise tüm kuyulara eşit miktarda

protein eklendiği gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak siGLO transfeksiyonu yapılmıştır. Floresan mikroskobu görüntülerinden de siGLO transfeksiyonunun gerçekleştiği anlaşılmaktadır. siRNA yöntemi ile TAF7 protein ekspresyonunun büyük ölçüde baskılandığı gösterildikten sonra bu baskılanmanın apoptotik sürece olan etkilerini incelemeye geçebiliriz.

4.3. APOPTOZ DENEYLERİ:

4.3.1. TAF7 Ekspresyonunun Baskılanmasının Etoposit ile Tetiklenmiş Apoptoz Süreci

Üzerindeki Etkisi:

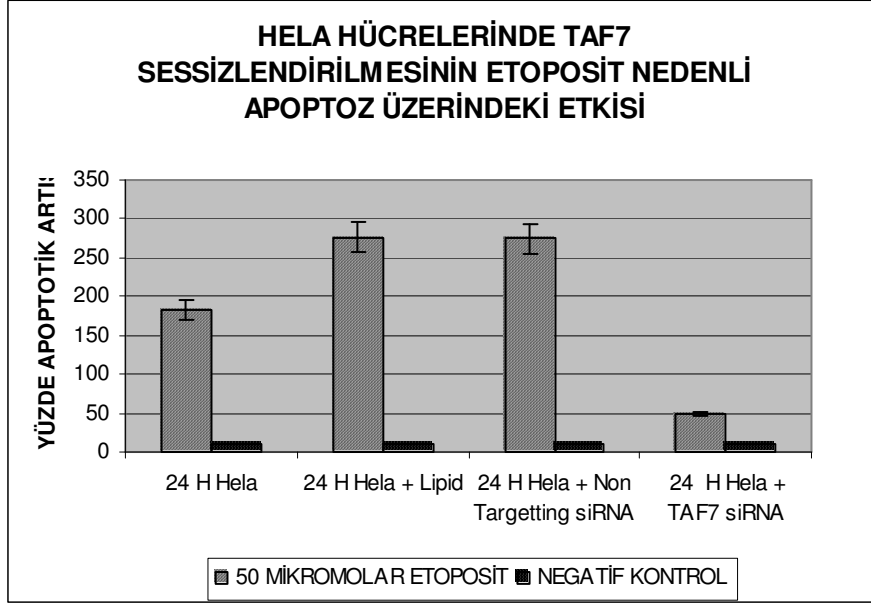
TAF7 ekspresyonunun baskılanmasının etoposit ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması için Tablo 28’de gösterildiği gibi HeLa ve Kelly hücreleri her bir göze 250 şer bin hücre düşecek şekilde 6 gözlü platelere ekildi.

Tablo 28. TAF7 baskılanmasının etoposit ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisini inceleme amacıyla oluşturulmuş deneyi grupları

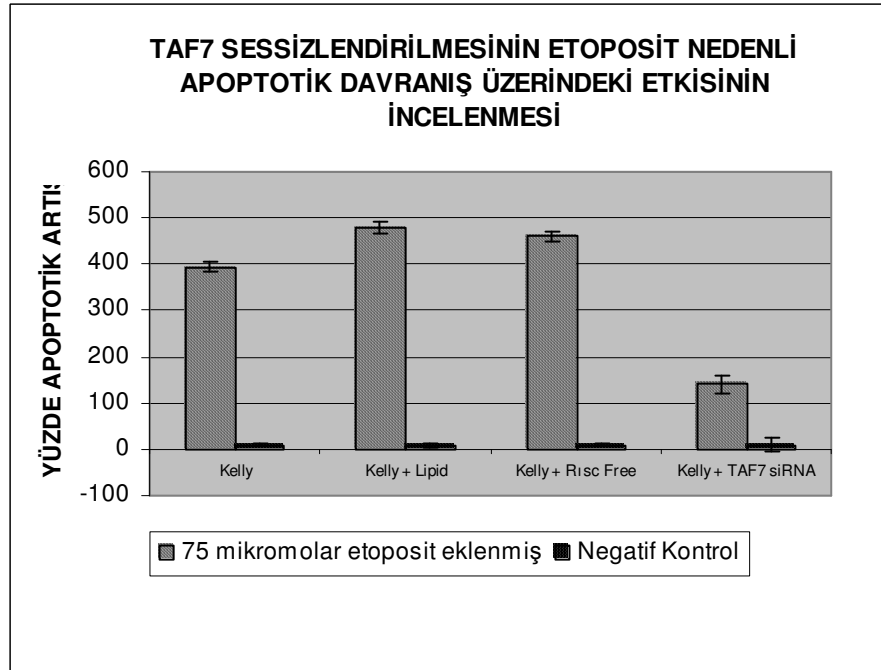
KONTROL	50 MİKROMOLAR ETOPOSİT UYGULANMIŞ
NORMAL LIPID UYGULANAN NEGATİF KONTROL siRNA ile TRANSFEKTE TAF7 siRNA ile TRANSFEKTE	NORMAL LIPID UYGULANAN NEGATİF KONTROL siRNA ile TRANSFEKTE TAF7 siRNA ile TRANSFEKTE

Kontrol ve TAF7 siRNA transfeksiyonundan 24h sonra 50 mikromolar etoposit ile hücreler inkübe edildi. 24h sonra Fluorometric Caspase 3 Assay Kit (Sigma) ile apoptozun bir göstergesi olan kaspaz aktivasyonu ölçüldü. ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 29.’ da ve Tablo 30.’ de verilmiştir.

Tablo 29. HeLa Hücrelerinde TAF7 sessizlendirilmesinin etoposit ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisi



Tablo 30. Kelly Hücrelerinde TAF7 sessizlendirilmesinin 50 Mikromolar etoposit ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisi



Tablo 31. TAF7 baskılanmasının MGBG (methylglyoxal bis – guanylhydrazone) ile uyarılmış apoptoz üzerindeki etkisini inceleme amacıyla oluşturulmuş deneyi grupları

KONTROL	320 MİKROMOLAR MGBG UYGULANAN
NORMAL LIPID UYGULANAN NEGATİF KONTROL siRNA ile TRANSFEKTE TAF7 siRNA ile TRANSFEKTE	NORMAL LIPID UYGULANAN NEGATİF KONTROL siRNA ile TRANSFEKTE TAF7 siRNA ile TRANSFEKTE

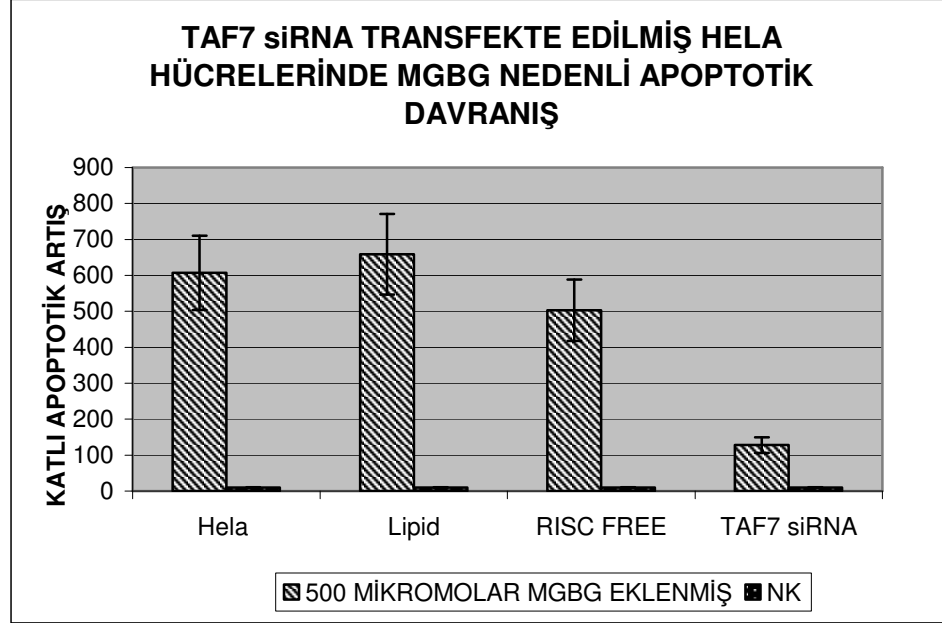
TAF7 ekspresyonunun baskılandığı deney grubunda, etoposid ile uyarılan apoptoz kontrollere göre 4 kat azalmıştır. TAF7 ekspresyonunun baskılanması Kelly ve HeLa hücrelerinde etoposid ile tetiklenen programlanmış hücre ölümüne dirençli hale getirmiştir.

4.3.2. TAF7 Ekspresyonunun Baskılanmasının MGBG (methylglyoxal bis – guanylhydrazone) ile Uyarılan Apoptoz Üzerindeki Etkisi:

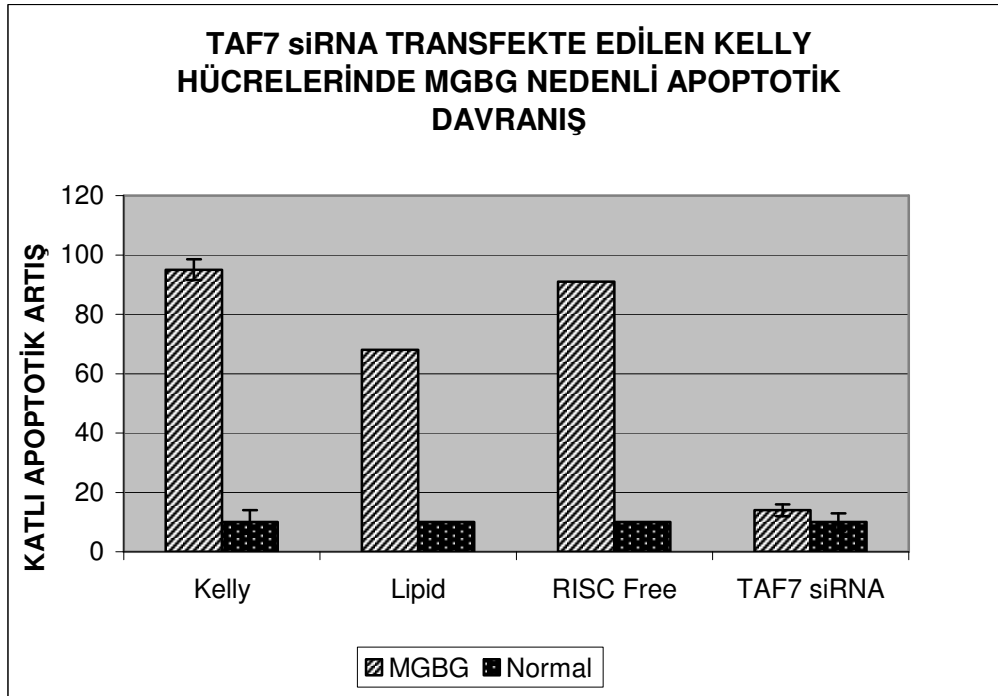
TAF7 ekspresyonunun baskılanmasının MGBG (methylglyoxal bis – guanylhydrazone) nedenli apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması için Tablo 31’ de anlatıldığı gibi HeLa ve Kelly hücreleri her bir göze 250 şer bin hücre düşecek şekilde 6 gözlü platalere ekildi.

Kontrol ve TAF7 siRNA transfeksiyonundan 24h sonra 320 mikromolar MGBG ile hücreler inkübe edildi. 24h sonra Fluorometric Caspase 3 Assay Kit (Sigma) ile apoptozun bir göstergesi olan kaspaz aktivasyonu ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 32.’ de ve Tablo 33’ de verilmiştir

Tablo 32. HeLa hücrelerinde MGBG ile uyarılmış apoptoza davranışta TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi



Tablo 33. Kelly hücrelerinde MGBG ile uyarılmış apoptoza davranışta TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi



TAF7 ekspresyonunun baskılandığı deney grubunda, MGBG ile uyarılan apoptoz kontrollere göre HeLa hücrelerinde 6, Kelly hücrelerinde yaklaşık 9 kat azalmıştır. TAF7 ekspresyonunun baskılanması Kelly ve HeLa hücrelerinde MGBG ile tetiklenen programlanmış hücre ölümüne dirençli hale getirmiştir.

4.3.3. TAF7 Ekspresyonunun Baskılanmasının Radyasyonla Tetiklenen Apoptoz

Üzerindeki Etkisi:

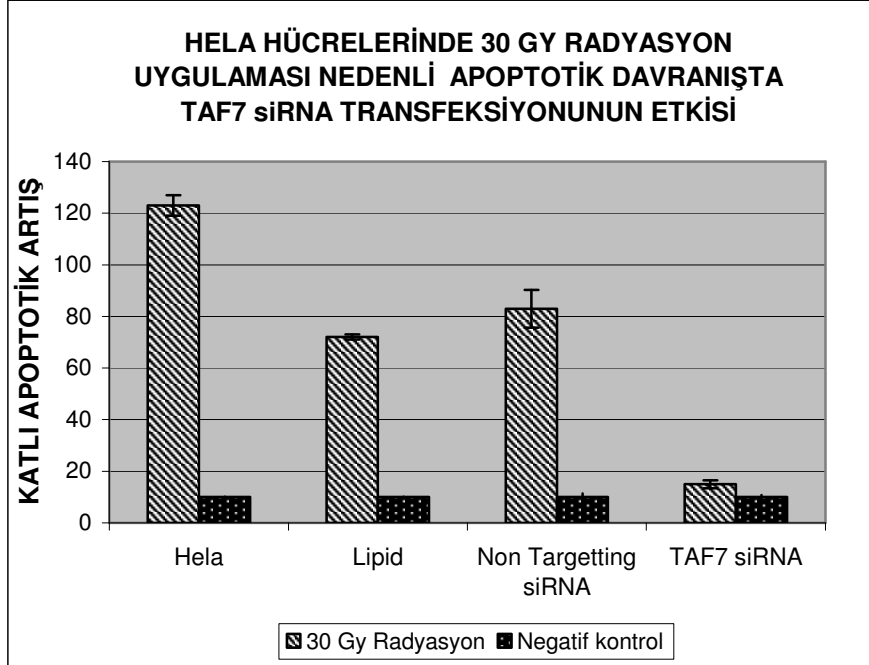
TAF7 ekspresyonunun baskılanmasının radyasyon nedenli apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması için Tablo 34’ de anlatıldığı gibi HeLa ve Kelly hücreleri her bir göze 250 şer bin hücre düşecek şekilde 6 gözlü planelere ekildi.

Tablo 34. TAF7 ekspresyonu baskılanmasının radyasyon nedenli apoptoz üzerindeki etkisi deneyi grupları

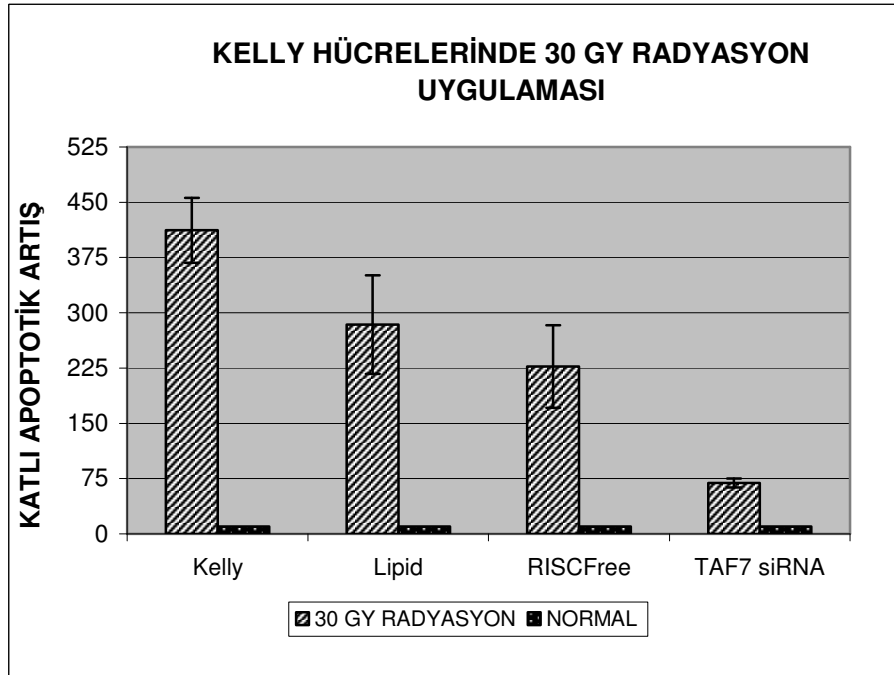
KONTROL	30 GY KOBALT 60 RAYASYONU UYGULANAN
NORMAL	NORMAL
LIPID UYGULANAN	LIPID UYGULANAN
NEGATİF KONTROL siRNA ile	NEGATİF KONTROL siRNA ile
TRANSFEKTE	TRANSFEKTE
TAF7 siRNA ile TRANSFEKTE	TAF7 siRNA ile TRANSFEKTE

Kontrol ve TAF7 siRNA transfeksiyonundan 24h sonra hücreler 30 Gy gama radyasyona maruz bırakıldı. 24h hücreler inkübe edildi. 24h sonra Fluorometric Caspase 3 Assay Kit (Sigma) ile apoptozun bir göstergesi olan kaspaz aktivasyonu ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 35’ de ve Tablo 36.’ de verilmiştir.

Tablo 35. HeLa hücrelerinde radyasyon ile tetiklenen apoptozda TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi



Tablo 36. Kelly hücrelerinde radyasyon ile tetiklenen apoptozda TAF7 siRNA transfeksiyonunun etkisi



TAF7 ekspresyonunun baskılandığı deney grubunda, radyasyon ile uyarılan apoptoz kontrollere göre Kelly hücrelerinde 4 HeLa hücrelerinde 5 kat azalmıştır. TAF7 ekspresyonunun baskılanması Kelly ve HeLa hücrelerinde etoposid ile tetiklenen programlanmış hücre ölümüne dirençli hale getirmiştir. TAF7 ekspresyonunun baskılanması kullanılan apoptotik ajan ve hücre hattından bağımsız olarak normalde izlenen hücre ölümünü (mitokondrial intrinsik yolak) engellemektedir. Bulgularımız TAF7'nin apoptoz sürecinde bir rolü olabileceği hipotezimizi desteklemektedir. Bulgularımız apoptotik sinyal iletimini transkripsiyonel düzenek ile ilişkilendiren ilk çalışmadır. TAF7'nin transkripsiyonel bir kontrol noktasında görev aldığı görüşü, apoptotik süreçte transkripsiyonun durduğu gerçeği ile birlikte değerlendirildiğinde verilerimiz daha anlam kazanmaktadır.

4.3.4. TAF7 Ekspresyonunun pEGFP TAF7 vektörü ile Arttırılmasının Apoptotik Etkisi:

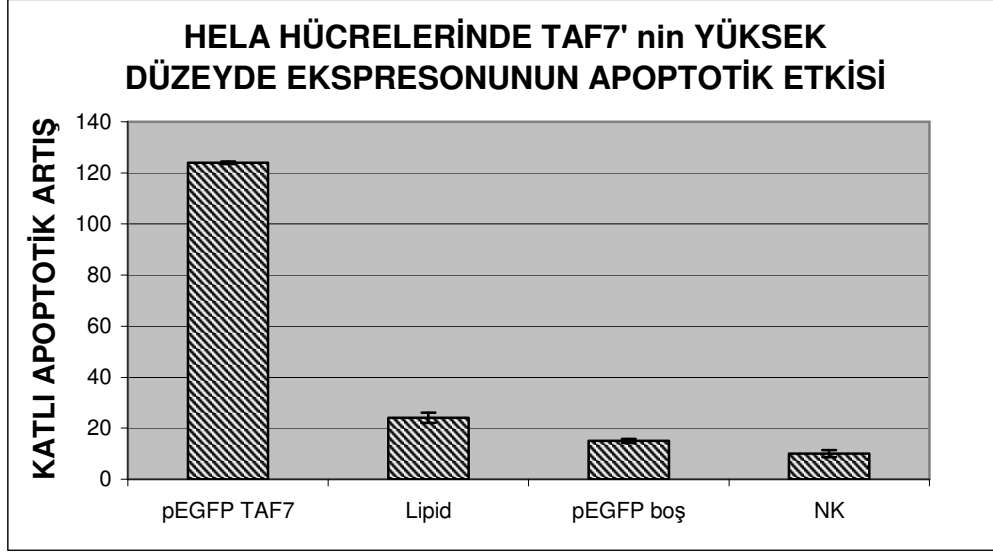
TAF7 ekspresyonunun pEGFP TAF7 vektörü ile arttırılmasının HeLa ve Kelly hücrelerinde apoptotik etkisinin araştırılması için Tablo 37' de anlatıldığı gibi HeLa ve Kelly hücreleri her bir göze 250 şer bin hücre düşecek şekilde 6 gözlü platelere ekildi.

Tablo 37. TAF7 ekspresyonunun pEGFP TAF7 vektörü ile arttırılmasının apoptotik etkisi deney grupları

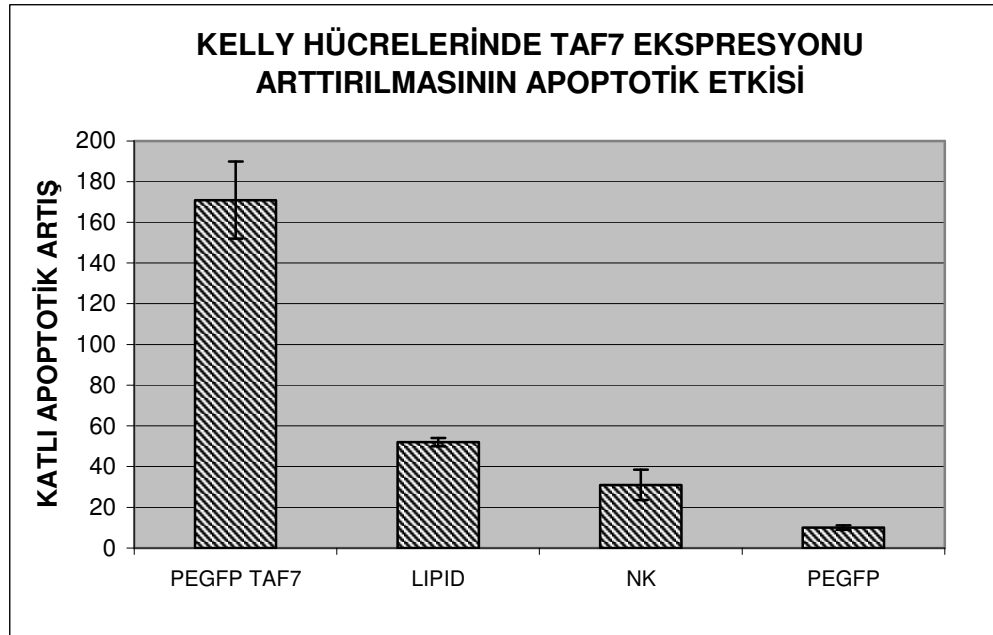
Normal
Lipid (transfeksiyon ajanı) Uygulanan
pEGFP TAF7 ile transfekte
Boş pEGFP ile transfekte

Fluorometric Caspase 3 Assay Kit ile apoptotik davranışları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Tablo 38' de ve Tablo 39' da verilmiştir.

Tablo 38. HeLa Hücrelerinde TAF7' nin yüksek düzeyde ekspresyonunun apoptotik etkisi



Tablo 39. Kelly Hücrelerinde TAF7' nin yüksek düzeyde ekspresyonunun apoptotik etkisi



4.4. TAF7 OVER-EKSPRESYONUNUN MİKROTÜBÜL DİNAMİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ:

HIV ile enfekte olmayan hücrelerde içe alınan sekrete Tat proteininin mikrotübül dinamiklerini bozarak apoptozu uyardığı bilinmektedir. TAF7'nin, HIV Tat'ın işlevsel ökaryotik homoloğu olabileceği görüşünü temel alarak TAF7 over-ekspresyonunun mikrotübül dinamikleri üzerindeki etkisi incelemeyi amaçladık.

Tablo 40' da verilen deney gruplarının oluşturulması amacıyla 9 adet altı gözlü plate gözünde lamel üzerine 120' şer bin Kelly hücresi ekilmiştir. siRNA ve pEGFP TAF7 transfeksiyon işlemlerinden 24 saat sonra taxol grubu bir MDA olan taxol ve mikrotübül depolarizasyonuna neden olan kolçisin kimyasalları eklenmiştir. Kimyasal eklenmesinden 24 saat sonra da alfa tubulin boyaması yapıp floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Floresan mikroskopi görüntüleri Resim 5' de verilmiştir.

Tablo 40. TAF7 over-ekspresyonunun mikrotübül dinamikleri üzerindeki etkisini inceleme amacıyla oluşturulan deney grupları

Normal Kelly

1 Mikromolar taxol eklenen Kelly

pEGFP TAF7 transfekte Kelly

Sadece Fugene uygulanan Kelly

TAF7 siRNA uygulanan Kelly

Negatif kontrol siRNA uygulanan Kelly

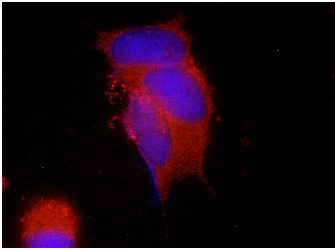
TAF7 siRNA ve taxol uygulanan Kelly

Dharmafect uygulanan Kelly

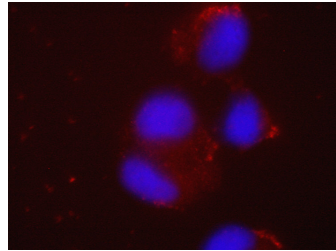
Kolçisin uygulanan Kelly

Resim 5: A) Normal Kelly hücrelerinin tubulin boyama floresan mikroskopisi görüntüleri B) Sadece transfeksiyon ajanı (Fugene) uygulanan Kelly hücrelerinin floresan mikroskopisi görüntüsü C) Sadece siRNA transfeksiyon ajanı (Dharmafect) uygulanan Kelly hücrelerinin floresan mikroskopisi görüntüsü D) Negatif kontrol siRNA uygulanan Kelly hücrelerinin floresan mikroskopisi görüntüsü E) TAF7 siRNA uygulanan Kelly hücrelerinin floresan mikroskopisi görüntüsü F) Kolçisin uygulanan Kelly hücrelerinin tubulin boyama floresan mikroskopisi görüntüsü G), H) ve I) Taxol uygulanan Kelly hücrelerinin tubulin boyama floresan mikroskopisi görüntüleri J) Tubulin boyama yapılmamış Kelly Hücreleri .

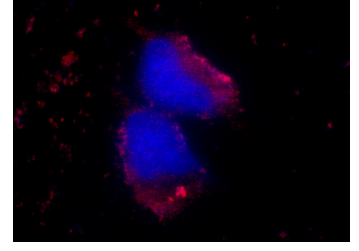
A)



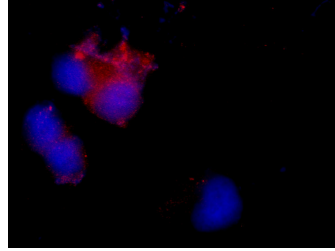
B)



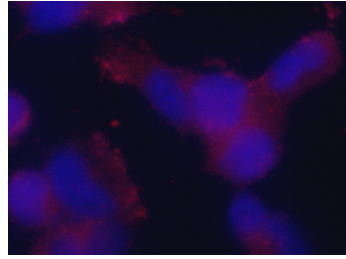
C)



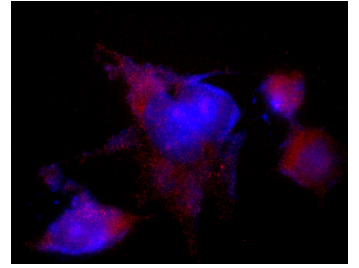
D)



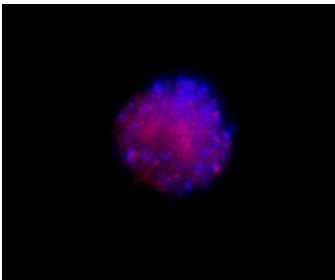
E)



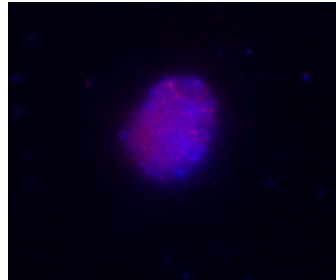
F)



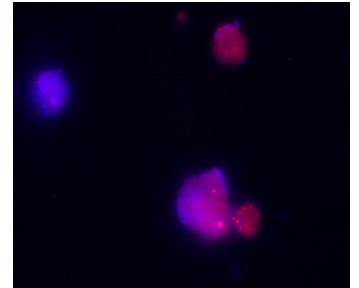
G)



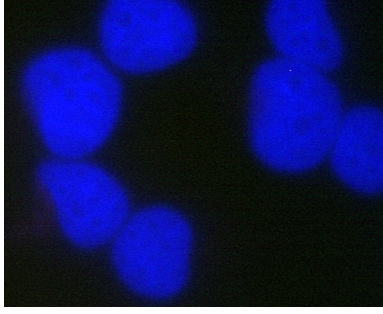
H)



I)

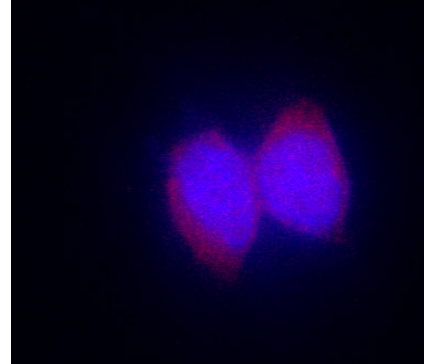
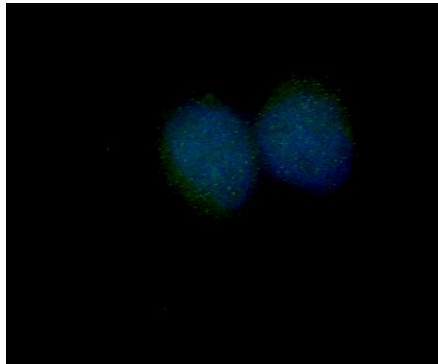
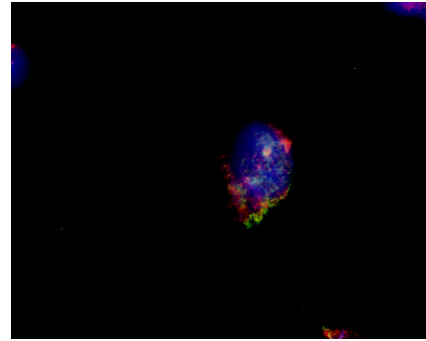
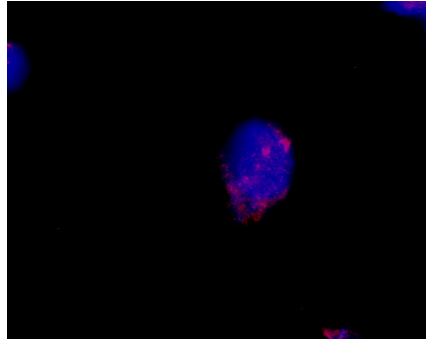


J)



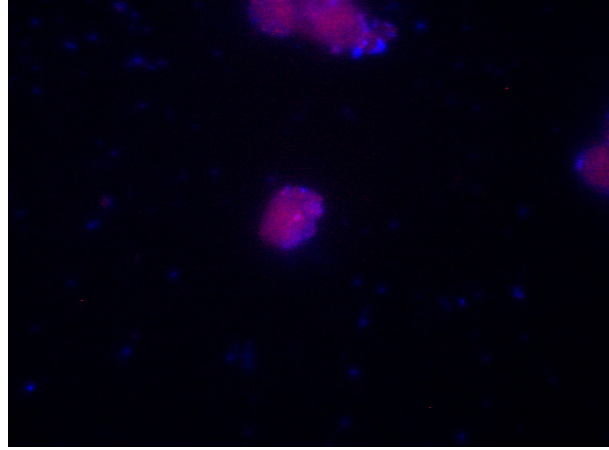
Taxol uygulamasına maruz bırakılmış hücrelerde mikrotübül stabilizasyonu sonucunda sitoplazmik yapının nasıl çekip küçüldüğü dikkat çekicidir (Resim 5 -G). HIV Tat transfekte hücreler de benzer bir görüntü sergilemektedir (REF). TAF7-GFP transfekte hücrelerin görüntüsü Resim 6'da verilmiştir. Görülebileceği gibi mikrotübül stabilizasyonu için kullanmış olduğumuz taxol ile benzer özellikler sergilemektedir (Resim 5 ve Resim 6'daki görüntüler aynı deney grubundan eş zamlı olarak elde edilmiştir).

Resim 6. pEGFP TAF7 transfekte edilen Kelly hücrelerinin α -tubulin boyama floresan mikroskopisi görüntüleri. TAF7- GFP yeşil, α -tubulin kırmızı ve DAPI mavi renk olarak görülmektedir.



Taxol'un mikrotübül stabilizasyonunu TAF7 üzerinden mı sağladığı sorusunu cevaplayabilmek için TAF7 siRNA transfeksiyonunu Taxol inkübasyonu ile birlikte uyguladık (bkz Resim 7). TAF7 ekspresyon baskılamasının mikrotübül stabilizasyonu üzerinde herhangi bir etkisini gözlemlememiş olmamız. Taxol'ün TAF7 üzerinden etki etmediği görüşünü desteklemektedir. Verilerimiz Taxol ve TAF7'nin bağımsız bir mekanizma ile mikrotübül stabilizasyonunu sağladığını göstermektedir.

Resim 7. TAF7 siRNA ve taxol uygulanan Kelly hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüsü



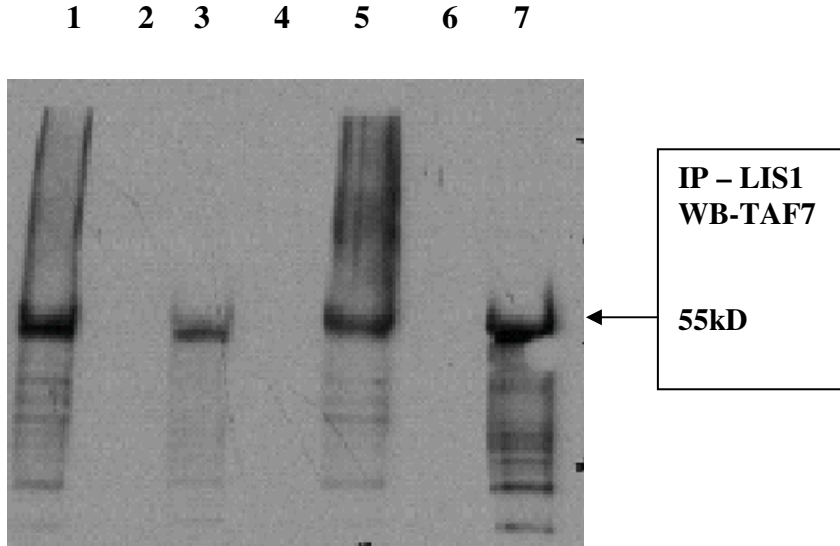
4.5. İMMÜN PRESİPİTASYON (IP) DENEYLERİ:

HIV Tat proteinini bir mikrotübül proteini olan LIS1 ile arasında in vitro IP deneylerinde bağlanma olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde HIV Tat'in mikrotübül stabilizasyonu sonucu tetiklediği apoptozu proapoptotik protein BIM üzerinden gerçekleştirdiği bulgulanmıştır. TAF7'nin de bu proteinler ile hücre içinde ilişkili olup olmadığını araştırma amacıyla IP deneyleri planlanmıştır

4.5.1. TAF7' nin BIM ve LIS1 ile İLİŞKİSİNİN İMMÜN PRESİPİTASYON İLE BELİRLENMESİ:

TAF7 ile BIM ve LIS1 arasında bağlanma olup olmadığına bakılmıştır. HeLa ve Kelly hücre lizatlarında, immün presipitasyonun LIS1 antikoru ile, western blotun ise TAF7 antikoru ile yapıldığı (Resim 8) ve Namalwa lizatlarında immün presipitasyonun TAF7 antikoru ile, western blotun ise BIM ve LIS1 antikoru yapıldığı (Resim 9) olmak üzere iki farklı immün presipitasyon deneyi yapılmıştır. İmmün presipitasyon optimizasyonu çalışmaları devam etmektedir.

Resim 8. LIS1 – TAF7 bağlanması immün presipitasyon deneyi. Kelly hücrelerinde LIS 1 antikoru ile immün presipitasyon ve TAF7 antikoru ile western blot görüntüsü. 1. kuyu etoposit eklenmiş lizat +antikor; 2, boş; 3, etoposit eklenmiş lizat + antikorsuz sefaroz boncuk; 4, boş; 5, etoposit eklenmemiş lizat + antikor; 6, boş; 7, etoposit eklenmemiş lizat + antikorsuz sefaroz boncuk



LIS1 antikoru ile immün presipitasyon deneyinde antikor eklenmemiş olan boncuklarda da TAF7 bantları elde edilmiştir. Bazı proteinlerin yapışkan özellik göstermesi ve antikor yokluğunda dahi sefaroz boncuklara bağlanabildiği bilinen bir sorundur. Hücre lizatının antikor

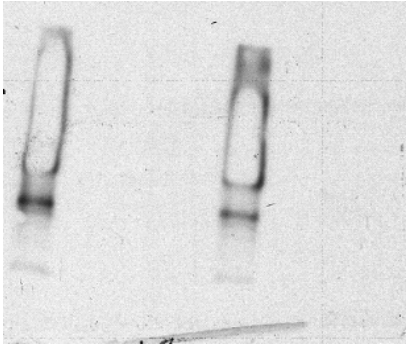
eklenmeden boncuklarla inkübe edilerek yürütülmesinin amamcı bu tür non-spesifik bağlanmaları gözlemlenmek amacıyla ve IP deneylerinde “bead control” adını alır. TAF7 proteini de boncuklara bu tür özgül olmayan bağlanma sergilemektedir. Her ne kadar antikor bulunduğu durumlarda TAF7 bandının daha güçlü olması LIS1’in TAF7’yi presipite ettiğini düşündürse de deney sonuçları bu haliyle ikna edici değildir. Bu nedenle IP deneylerini tersinden yani TAF7 antikorunu ile immün presipitasyon yapıp LIS 1 ve BIM antikorları ile western blot yapılmasına karar verilmiştir (bkz Resim 9).

Resim 9. TAF 7- LIS1 bağlanması immün presipitasyon deneyleri A) Namalwa hücrelerinde TAF7 antikorunu ile immün presipitasyon ve LIS1 antikorunu ile western blot görüntüsü. 1. kuyu etoposit eklenmiş lizat + antikor; 2, boş; 3, etoposit eklenmiş lizat + antikorsuz boncuk; 4, boş; 5, etoposit eklenmemiş lizat + antikor; 6, boş; 7, etoposit eklenmemiş lizat + antikorsuz boncuk. B) Namalwa hücrelerinde TAF7 antikorunu ile immün presipitasyon ve BIM antikorunu ile western blot görüntüsü. Kuyu içerikleri aynıdır.

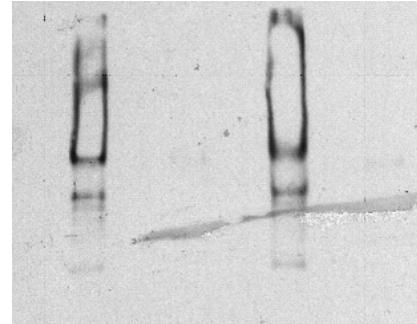
A)

B)

1 2 3 4 5 6 7



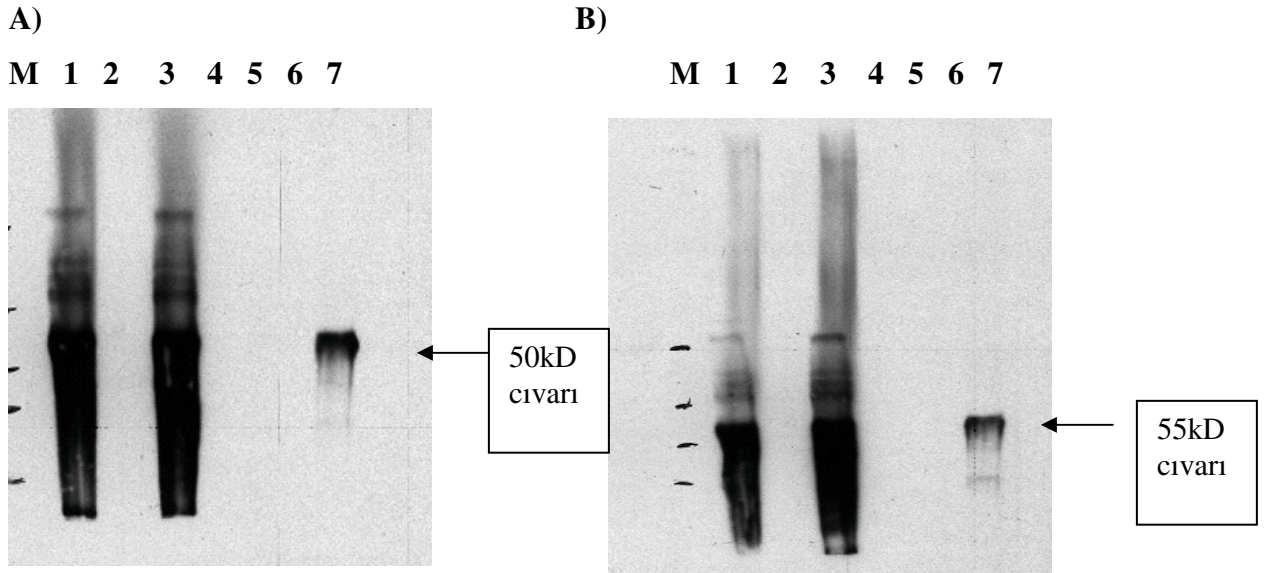
1 2 3 4 5 6 7



IP’yi LIS1 ve BIM antikorlarıyla, western’in ise TAF7 antikorunu ile yapılması daha önce karşılaşılan sorunu çözmüş gibidir. Antikorsuz boncuk kontrol kuyularında bant gözlenmemektedir. Ancak farklı antikorlar kullanılarak yapılan IP’lerde her iki jel görüntüsünün birbirlerine çok benzer olması, aynı non-spesifik bantları içermesi ek kontrollerin eklenmesi

ihtiyacını doğurmuştur. IP deneyleri TAF7 pre-immün serumu ve ilişkisiz bir hücre yüzey alması olan c-Met antikorları kullanılarak tekrarlanmıştır (bkz Resim 10).

Resim 10. TAF 7 antikorları ile bir önceki resimde verilmiş immün presipitasyon deneylerinin TAF7 preimmün serum ve negatif kontrol olarak c-Met antikorunu kullanılarak tekrarlanması. A) Namalwa hücrelerinde TAF7 preimmün serum ve c-Met antikorunu ile immün presipitasyon, LIS 1 antikorunu ile western blot. 1. kuyu lizat + preimmün serum + boncuk; 2, boş; 3, aynı; 4, boş; 5, lizat + antikorsuz/serumsuz boncuk; 6, boş; 7, lizat + c-Met antikorunu + boncuk B) Namalwa hücrelerinde TAF7 preimmün serum ve c-Met antikorunu ile immün presipitasyon, BIM antikorunu ile western blot. Kuyu içerikleri aynıdır.



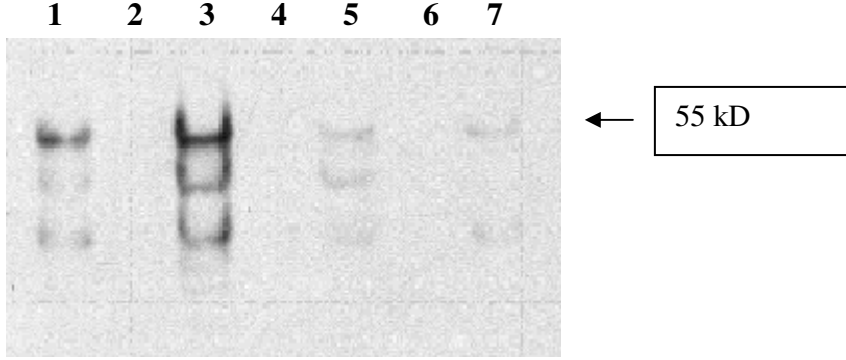
TAF7 antikorunu ile yapılan immün presipitasyon deneylerinde antikor eklenmeyen boncuklardan bant elde edilmemesiyle beraber, preimmün ve cMet antikorları ile de 55kD civarlarında bantlar elde edilmiştir. Bu da elde edilen görüntülerin non-specific olduğunu, büyük ihtimalle boncuklara yapışan immün globulin ağır zincirinin sekonder antikorla görüntülenmesi sonucu oluştuğunu düşündürmektedir. Bu durumun giderilmesi için IP optimizasyon çalışmaları devam etmektedir. Yeni bir seri TAF7 immün ve preimmün serum ile IP'lerin tekrarlanması

planlanmaktadır. Ayrıca flag-işaretli TAF7 ekspresyon vektörünün yapımı sürdürülmektedir. IP deneyleri transfeksiyon sonrası Flag antikoru kullanılarak tekrarlanacaktır.

4.5.2. TAF7’NİM CIITA İLE İLİŞKİSİNİN İMMÜN PRESİPİTASYON İLE BELİRLENMESİ:

CIITA’in (MHC sınıf II transaktivatörü; class II transactivator) HIV Tat proteini ile olan ilişkisi bilinmekte ve ve bu ilişkinin enfeksiyon patogenezinde oynadığı rol araştırılmaktadır. HIV Tat’la benzer şekilde TAF7 ve CIITA arasında bir etkileşim olup olmadığını immünpresipitasyon yöntemi ile araştırmayı planladık. Bağışıklık sistemi dışındaki hücrelerde CIITA bir efektif uyarının bulunmadığı durumlarda düşük seviyelerde eksprese edilir. Bu nedenle IP deneylerimizde hücreleri interferon gama ile indükleyerek CIITA ekspresyonunu artırma yoluna gittik. IP deneylerinde interferon gama ile indüklenen ve indüklenmemiş normal Namalwa hücre lizatları kullanılmıştır. IP CIITA antikoru western ise TAF7 antikoru ile yapılmıştır. Daha önceki IP deneylerinde gözlemlemiş olduğumuz TAF7’nin boncuklara non-spesifik bağlanmasını azaltabilmek amacıyla boncuklar önceden BSA (bovin serum albumin) ile inkübe edilerek doyurulmuştur. Böylece boncuklara antikora özgül olmayan protein bağlanmasının azaltılması hedeflenmiştir. IP deneyinin sonuçları Resim 11’de verilmiştir.

Resim 11. IP'in CIITA, westernin TAF 7 antikorları ile yapıldığı deney. Boncuklara non-spesifik yapışmaları azaltmak amacıyla boncuklar önceden BSA ile inkübe edilerek doyurulmuştur. 1. kuyu lizat + CTIIA antikor + boncuk; 2, boş; 3, interferon gama ile indüklenen Namalwa lizatı + CIITA ab + boncuk; 4, boş; 5, lizat + antikorsuz boncuk; 6, boş; 7, interferon gama ile indüklenen Namalwa lizatı + antikorsuz boncuk.



Boncukların BSA ile doyurulmasının özgül olmayan TAF7 yapışmasını önemli ölçüde azalttığı izlenmektedir. Özellikle hücre içi CIITA miktarını büyük ölçüde arttırdığı bilinen interferon uygulamasından sonra oldukça güçlü bir bant elde edilmiş olması TAF7 ile CIITA arasında doğrudan bir ilişki olabileceği görüşünü desteklemektedir. Ancak yine de bu bulguyu doğrulamak ve daha temiz jel görüntüleri elde edebilmek amacıyla yeni bir seri TAF7 immün serumu ile deneylerin tekrarlanması ve flag-işaretli TAF7 ekspresyon vektörünün yapımı bittiğinde IP deneylerinin transfeksiyon sonrası Flag antikor kullanılarak tekrarlanması hedeflenmektedir.

5. TARTIŞMA

İnsan Genom projesi kapsamında insan DNA sekansının belirlenmiş olması, biyoloji ve tıp bilimi için çok büyük öneme sahip olmakla birlikte pek çok probleme tek başına çözüm olmaktan uzaktır. Baz dizilimi artık bilinen genlerin, ekspresyon kontrol mekanizmalarının tanımlanması gerekmektedir. Gen transkripsiyonu büyük ölçüde kendilerine özgü sekans motiflerini tanıyan transkripsiyon faktörlerinin promotör bölgelere bağlanması, transkripsiyonda görev alan kompleksleri kendisine çekmesi ve aktive etmesi ile gerçekleşir. Bu transkripsiyon faktörlerinin bazıları proto-onkogen olarak tanımlanan ve onkojenik virüslerde viral homologları bulunan genlerdir. Viral homologları olan genler, hastalık patogenezi ile ilgili araştırmalarda biyolojik açıdan kolaylık sağlamaktadır. Viral homolog incelenerek ökaryotik homologun işlevleri hakkında; ya da tam tersi ökaryotik homolog incelenerek viral homologun enfeksiyon biyolojisindeki olası işlevleri hakkında öngörüde bulunulabilir. Ne yazık ki tüm virüs genleri için ökaryotik homologlar bulunmadığından, günümüzde epidemiyolojik açıdan önemli pek çok viral enfeksiyon ile ilgili araştırmalar bu kolaylıktan yararlanamamaktadır. Bu tür enfeksiyonlar arasında HIV enfeksiyonu da bulunmaktadır.

HIV enfeksiyonunun biyoloji ve immunopatogenezi anlamak, terapötik stratejilerin, immunoterapilerin ve profilaktik aşıların geliştirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. HIV genomundaki 9 genden biri olan HIV Tat, gen ekspresyonu için gerekli olup temel olarak proviral transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynar. Tat proteini HIV gen ekspresyonu için gerekli iki faktörden (tat ve rev) biri olup, temel olarak gen ekspresyonu için transaktivatör işlevi bulunmaktadır (12). Tat'ın HIV nükleik asidi proviral formda hücre DNA'sına entegre olduktan

sonra, provirüsün LTR promotöründe bulunan TAR (transactivation responsive region) elementine bağlanarak transkripsiyonel inisiyasyon ve elongasyonu etkinleştirdiği gösterilmiştir (13,14). Tat varlığında LTR'den provirüs transkripsiyon verimliliğinin birkaç yüz kat arttığı deneylerle bulgulanmış ve günümüze kadar yapılmış tüm in vitro hücre kültür sistemlerinde viral replikasyon için gerekliliği gösterilmiştir (5).

Tat transkripsiyonel etkilerini TAR elementine bağlandıktan sonra inisiyasyon ve elongasyonu uyararak gerçekleştirir. Bu işlemleri gerçekleştirebilmek için hücrel proteinlerle etkileşime girer ve konak hücrenin transkripsiyonel düzeneğini kullanır. Tat'ın elongasyon uyarımı ile ilgili daha fazla bilgiye sahibiz. Tat'ın siklin T ve cdk9'dan oluşmuş bir elongasyon faktörü olan P-TEFb, TAR ve yine elongasyonda rol oynayan Brd4 proteinleriyle doğrudan etkileşime girerek RNA polimeraz II'in C-terminal bölgesinin hiperforforilasyonunu tetikleyerek transkripsiyon inisiyasyonunu ve elongasyon devamını uyardığı gösterilmiştir (15,16). Elongasyonun yanı sıra Tat'ın preinisiyasyon kompleksinin (PIC) oluşumunda da rol oynadığı bilinmektedir. Tat'ın PIC yapısında yer alan TBP (TATA bağlayan protein), TATA kutusu, Sp1, TFIIH gibi moleküllerle; siklin E/cdk2 'le ve CBP/p300, p/CAF gibi koaktivatör ve kromatin modelleme kompleksleriyle doğrudan etkileştiği gösterilmiştir (17-22). Ayrıca Tat histon asetilazları da PIC'e çağırarak, transkripsiyon daha başlamadan özel nükleozomal bölgelerde H3 ve H4 lizin asetilasyonunun gerçekleşmesinden de sorumludur (22).

Transkripsiyonel aktivasyonun yanı sıra Tat'ın çeşitli hücrel genleri transkripsiyonel düzeyde baskılama (represyon) işlevi de olduğu bugün bilinmektedir (12). Bu işlevi, ilgili genlerin PIC yapı ve kompozisyonlarını bozarak gerçekleştirmektedir. Örneğin MHC sınıf I genlerinin bazal ekspresyonu PIC yapısında işlevsel bir TAF1 (TBP asosiye faktör 1)

molekölünün varlığına bağımlıdır. Tat TAF1'e bağlanarak asetiltransferaz aktivitesini ortadan kaldırmakta ve bu yolla MHC sınıf I ekspresyonunu baskılayabilmektedir (23,24).

HIV Tat proteininin üzerinde durmak istediğimiz bir diğer özelliği de CTIIA (class II transactivator) ile olan etkileşimidir. CTIIA bağışıklık sistemi açısından çok önemli bir proteindir. MHC sınıf II genleri için transkripsiyonel bir aktivatör işlevi görür ve yokluğunda MHC sınıf II proteinleri ifade edilmez; dolayısıyla CD4 T lenfositleri timusta gelişemez. HIV Tat ile CIITA arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir (38). Tat, CIITA ve MHC sınıf II ekspresyonunu baskılayabilirken; CIITA over-ekspresyonu da Tat'ı ve bu yolla da HIV replikasyonunu baskılayabilmektedir. Sonuç olarak HIV enfeksiyon gelişiminde bu iki protein arasındaki denge önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak Tat proteini gerek proviral gerekse hücrel genlerin, kromatin modifikasyonları, transkripsiyonel inisiyasyon, elongasyon, transkripsiyonel baskılanma dahil neredeyse genetik regülasyonun tüm süreçlerinde etkili olmaktadır. Ancak Tat proteininin etkileri sadece transkripsiyonel transaktivasyon ile sınırlı değildir. HIV enfeksiyonunun çok belirgin bir özelliği olan hücre ölümünde Tat proteininin rolü birçok araştırmaya konu olmuştur.

HIV enfeksiyonu CD4 T hücrelerinin apoptoz yoluyla progresif kaybı ile karakterizedir. Bu progresif kayıp sadece virüs ile enfekte hücrelerde değil, enfekte olmayan hücreler içinde geçerlidir (25). Özellikle virüs ile enfekte olmayan hücrelerin apoptoz yoluyla kaybindan HIV Tat proteininin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tat proteininin bir diğer özelliği de hücre dışına sekrete olası ve komşu hücreler tarafından içe alınabilmesidir. Virüsle enfekte olmayan hücrelerin bu ekstraselüler Tat proteinini kendi içlerine almaları pek çok farklı yolla apoptoz

sürecinin uyarılmasına neden olur (26). Tat proteininin apoptotik süreçleri uyarabildiği bilinen mekanizmalar arasında, Fas ligandının artmış ekspresyonunu uyarmak (27), çeşitli sitokinleri kodlayan genlerin uyarılması veya baskılanması (28), Bcl-2 gibi hücre yaşam faktörlerinin ifadesinin uyarılması (29), manganez bağımlı süperoksit dismutaz (30) ve p53 ekspresyonunun baskılanması (31) ve CDK aktivasyonu (32) sayılabilir.

Tat'ın apoptozu uyardığı bir mekanizma da Tat proteininin hücre mikrotübül polimerizasyonunu etkileyerek apoptozu tetiklemesidir (33). Mikrotübüller tubulin polimerlerinden oluşmuş, hücre morfoloji, hücre içi organel yapı ve yerleşimi, mitoz sırasında kromozom göçü, hücre farklılaşması ve hücre içi transportta rol oynayan hücre iskelet yapılarıdır. Bu denli çok ve önemli işlevleri olan mikrotübül yapısının bozulması, hücrede apoptozu tetiklemektedir (33). Mikrotübül yapısını bozan ajanlar (MDA-microtubul damaging agents) etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılmaktadır: taxanlar gibi mikrotübül stabilizasyon ajanları ve vinca alkaloidleri gibi mikrotübül depolarizasyon ajanları. MDA'lar hücre içi mikrotübül dinamiklerini bozduklarından programlanmış hücre ölümüne yol açarlar ve bu özellikleri nedeniyle de çeşitli kanserlerde tedavi amaçlı kullanım alanları bulunmaktadır.

HIV Tat proteininin hücre mikrotübüllerine bağlandığı ve stabilize edici MDA'lar benzeri bir etki göstererek hücre mikrotübül dinamiğini bozduğu gösterilmiştir. Ayrıca mikrotübüllere bağlandıktan sonra pro-apoptotik Bcl-2 aile üyesi olan Bim ile de doğrudan etkileştiği ve intrinsik mitokondrial apoptoz yolağını uyardığı bulgulanmıştır (34). Yine bir diğer çalışma Tat'ın, bir mikrotübül ilişkili (asosiye) protein (MAP) olan ve mikrotübül dinamiklerinde düzenleyici protein kabul edilen, mutasyonlarının lisensefaliye yol açtığı bilinen LIS1 fosfoproteini ile hücre içinde doğrudan etkileşebildiği bildirilmiştir (35). Tüm bu çalışmalar HIV enfeksiyonunda

özellikle enfekte olmamış hücrelerde gözlenen artmış hücre ölümünün bir nedeninin de ekstrasellüler ortama salgılanan Tat proteini olduğunu ortaya koymaktadır.

HIV Tat immun hücrelerde apoptozu indükleyebildiği gibi, baskılanmasında da rol oynadığı düşünülmektedir. Viral replikasyonun gerçekleşebilmesi için enfekte hücrenin özellikle interferon uyarısının tetiklediği apoptozdan kaçabilmesi gerekmektedir. Bu aşamada da Tat'ın bağışık yanıt sürecinde rol oynayan kimi genleri baskılayarak bunu sağladığı düşünülmektedir. Özellikle CIITA olan etkileşimi, hücre içi miktarlarının dengesi bu konuda önemli rol oynamaktadır (38 ve içindeki referanslar).

Özetle HIV tat proteininin işlevlerini üç başlık altında toplayabiliriz: 1) Pro viral genlerin transkripsiyonel transaktivasyonu, inisiyasyon ve elongasyon süreçlerini desteklemek 2) Kimi konak hücre genlerinin ekspresyonlarını özellikle PIC yapısını bozarak transkripsiyon düzeyinde baskılamak ve 3) Konak hücrelerde apoptozu tetiklemek ve/veya baskılamak. Daha önce de belirttiğimiz gibi HIV Tat geni için DNA dizi düzeyinde bir ökaryotik homolog gen bulunamamıştır. Ancak işlevsel bir homolog olarak TAF7 geni ileri sürülmüştür. Benzer özellikler gösterebilen, hem elongasyonda aynı faktörlerle etkileşerek rol oynayan hem de PIC'de bulunan proteinler ile Tat'a benzer şekilde ilişki kuran bilinen tek ökaryotik gen ürünü TAF7'dir (eski adıyla TAFII55).

Ökaryotik hücrelerde transkripsiyonun başlaması için GTF'lerin promotöre bağlanması gerekmektedir. Promotöre ilk bağlanan genel transkripsiyon faktörü TFIID'dir. TFIID, TBP'den (TATA binding protein) ve TAF'lerden (TBP associated faktör) oluşmaktadır. İnsan genomundaki genlerin sadece %30'unun promotöründe "TATA" kutusu bulunmaktadır. "TATA"

kutusu bulunmayan promotör bölgelerinde önemli başka bir sekans elementi olan initiator (Inr) sekansı bulunur. TATA kutusu içermeyen fakat Inr dizisi bulunan promotörlerin çoğunda ayrıca DPE (downstream promoter element) elementi de bulunmaktadır. DPE yaklaşık olarak transkripsiyon başlama bölgesinden 30 bp aşağıda yer alır. TATA kutusu bulunmayan promotörlerde TFIC'in (TBP free TAF containing complex) TFIID'in yerini aldığı invitro koşullarda gösterilmiştir. TBP olsun veya olmasın her promotörün kendine has bir TAF kompleksi oluşturduğu, gene özgü olan bu kompleks oluşumunun transkripsiyonun ön koşulu olduğu bugün bilinmektedir. Pek çok farklı TAF'lerden biri de TAF7'dir.

Literatürde TAF7 ile ilgili çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Bir tarama yapıldığı takdirde içinde TAF7 geçen toplam 19 makale çıkmaktadır. Bunların çoğu TFIID kompleksinin farklı ökaryotlardaki yapısını ve diğer TAF'ler ile olan ilişkileri kapsayan çalışmalardır. İki TAF7 promotörü ve ekspresyonu ile ilgili olup protein fonksiyonu ile ilgili bilgi vermemektedir. TAF7 proteinin işlevi ile ilgili ancak 4 makale bulunmaktadır. Bunlardan biri TAF7'nin, HIV Tat proteinine benzer şekilde TAFII250'yi bloke ettiğini ve böylelikle transkripsiyon inisiyasyonunun bir kontrol noktasında görev aldığını ileri sürmektedir. Tüm transkripsiyon kompleksinin sağlıklı oluşması sonrasında TAF7, TAFII250 üzerindeki blokajı kaldırmakta ve transkripsiyonun başlamasına izin vermektedir (36). Öte yandan TAF7'nin yine HIV Tat gibi elongasyon faktörü P-TEFb ile etkileşerek elongasyonu desteklediği bildirilmiştir ve TAF7'nin bir transkripsiyonel kontrol noktasında görev aldığı ileri sürülmüştür (37).

Sonuç olarak TAF7 HIV Tat için öne sürülen işlevlerin ikisini HIV Tat'a benzer şekilde yürütmektedir. Ancak TAF7'nin Tat gibi apoptotik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir.

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), hücre dışarıdan yaşamına devam etmesi için gerekli sinyalleri alamadığında veya hücre hasarı olduğu zaman gerçekleşir. Apoptoz yollarının aydınlatılması ve farklı patolojilerde apoptozun rolü konusunda sayısız araştırma yapılmış olmasına rağmen halen ölüme giden hücrede transkripsiyonun nasıl bloke edildiğine dair fazla bir veri bulunmamaktadır. Araştırmamıza temel olan hipotezimiz, bir apoptoz bulgusu olan transkripsiyon blokajının TAF7 üzerinden gerçekleştiği ve TAF7'nin HIV Tat'a benzer şekilde mikrotübüller ile ilişkiye geçerek apoptozun geç evrelerinde rol oynadığı yönündedir. Bunu test etmek amacıyla hepsinin de intrinsik mitokondrial yolağı tetiklediğini göstermiş olduğumuz radyasyon, etoposid ve MGBG (methylglyoxal bis – guanylhydrazone) apoptotik ajanlarının uygulandığı HeLa ve Kelly hücre hatlarında siRNA (small interfering RNA) oligonükleotidleri kullanılarak TAF7'nin ekspresyonunu baskıladık ve apoptoz yanıtlarını ölçtük. siRNA i tekniği ile TAF7 ekspresyonu baskılanan HeLa ve Kelly hücre hatlarında radyasyon, etoposid ve MGBG (methylglyoxal-bis–guanylhydrazone) uygulamaları sonrasında kaspaz 3 aktivitesi olarak ölçülen programlanmış hücre ölümünün kontrol grubu hücrelerine göre, ajan ve hücre hattından bağımsız 4-6 kat azaldığını gözledik. Verilerimiz TAF7'nin apoptotik sinyal ileti sürecinde rol oynadığı öngörümüzü desteklemektedir. Bulgularımız apoptozda gözlenen transkripsiyon bloğundan TAF7'nin sorumlu olduğunu ileri sürmemiz için yeterli değildir. Bunun için TAF7 protein yokluğunda hücre genel transkripsiyon hızının ölçülmesi gerekmektedir. Ancak genel transkripsiyon mekanizmasının apoptoz süreci ile ilişkilendirilmesi açısından önemlidir ve TAF7'nin bir transkripsiyonel regülatör olduğunu ileri süren önceki çalışmaların ışığında anlam kazanmaktadır. Ayrıca genel transkripsiyon mekanizmasına ait bir öğenin yokluğunda apoptoza direnç gelişmesi dikkat çekicidir.

TAF7'yi apoptoz ile ilişkilendiren bir çalışma daha bulunmaktadır (45). Ancak bu çalışmada araştırıcılar verilerini TAF7'nin transkripsiyondan ayrı olarak poliamin mekanizmasında da rol oynadığı şeklinde yorumlamışlardır. 2004 yılında Fukuchi ve arkadaşları TAF7'nin poliamin transport aktivitesini düzenleyerek poliamin analogları ile indüklenen apoptozda rol oynadığını ileri süren bir çalışma yayınladılar. Bu çalışma kapsamında poliamin transport aktivitesinde rol oynayan genleri tanımlayabilmek amacıyla öncelikle MGBG (methylglyoxal bisguanylhydrazone) dirençli CHO hücreleri oluşturulmuştur. MGBG, bir poliamin transport inhibitörü ve hücrelere eklenmesi programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır. MGBG dirençli hücrelerde retroviral gen tuzağı (retroviral gene trap) metoduyla direncin oluşumunu sağlayan gen, bu çalışmada TAF7 olarak tanımlanmıştır. Yazarlar verilerini TAF7'nin poliamin transportunda düzenleyici olarak rol aldığı ve bu yolla indüklenen programlanmış hücre ölümünde işlevi olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Ancak bu çalışmadaki verileri farklı yorumlamak mümkündür ve TAF7'nin bir transkripsiyonel regülatör olarak apoptozda rolü olabileceği hipotezini desteklemektedir. Kullanılan yöntem, hangi genin ekspresyon kaybında MGBG'ye karşı direnç geliştiğini saptamaya yöneliktir. Sonuç olarak da TAF7 ekspresyon kaybında MGBG ile indüklenen apoptoza karşı bir direnç oluşumu gözlenmiştir. Eğer TAF7, transkripsiyonu durdurma işlevi ile apoptoz yolağında görev alıyorsa, yokluğu bu yolaktaki ardışık sinyal iletiminde bir duraklamaya yol açarak direnç gelişimine neden olacaktır. Diğer bir ifadeyle gözlenmiş olan apoptoza karşı direnç, TAF7 poliamin transport yolunda rol oynadığı için değil, genel olarak programlanmış hücre ölümünde bir fonksiyonu varsa da gözlenebilir.

TAF7'yi klonlayarak yapmış olduğumuz ekspresyon vektörünü hücre hatlarına transfekte ettiğimiz deneylerde TAF7 over-ekspresyonunun hücreleri apoptoza soktuğunu gözlemledik. Bu

gözlem hücre dışına salgılanan HIV Tat'ın enfekte olmayan hücreleri apoptoza sokması ile benzeşmektedir. Benzer mekanizmaların kullanılıp kullanılmadığını araştırmak amacıyla alfa tubulin antikoruyla yapmış olduğumuz immunfloresan boyamalarda TAF7 over-ekspresyonunun HIV Tat gibi mikrotübül stabilizasyonuna neden olduğunu gösterdik.

TAF7 fonksiyonu ile ilgili öngöründe bulunabilmek için, SWISS-PROT ve TrEMBL'den protein domain ailelerini otomatik olarak oluşturan ProDom veri tabanına (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>) TAF7 sekansını girerek, benzer protein domainlerini içeren 2892 prokaryotik ve ökaryotik protein saptadık. Bu proteinlerin taranması sonucunda, ökaryotik proteinlerin 40 kadarını mikrotübül ve mikrotübül asosiye proteinlerin (MAP) oluşturduğunu gördük. Buna ek olarak TAF7 yapısında bulunan coil-coil domaininin, mikrotübül ve iskelet proteinlerinde de oldukça sık rastlanılan bir motif olması, Tat'ın fosforilleştiği LIS1 proteinini özellikle beyin gelişiminde önemli rol oynaması, buna karşılık TAF7'nin en yüksek eksprese olduğu dokunun nöroektodermal doku olması sonuçlarımızı destekleyen verilerdir

Yapmış olduğumuz apoptoz deneyleri TAF7'nin HIV Tat'ın işlevsel ökaryotik bir homoloğu olabileceği görüşünü desteklemektedir. Tat'ın ilişkili olduğu mikrotübül proteini LIS1 ve pro-apoptotik protein BIM ile TAF7 ilişkisini antikordan kaynaklanan sorunlar nedeniyle gösteremedik. Yeni TAF7 antikor "lot"u ile deneylerin tekrarlanması, ayrıca yapımı süren TAF7-flag plasmidi kullanılarak transfeksiyon sonrası flag antikor kullanılarak immünpresipitasyon (IP) deneylerinin tekrarı planlanmaktadır.

Yukarıda Tat'ın CIITA proteini ile olan etkileşimin HIV enfeksiyonu açısından önemine değinmiştik. Aynı etkileşimin CIITA ve TAF7 arasında olup olmadığına araştırmak amacıyla yapmış olduğumuz IP'lerde böyle bir ilişki varlığını destekleyen bulgular elde ettik. Yine antikor sorunları nedeniyle bu deneylerin de yeni antikor stoku ve TAF7-flag plasmid transfeksiyonundan sonra tekrarlanması gerekmektedir.

TAF7'nin apoptozda oynadığı rol göz önünde tutulduğunda, CIITA ile olan ilişkisinin doğrulanması immünoloji alanında çok farklı açılımlara neden olacaktır. CIITA, MHC sınıf II genlerin ekspresyonundan sorumludur ve kalıtsal olarak mutant olması durumunda MHC sınıf II ekspresyonu bulunmamakta ve dolayısıyla CD4 T lenfositleri gelişmemektedir (Bare Lymphocyte Syndrome). TAF7'nin genetik regülasyonu ve doku ekspresyon düzeyleri, T hücrelerinin pozitif seçiliminde bir rol oynayabilir. Ayrıca HIV ile enfekte hücrelerde CIITA ve Tat etkileşimleri göz önünde tutulduğunda CIITA ve TAF7 etkileşimleri önem kazanmaktadır. Bir virüs ile enfekte bir hücrede interferon tarafından indüklenecek CIITA ekspresyonu sonucunda, CIITA'in TAF7'yi bağlayarak hücrenin hemen apoptoza girmesini önlediği böylece gereken immün yanıt (MHC sınıf I ve II'de antijen sunumu) zaman kazandırdığı öne sürülebilir. Bu hipotezin denenmesi için CIITA varlığında TAF7'in apoptotik etkisinin ortadan kalkıp kalkmadığının gösterilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak araştırmamız gerek apoptoz süreci gerekse genel transkripsiyon mekanizmasının bir ögesi olan TAF7 ile ilgili yeni veriler ortaya koymaktadır. Ayrıca TAF7'nin, HIV Tat proteini ile olan işlevsel benzerliklerinin farklı alanlarda gösterilmesi, diğer bir ifadeyle HIV Tat proteininin bir "*ökaryotik işlevsel homologu*" olabilecek bir proteinin özelliklerinin tanımlanması, HIV araştırmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKÇA

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. Science 1983, 220: 868-71
2. Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. N Engl J Med 1984, 311:1292- 7.
3. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984, 224: 500-
4. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira O. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 1986, 233: 343.
5. HIV Medicine 2006 (www.HIVMedicine.com) ed. C. Hoffmann, JK. Rockstroh, BS Kamps 2006 by Flying Publisher – Paris, Cagliari, Wuppertal
6. Hacettepe Üniversitesi HIV / AIDS Tedavi ve Araştırma Merkezi, <http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/klinik.shtml>
7. Dalglish AG, Beverly PCL, et al. The CD4 antigen is an essential component of the receptor for HIV. Nature 1984, 312: 763-6.

8. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya S, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP- 1a, and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995, 270:1811-5.
9. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381: 661-6.
10. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996, 381: 667-73.
11. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996, 272: 872-7.
12. Brady J, Kashanchi F. Tat gets the green light on transcription initiation. *Retrovirology*, 2005;2:69.
13. Pumfery A, Deng L, Maddukuri A et al. Chromatin remodelling and modification during HIV-1 Tat activated transcription. *Curr HIV Res* 2003, 1:261-274
14. Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD. Analyses of arginine rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.* 1991;5:201-210.

- 15.** Marshall NF, Price DH. Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* 1992;12:2078-2090
- 16.** Jang MK, Mochizuki K, Zhou M et al. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II dependent transcription. *Mol Cell* 2005;19:523-534.
- 17.** Jeang KT, Chun R, Lin NH et al. In vitro and in vivo binding of HIV-1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J Virol*, 1994;68:561-565.
- 18.** Majello B, Napolitano G, Lania L. Recruitment of the TATA binding protein to the HIV-1 promoter is a limiting step for Tat transactivation. *AIDS*, 1998;12:1957-1964.
- 19.** Deng L, Ammosova T, Pumfery A et al. HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain and a dynamic association with CDK2 induced CTD phosphorylation and transcription from the HIV-1 promoter. *J Biol Chem*, 2002;277:33922-33929.
- 20.** Garcia-martinez LF, Mavankal G, Neveu JM et al. Purification of a Tat associated kinase reveals a TFIIHG complex that modulates HIV-1 transcription. *EMBO J*, 1997;16:2836-2850.
- 21.** Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. HIV-1 transactivator recruits p300 and CREB binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:13519-13524.

- 22.** Benkirane M, Chun RF, Xiao H et al. Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferases p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 1998;273:24898-24905.
- 23.** Brown JA, Howcroft TK, Singer DS. HIV Tat protein requirements for transactivation and repression of transcription are separable. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;3:127-138.
- 24.** Wiessman JD, Brown JA, Howcroft TK et al. HIV-1 Tat binds TAFII250 and represses TAFII250 dependent transcription of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11601-11606.
- 25.** Weiss RA. How does HIV cause AIDS? *Science* 1993;260:1273-1279.
- 26.** Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 1999;274:28837-28840.
- 27.** Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C et al. Sensitization of T cells to CD95 mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995;375:497-500.
- 28.** Westendorp MO, Li-Weber M, Frank WR, Krammer KH. HIV-1 Tat upregulates interleukin 2 secretion in activated T cells. *J Virol* 1994;68:4177-4185.

- 29.** Wang Z, Morris GF, Reed JC et al. Activation of Bcl-2 promoter directed gene expression by the HIV-1 Tat protein *Virology* 1999;257:502-510.
- 30.** Flores SC, Marecki JC, Harper KP et al. Tat protein of HIV-1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1993;90:7632-7636.
- 31.** Li CJ, Wang C, Friedman DJ et al. Reciprocal modulations between p53 and Tat of HIV-1. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1995;92:5461-5464.
- 32.** Li CJ, Friedman DJ, Wang C et al. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995;268:429-431.
- 33.** de Mareuil J, Carre M, Barbier P et al. HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology* 2005;2:5
- 34.** Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the proapoptotic BCL-2 relative Bim. *EMBO J* 2002;21:6801-6810.
- 35.** Epie N, Ammosova T, Sapir T et al. HIV-1 Tat interacts with LIS1 protein. *Retrovirology* 2005;2:6
- 36.** Geronne A, Weissman JD, Singer DS. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998;98:12432-12437.

- 37.** Gegonne A, Weissman JD, Zhou M et al. TAF7: A possible transcription initiation checkpoint regulator. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2006;103:602-607.
- 38.** Okamoto H, Asamitu K, Nishimura H et al. Reciprocal modulation of transcriptional activities between HIV-1 Tat and MHC class I transactivator CIITA. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;279:494-499.
- 39.** Raval A, Howcroft TK, Weissman JS et al. Transcriptional coactivator CIITA is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAFII250. *Mol Cell* 2001;7:105-115.
- 40.** Howcroft TK, Raval A, Weissman JS et al. Distinct transcriptional pathways regulate basal and activated MHC class I expression. *Mol Cell Biol* 2003;23:3377-3391.
- 41.** Cooper G., Hausman R. *The Cell*, Third Edition, Washington DC, ASM Pres, 2004; 231, 260.
- 42.** Brown T. A. Genomes 2, Second Edition, New York, John Wiley & Sons Inc., 2002;171-195.
- 43.** Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts, K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, New York, Garland Science, 2002.
- 44.** Gegonne A, Weissman JD, Singer DS. TAFII55 binding to TAFII250 inhibits its acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12432-7.
- 45.** Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Nishimura K, Igarashi K, Liao S. TATA-binding protein-associated factor 7 regulates polyamine transport activity and polyamine analog-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):29921-9.

- 46.** Luguan W, Forest YM. A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics*, 2004;20:1818-1820.
- 47.** Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. *Molecular Cell Biology*, 4th Edition, New York, [W. H. Freeman & Co.](#), 2000.
- 48.** https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iprotocol.viewunit&ip_wf=mb2601&ip_wsf=sect1.html
- 49.** <http://www.ambion.com/techlib/presentations/ExpVectors.pdf>
- 50.** <http://www.theses.ulaval.ca/2003/21404/ch03.html#d0e2100>
- 51.** Dharmacon, *Applications Handbook and Catalog*, 2005/2006.
- 52.** Shi, Y. Mammalian RNAi for the masses. *TRENDS in Genetics*. 2003 Jan 19 (1): 9 – 12.
- 53.** Kim N. RNA Interference in Functional Genomics and Medicine. *J Korean Med. Sci* 2003; 18: 309-18.
- 54.** Tricia R. Doering C. And Doering L. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *TRENDS in Microbiology*. 2003 Jan.; Vol 11: 37 – 43.
- 55.** Diallo M., Arenz C., Schimitz K., Sandhoff K. And Schepers , Long Endogenous dsRNAs can induce complete gene silencing in mammalian cells and primary cultures. *OLIGONUCLEOTIDES*, 2003; 13:381 – 392.
- 56.** Nawrot B. Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids – a future for Alzheimer's disease therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 2004; Vol 52, No. 2: 431 -444.

EK1

KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER:

WESTERN BLOT ÇÖZELTİLERİ:

LİZİS TAMPONU (50 ml. İçin):

- 1,25 ml 1 M Hepes (pH: 7,6) çözeltisi
- 10 ml. 2M. KCl
- 625 µl 1M. MgCl₂
- 10 µl 500 µM EDTA
- 5 ml. Gliserol
- 500 µl. %20 NP40 solüsyonu
- 500 µl 100 µM PMSF
- 50 µl 1M. DTT
- 50 µl proteaz inhibitör kokteyli.
- Hacim ddH₂O ile 50 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

TBS:

- 10 mM Tris (pH: 8)
- 150 mM NaCl

TBST:

- %0,05 Tween 20 + TBS

4X YÜRÜTME TAMPONU

- 18,17 gr Tris Bazı
- 4 ml %10'luk SDS
- dH₂O ile hacim 100 ml.'ye tamamlanır.
- pH' ı 12 N HCl ile 8,8' e ayarlanır.

4X YÜKLEME TAMPONU (500 ml için) :

- **0,05M Tris** : 25 ml 1 M Tris Buffer (pH: 6.8) alınır.
- **%0,05 SDS**: 20 ml %10'luk SDS alınır.
- Hacim çift distile su ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

STOK SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME TAMPON ÇÖZELTİLERİ:

2X Gliserol (no R) Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

2X R (no Gliserol) Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,5 ml ddH₂O

2X R/G Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

4X Gliserol (no R) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R (no Gliserol) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R/G Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

Tüm stok örnek tampon stokları oda sıcaklığında saklanır.

SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME ÇÖZELTİLERİ:

Kullanmadan hemen önce aşağıdaki solüsyonlar hazırlanır:

2X Gliserol (no R):

- 900 λ Stok 2XG no R
- 100 λ ddH₂O

2X R (no Gliserol)

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

2X R/G:

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

4X Gliserol (no R) :

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ ddH₂O

4X R (no Gliserol):

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

4X R/G:

- 800 λ Stok 4XR/G
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

% 10' LUK AMONYUM PER SÜLFAT ÇÖZELTİSİ:

- 1 gr. Amonyumpersülfat tartılır.
- Son hacmi 10 ml olacak kadar çift distile suda çözülür.
- + 4 °C' de saklanır.

% 10' luk SDS PAGE JELİ :

- 5 ml % 30' luk Akrilamit bis solüsyonu
- 3,8 ml 4X Running Buffer
- 6 ml çift distile su
- 224 µl % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 10 µl TEMED

% 5' lik YÜKLEME JELİ:

- 900 µl % 30' luk Akrilamit bis solüsyonu
- 1332 µl 4X Running Buffer
- 3 ml çift distile su
- 84 µl % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 15 µl TEMED

TOWBIN TRANSFER TAMPONU:

- **25 mM Tris:** 3,03 g Tris
- **192 mM Glisin:** 14,4 g Glisin
- **%20 Metanol (pH: 8,3)**
- **1 g SDS**
- ddH₂O ile hacim 1 L.' ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

TRANSFEKSİYON ÇÖZELTİLERİ:

- **2X HBS** (pH:7,1 – 7,2 aralığında 4 farklı solüsyon hazırlanır.):
- **275 mM NaCl:** 16 gr tartılır.
- **10 mM KCl** : 0,74 gr tartılır.
- **1 mM Na₂HPO₄** :0,178 gr Na₂HPO₄.2H₂O tartılır.
- **11 mM Glukoz/Dekstroz:** 2,08 gr C₆H₁₂O₆. H₂O tartılır.
- **42 mM Hepes:** 10 gr tartılır.
- Hacmi 1 lt.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

ELUTIP MINI KOLON ÇÖZELTİLERİ:

Low Salt Buffer:

- 0.2 M NaCl
- 20 mM Tris HCl
- 10 mM EDTA
- pH:7.4'e ayarlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

High Salt Buffer:

- 2.0 M NaCl
- 20 mM Tris HCl
- 1.0 mM EDTA
- pH:7.4'e ayarlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

MINİ PREP ÇÖZELTİLERİ:

- **ALS 1:** 50 mM glukoz, 25 mM Tris Cl (pH:8,0), 10 mM EDTA
- **ALS 2:** 0,2 N NaOH, %1 SDS (Taze hazırlanır.)
- **ALS 3:** 5 M potasyum asetat (17,725 g tartılır). 11,5 ml asetik asit, 28,5 ml distile su.

ENDO FREE PLASMİD MAXİ PREP ÇÖZELTİLERİ:

TAMPON P1(resüspansiyon tamponu):

- 50 mM Tris.Cl, pH: 8.0
- 10 mM EDTA
- 100 µg/ml RNaseA

- 2-4 °C'de saklanır.

TAMPON P2 (Liziz tamponu):

- 200 mM NaOH
- %1 SDS (w/v)
- 15 - 25° C'de saklanır.

TAMPON P3 (Nötralizasyon tamponu):

- 3 M potasyum asetat pH: 5.5
- 15 – 25 veya 2 -8 ° C'de saklanır.

TAMPON QBT (Equilibration tamponu):

- 750 mM NaCl
- 50 mM MOPS, pH: 7.0
- %15 izopropanol (v/v)
- %0.15 Triton X-100 (v/v)
- 15 – 25° C'de saklanır.

TAMPON QC (Yıkama tamponu):

- 1.0 M NaCl
- 50 mM MOPS, pH: 7.0
- %15 izopropanol (v/v)
- 15 – 25° C'de saklanır.

TAMPON QN (Elution buffer):

- 1.6 M NaCl
- 50 mM MOPS, pH: 7.0
- %15 izopropanol (v/v)
- 15 – 25° C'de saklanır.

TE (TRİS EDTA) TAMPONU:

- 10 mM Tris.Cl pH:8.0
- 1 mM EDTA
- 15 – 25° C’de saklanır.

5X TBE (TRİS BORATE EDTA) TAMPONU:

- 54 gr. Tris bazı
- 27,5 gr Borik asit
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)
- 10 Kat dilüe edilerek agaroz jel elektroforezinde yürütme tamponu olarak kullanılır.

HIGH PURE RNA İZOLASYON KİTİ SOLÜSYONLARI:**LİZİZ/BAĞLAMA TAMPONU :**

- 4.5 M guanidine-HCl
- 50 mM Tris-HCl
- %30 Triton X – 100 (w/v)
- pH:6.8
- Oda sıcaklığında saklanır.

DNASE İNKÜBASYON TAMPONU:

- 1M NaCl
- 20 mM Tris-HCl
- 10 mM MnCl₂
- pH:7.0
- Oda sıcaklığında saklanır.

YIKAMA TAMPONU I:

- 5 M guanidine-HCl
- 20 mM Tris-HCl
- pH:6.6
- Oda sıcaklığında saklanır.

YIKAMA TAMPONU II:

- 20 mM NaCl
- 2 mM Tris-HCl
- pH:7.5
- Oda sıcaklığında saklanır.

ELÜSYON TAMPONU

- Nükleaz free, steril, çift distile su.

DİĞER ÇÖZELTİLER:

6X BROMOFENOL MAVİSİ SÜKROZ ÇÖZELTİSİ: (Jel elektroforezi için loading dye)

- % 0,25 (w/v) **Bromophenol blue:** 6,25 mg bromophenol blue alınır.
- % 40 (w/v) **sucrose:** 10 gr sükröz tartılır.
- Hacim 25 ml.ye ddH₂O ile tamamlanır.
- +4 °C'de saklanır.

100 µM PMSF:

- 0,174 gr. PMSF tartılır.

- Hacmi ddH₂O ile 10 ml.'ye tamamlanır.
- -20 °C'de saklanır.

1 M DTT:

- 1,54 gr DTT tartılır.
- Hacmi ddH₂O ile 10 ml.'ye tamamlanır.
- +4 °C'de saklanır.

2M KCl:

- 75,56 gr KCl
- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

4 M NaCl:

- 116,88 gr NaCl
- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

0,5 M CaCl₂:

- 36,8 gr CaCl₂
- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

0,1 M CaCl₂ : (Competent Hücre yapmak için kullanılır)

- 20 ml 0,5 M CaCl₂ solüsyonundan alınır.
- Hacmi ddH₂O ile 100 ml.'ye tamamlanır.
- Otoklavlanarak sterilize edilir.
- Oda sıcaklığında saklanır.

RNase - Free Su:

- 100 µl DPEC 100 ml suya eklenir.
- Alt üst ederek karıştırılır.
- 12 Saat 37 °C’de bekletilir.
- 10 Dakika 121 °C’de otaklavlanır.