2018

DOKTORA TEZİ

Ayşe ÇELİK

T.C.

YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

pTRE / Tet Off PLAZMİT SİSTEMİNE OKSİJEN BAĞIMLI YIKIM BÖLGESİ EKLENEREK HİPOKSİK ŞARTLARA BAĞIMLI ÇALIŞAN VEKTÖR SİSTEMİNİN TASARLANMASI VE İSKEMİK ŞARTLARDAKİ KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI

DOKTORA TEZİ

Ayşe ÇELİK

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2018

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

pTRE / Tet Off PLAZMİT SİSTEMİNE OKSİJEN BAĞIMLI YIKIM BÖLGESİ EKLENEREK HİPOKSİK ŞARTLARA BAĞIMLI ÇALIŞAN VEKTÖR SİSTEMİNİN TASARLANMASI VE İSKEMİK ŞARTLARDAKİ KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI

DOKTORA TEZİ

Ayşe ÇELİK

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

Bu araştırma; TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 214S296 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara, 2018

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

pTRE / Tet Off Plazmit Sistemine Oksijen Bağımlı Yıkım Bölgesi Eklenerek Hipoksik Şartlara Bağımlı Çalışan Vektör Sisteminin Tasarlanması ve İskemik Şartlardaki Karakterizasyonunun Yapılması

Ayşe ÇELİK

Doktora Tezi

22.02.2018

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Gülay G. CEYLAN

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. C. Nur Semerci GÜNDÜZ

Prof. Dr. Aysun BAYKARABULUT

Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN

Doç. Dr. Esra TUĞ

Doç. Dr. Gülay G. CEYLAN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Dr. Öğr. Üyesi Ender ŞİMŞEK
Enstitü Müdür Vekili

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

22.02.2018

Ayşe ÇELİK

TEŞEKKÜR

İlk olarak tüm eğitim hayatım boyunca maddi, manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim. Sevgili abime doktora süresince bana verdiği destekten dolayı müteşekkirim. Bu uzun, yoğun ve yorucu süreçte yanımda olan tüm hocalarım, arkadaşlarım ve tez danışmanım Doç. Dr. Gülay GÜLEÇ CEYLAN'a da ayrıca teşekkür ederim.

Bu araştırma; TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 214S296 nolu proje ile desteklenmiştir. Ayrıca, doktora eğitim sürecim boyunca TÜBİTAK – 2211A BİDEB Genel Yurtiçi Doktora Burs Programına bana vermiş olduğu destekten ötürü çok teşekkür ederim.

Bir ilim insanı olabilme umudu ve gayreti ile…

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **İV**
ABSTRACT ..... **V**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **Vİ**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **Vİİİ**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **X**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Tezin Özgün Değeri ve Amacı 5
2. GENEL BİLGİLER **7**
2.1.2. Kalp Hasarlarına Yönelik Potansiyel Gen Terapileri *9*
2.1.3. Gen Terapisinde Kullanılan Vektörler *10*
2.2.1. Giriş *12*
2.2.2. Konak Hücreye Uyumluluk İçin Kodon Optimizasyonu *14*
2.2.3. mRNA- Protein ekspresyonu - Protein Katlanması Arasındaki İlişki *15*
2.2.4. Sentetik Gen ve Ekspresyon Vektörü İlişkisi *16*
2.3. Rekombinant Protein Tasarımında Biyoninformatik Kullanımı 18
2.3.1. Giriş *18*
2.3.2. I-TASSER Sunucusunun Kullanılması *19*
2.4. HIF-α – Prolil Hidroksilaz ve Von Hippel Lindau Protein İlişkisi 22
2.4.1. HIF Transkripsiyon Faktörü *22*
2.4.2. HIF-α'nın Hidroksilasyon ile Kontrolü *22*
2.4.3. Oksijen Bağımlı Yıkım Bölgesi ile pVHL-PHD Etkileşimleri. *23*
3. MATERYAL VE YÖNTEM **25**
3.1. Giriş 25
3.1.1. Yöntem Taslağı *26*
3.2. Materyal 27
3.2.1. Kullanılan pTet-Off Sistemi ve pSIREN-ZsGreen Vektörü *27*
3.2.2. Satın Alınan ODD ve Doku Plazminojen Aktivatörü Genleri .. *28*
3.2.3. Tez Çalışmasında Tasarlanan Primerler *29*
3.2.4. Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri *29*
3.2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar *30*
3.2.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar *31*

3.3. Yöntem 32
3.3.1. Yapılan İn Siliko ve İn Vitro Deneysel Çalışmalar 32
3.3.1.1. Gen Tasarımları 33
3.3.1.3. Kompetent Hücrenin Hazırlaması 38
3.3.1.4. Moleküler Klonlama 40
3.3.1.5. Hücre Kültürü 47
3.3.1.6. Hücre Canlılık Analizi (Tyrpan Blue Cell Viability Assay) 49
3.3.1.7. Transfeksiyon İşlemi 50
3.3.1.8. $CoCI_2.5H_2O$ Kullanılarak Hipoksik Ortam Karakterizasyonu 52
3.3.1.9. İmmünfloresan Antikor Testi (IF testi) 52
3.3.1.10. Hücreden Protein İzolasyonu 54
3.3.1.11. Bradford Analizi ile Protein Miktar Tayini 55
3.3.1.12. Western Blot Analizi 55
4. BULGULAR 60
4.1. Gen Tasarımı ve Kodon Optimizasyonu 60
4.1.1. ODD Gen Tasarımı *60*
4.1.2. Doku Plazminojen Aktivatörü Tasarımı *61*
4.1.3. GeneScript Firmasından Gelen Genler *62*
4.2. Genlerin Klonlanması 63
4.2.1. Tet-ODD Vektörünün Klonlanması *63*
4.2.1.1. N Ucuna ODD geninin Klonlanması (ODD-TETR-VP16) 63
4.2.1.2. ODD geninin TETR-VP16 Ortasına Klonlanması (TETR-ODD-VP16) 68
4.2.2. pTRE-ZsGreen Reportör Plazmitinin Oluşturulması *75*
4.2.3. pTRE-tPA Vektörünün Klonlanması *80*
4.3. I-TASSER Sunucusundan Gelen Protein Yapı Tahmini Sonuçları 82
4.4. Florometrik Ölçüm Sonuçları 89
4.4.1. Transfeksiyon Optimizasyonu *89*
4.4.2. Hipoksi Mimik Ortam Karakterizasyonu *90*
4.4.3. Zamana Bağlı Floresan Protein Ekspresyonu Ölçümü *91*

4.4.4. Sistemin Güvenirliliğinin Belirlenmesi için Yapılan Tekrar Deneyleri ... *92*
4.5. İmmünfloresan Antikor Testi (IF) Sonuçları ... 94
4.6. Western Blot Analizi Sonuçları ... 97
4.6.1. Bradford Analizi ile Belirlenen Protein Konsantrasyonları ... *99*
5. TARTIŞMA ... 101
6. SONUÇ VE ÖNERİLER ... 106
7. KAYNAKLAR ... 107
8. EKLER ... 117
EK-1. Sipariş Verilen Genlerin Dökümanları ... 117
EK-2. Sekans PZR Sonucu ... 119
EK-3. Etik Kurul Belgesi Bilgi Notu ... 121
EK-4. Özgeçmiş ... 123

ÖZET

pTRE / Tet Off Plazmit Sistemine Oksijen Bağımlı Yıkım Bölgesi Eklenerek Hipoksik Şartlara Bağımlı Çalışan Vektör Sisteminin Tasarlanması ve İskemik Şartlardaki Karakterizasyonunun Yapılması

İskemi, dokulara giden kan akımının kesilerek dokuda hücresel metabolizma için gerekli olan oksijen ve glikoz desteğinin ortadan kalkmasıdır. İskemik semptomlar belirgin olmadığı için hastalar zamanında gerekli tedaviyi alamamaktadır. Yapılan bu çalışmada, iskemi hasarlarına karşı etkin bir tedavi geliştirilmesi adına, hipoksi durumunda hedef terapötik protein regülasyonunu tetikleyecek bir gen terapi sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

HIF-1α hücre içinde oksijen homeostazisi düzenlenmesinde görev alan temel bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi durumunda, oksijen bağımlı hidroksillenme azaldığı için hücre içi miktarı artar. Bu vasfı, ODD bölgesinin varlığından kazanır. ODD bölgesini, TetR-VP16 transaktivatör proteini ile hibrit hale getirip yeni bir gen sistemi oluşturmak tezin temelini oluşturmaktadır. Bu gen sistemi, transaktivatör ve reportör iki plazmitten oluşmaktadır. Bir plazmitten sürekli olarak kimerik TET-ODD proteini üretilirken, sadece hipoksik durumda hücre içinde stabil kalan TET-ODD transkripsiyon faktörü hedef terapötik gen ekspresyonunu başlatacaktır.

Yapılan deneylerde, tasarlanan ODD bağımlı gen sisteminden hipoksik şartlarda hedef protein ekspresyonunda 4 kata kadar artış izlendi ($n=3$, $p<0.05$). Ayrıca, western blot ile kimerik TET-ODD proteinin hipoksi stabilizasyonunda 6 katlık fark gözlendi. IF antikor testi ile de TET-ODD protein lokalizasyonunun ağırlıklı olarak sitoplazmada olduğu belirlendi. Ayrıca, yapılan protein modellemeleri ile tasarlanan kimerik proteinin yüksek verimde çalışacak formu ODD-TetR-VP16 transkripsiyon faktörü olarak belirlendi. Tasarlanan TET-ODD gen sisteminin hipoksiye verdiği ilk 6 saat içerisinde yanıt vermesi, iskemik durumlarda gen terapisinde kullanılmak için yararlı ve geliştirilebilir nitelikte olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gen terapisi, Hipoksi, Prolin rezidüsü, Sentetik Biyoloji, Transkripsiyon Faktörü.

ABSTRACT

Designing a Vector System that Works in Hypoxic Conditions by Adding Oxygen Dependent Degradation (ODD) Domain to pTRE / Tet-Off Plasmid System and Chacterization of the System in Ischemic Conditions

Tissue hypoxia, or ischemia, is the condition that describes the poor conveyance of oxygen and other vital products to tissues and organs. Ischemia progress silently, patients miss timely and proper treatments. In order to provide cardiovascular protection against ischemia and reperfusion, we are developing a vigilant gene therapy system whose expression level can be automatically up regulated by hypoxic ischemia.

HIF-1α is a transcription factor that functions as a master regulator of oxygen homeostasis. HIF-1α protein levels increase under hypoxic conditions because of decreased O_2 dependent prolyl-hydroxylation. ODD domain of HIF-1α was used as a switch to turn on the target gene expression in response to hypoxic signal. This hypoxia inducible plasmid system is a double plasmid system: transactivator plasmid and reporter plasmid. Chimeric transcription factor (TET-ODD) is being produced constantly from transactivator plasmid. In hypoxic condition, TET-ODD can stay stabilized in the cell and triggers expression of target gene.

Our experiments showed that the ODD-mediated expression could quickly increase 4 fold within 6 hours of hypoxia ($n=3$) ($p<0.05$). Also, localization and stabilization of TET-ODD transcription factor was proved by immunofluorescence assay (IF) ad western blotting (WB) analysis. WB results showed that expression of TET-ODD protein increase 6-fold. The IF test showed that ODD linked tTA proteins were localized mainly in the cytoplasm. The ODD-TETR-VP16 protein showed high-ranking hydroxylation stability under hypoxia in protein modelling. From these results, we concluded that this hypoxia inducible double plasmid system could be used therapeutically to switch on genes that have proven beneficial effects in ischemia.

Keywords: Gene Threapy, Hypoxia, Proline residue, Synthetic Biology, Transcription Factor

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAV	: Adeno benzeri virüsler
APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albümin
Cfu	: Koloni oluşturma birimi
CMV	: Sitomegalovirüs
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	: DNA Bağlanma Bölgesi
DMEM	: Modifiye bazal hücre medyumu (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
E. coli	: Escherichia coli
Epo	: Eritropoetin
EtBr	: Etidyum bromür
GAL4	: Galaktoz duyarlı transkripsiyon faktörü
GAPDH	: Gliseraldehit 3-P dehidrogenaz
GC	: Guanin-Sitozin
GFP	: Yeşil floresan protein
HEK293T	: İnsan embriyonik böbrek hücresi
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü
HRE	: Hipoksi cevap elementi
IF	: İmmünfloresan
IPTG	: İzopropil β-D-1-tiogalaktopiranosit
I-TASSER	: Protein yapı ve fonksiyon tahmin modellemesi
IV	: İntravenöz
KCI	: Potasyum klorür
KOH	: Potasyum hidroksit
LB	: Lizojen medyum
MCS	: Çoklu klonlama bölgesi
$MnCI_2 . 4H_2O$	: Manga 2 klorür tetrahidrat
MOFS	: Çoklu organ yetmezliği sendromu
ODD	: Oksijen Bağımlı Yıkım Bölgesi

p65 : Transkripsiyon Aktivasyon Bölgesi (NFkB ailesine ait)
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDB : Protein veri tabanı
PEI : Polietilenamin
PGK-1 : Fosfogliserat kinaz 1
PHD : Prolil Hidroksilaz
PIPES : 1,4-Piperazindiethansülfonik asit
PVDF : Poliviniliden diflorür
PZR : Polimer zincir reaksiyonu
RBS : Ribozom bağlanma bölgesi
RIPA : Liziz tampon (Radioimmunoprecipitation assay)
RISC : RNA bağımlı susturma kompleksi
SDS : Sodyum dodesil sülfat
SERCA2 : Sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2}-ATPaz
TBE : Tris- asetat- EDTA tampon çözeltisi
TBS-T : Tris tampon tuz çözeltisi
TEMED : N, N, N, N, -tetrametiletilenamin
tetO : Tet operon bölgesi
TETR : Tetrasiklin bağımlı regülatör protein
TF : Transkripsiyon faktörü
tPA : Doku plazminojen aktivatörü
TRE : TETR bağlanma bölgesi
tTA : Tetrasiklin duyarlı transkripsiyon aktivatörü
UV : Ultraviyole ışın
VEGF : Vasküler endotel büyüme faktörü
VP16 : Transkripsiyon aktivasyon bölgesi (Herpes Simpleks virüsüne ait)
WB : Western Blot
6X-His : 6'lı histidin rezidü etiketi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HIF1-α geninin hücre içi çalışma prensibi 3
Şekil 1.2. Tasarlanan TET-ODD-VP16 proteininin çalışma prensibi 4
Şekil 2.1. Gen terapisi ile hastaya hedef genin transferi 7
Şekil 2.2. Rekombinant protein üretimindeki anahtar belirleyiciler 13
Şekil 2.3. I- TASSER sunucusunun giriş sayfası 19
Şekil 2.4. I TASSER analiz sonuçları 1 20
Şekil 2.5. I TASSER analiz sonuçları 2 20
Şekil 2.6. I TASSER analiz sonuçları 3 21
Şekil 2.7. I TASSER analiz sonuçları 4 21
Şekil 2.8. HIF protein sisteminin regülasyonu 23
Şekil 3.1. Tasarlanan hipoksik sistemden alınması beklenen ölçüm sonucu. 26
Şekil 3.2. Tet Off vektör sisteminde gen regülasyonu 28
Şekil 3.3. pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 Retroviral vektörünün haritası 28
Şekil 3.4. NCBI veri tabanındaki HIF1A gen bilgileri 33
Şekil 3.5. HIF1A geninin mRNA sekansı. 34
Şekil 3.6. SnapGene kullanımı 34
Şekil 3.7. ODD sekansının belirlenmesi 35
Şekil 3.8. ODD bölgesinin klonlama için optimizasyonu. 35
Şekil 3.9. Doku plazminojen aktivatörünün klonlama için optimizasyonu 36
Şekil 3.10. Klonlama işlemini oluşturan tüm basamakların şematik gösterimi 40
Şekil 4.1. pTet-off vektörüne klonlanacak ODD gen tasarımı 61
Şekil 4.2. tPA gen optimizasyon simülasyonu. 62
Şekil 4.3. N ucuna klonlanan ODD'nin haritası 63
Şekil 4.4. pUC57 XbaI-SpeI kesimi sonrası jel ekstraksiyonu yapılacak bantlar. 65
Şekil 4.5. ODD-TETR-VP16 vektörünün koloni PZR sonucu. 67
Şekil 4.6. SnapGene programı ile yapılan enzim kesimi simülasyonu 68
Şekil 4.7. Ligasyon sonucu pozitif çıkan örneklerin enzim kesim sonuçları 68
Şekil 4.8. SnapGene programı ile simüle edilen PZR ürünü 69
Şekil 4.9. Q5 PZR sonucu çoğaltılan ODD geni 70
Şekil 4.10. TETR-ODD-VP16 koloni PZR sonucu 72
Şekil 4.11. TETR-ODD-VP16 geninin enzim kesim kontrolü simülasyonu 73
Şekil 4.12. TETR-ODD-VP16 enzim kesim ile klonlama kontrol sonucu. 73

Şekil 4.13. TETR-ODD-VP16 vektörünün sekans PZR sonucu 74
Şekil 4.14. ODD geninin TETR-VP16 arasına klonlanmış halinin haritası 74
Şekil 4.15. pSIREN-RetroQ-ZsGreen plazmit haritası..... 75
Şekil 4.16. ZsGreen geninin PZR sonucu..... 76
Şekil 4.17. pTRE vektörünün enzim kesim sonucu..... 77
Şekil 4.18. pTRE-ZsGreen vektörünün koloni PZR sonucu..... 79
Şekil 4.19. Koloni PZR sonucu pozitif çıkan koloniler enzim kesim sonucu. 79
Şekil 4.20. Klonlanan pTRE-ZsGreen plazmitinin haritası. 80
Şekil 4.21. Klonlanan pTRE-tPA vektörünün enzim kesimi ile kontrolü 82
Şekil 4.22. Klonlanan pTRE-tPA plazmitinin haritası..... 82
Şekil 4.23. HIF1A'nın sekonder yapı tahmin sonucu 83
Şekil 4.24. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri..... 84
Şekil 4.25. ODD-TETR-VP16'nın sekonder yapı tahmin sonucu 84
Şekil 4.26 Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri..... 85
Şekil 4.27. TETR-ODD-VP16'nın sekonder yapı tahmin sonucu 85
Şekil 4.28. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri..... 86
Şekil 4.29. GAL4-ODD-p65'in sekonder yapı tahmin sonucu 86
Şekil 4.30. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri..... 87
Şekil 4.31. Optimum transfeksiyon için DNA / PEI miktarı optimizasyonu..... 90
Şekil 4.32. Transfeksiyonda süre optimizasyonu. 90
Şekil 4.33. Hipoksi doz-cevap analizi sonuçları..... 91
Şekil 4.34. Zamana bağımlı floresan protein ekspresyon ölçüm grafiği 91
Şekil 4.35. Yapılan 3 farklı floresan ölçüm sonucu..... 93
Şekil 4.36. Yapılan floresan ölçümlerin ortalama ve normalize halleri. 94
Şekil 4.37. Floresan anti-VP16 ile işaretli tTA proteinlerinin IF testi sonucu 1 95
Şekil 4.38 Floresan anti-VP16 ile işaretli tTA proteinlerinin IF testi sonucu 2. 96
Şekil 4.39. ImageJ programında yapılan protein lokalizasyon analizi. 97
Şekil 4.40. Hipoksi sonrası izole edilen WB sonuçları..... 98
Şekil 4.41. Hipoksi sonrası WB sonuçları. 98
Şekil 4.42. BioRad Imafe Lab programında yapılan bant analizi sonucu. 99
Şekil 4.43. Standart ölçümleri ile oluşturulan standart eğri denklemi ve grafiği 100

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kardiyovasküler gen terapilerinde kullanılan vektörler ve özellikleri 11
Tablo 2.2. Türe spesifik fenilalanin ve stop kodon bulunma frekansları tablosu 14
Tablo 2.3. DNA tasarım ve optimizasyonunda kullanılan programlar 14
Tablo 3.1. Kullanılan primer isimleri ve diziler 29
Tablo 3.2. HEK-293T hücre hattının özellikleri 30
Tablo 3.3. Deneylerde Kullanılan Gen-Kimyasal-Kit Listesi 30
Tablo 3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi 31
Tablo 3.5. I-TASSER'de yapı modellemesi yapılan aminoasit dizileri. 37
Tablo 3.6. LB (Lysogeny Broth) besiyeri bileşenleri 39
Tablo 3.7. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu içerik ve şartları 43
Tablo 3.8. Ligasyon Protokolü 46
Tablo 3.9. PZR reaksiyon içerikleri 46
Tablo 3.10. Sekans PZR reaksiyon bileşenleri ve şartları 47
Tablo 3.11. HEK293T hücre hattının kültürü esnasındaki morfolojisi 48
Tablo 3.12. Kullanılan hücre tabağına göre DNA miktarları 50
Tablo 3.13. Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması 56
Tablo 3.14. Yürütme jeli içeriği 56
Tablo 3.15. Hizalama (Stacking) jeli ve tampon çözelti bileşenleri 57
Tablo 3.16. Western Blot'ta kullanılan antikorlar 58
Tablo 4.1. Sipariş edilen ODD gen kontrolü 62
Tablo 4.2. Sipariş edilen tPA gen kontrolü 63
Tablo 4.3. pTet-off ve pUC57-ODD vektör kesimi 64
Tablo 4.4. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar 65
Tablo 4.5. Ligasyon aşamasında örneklerin hazırlanışı 65
Tablo 4.6. Ligasyonda hazırlanan her bir tüpten yapılan transformasyon sonucu 66
Tablo 4.7. Koloni PZR bileşenleri 66
Tablo 4.8. Kullanılan primerler 69
Tablo 4.9. Q5 PZR reaksiyon miktarları 69
Tablo 4.10. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar 70
Tablo 4.11. Enzim kesimi bileşenleri 71
Tablo 4.12. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar 71
Tablo 4.13. Ligasyon bileşenleri 71

Tablo 4.14. Koloni PZR bileşenleri 72
Tablo 4.15. Sekans PZR bileşenleri 74
Tablo 4.16. PZR Bileşenleri 75
Tablo 4.17. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar 76
Tablo 4.18. Enzim kesim bileşenleri 77
Tablo 4.19. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar 77
Tablo 4.20. Ligasyon bileşenleri 78
Tablo 4.21. Koloni PZR bileşenleri 78
Tablo 4.22. Enzim kesim bileşenleri 80
Tablo 4.23. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar 81
Tablo 4.24. Ligasyon bileşenleri 81
Tablo 4.25. I-TASSER'den elde edilen sonuçlar. 87
Tablo 4.26. NetSurfP sunucusundan alınan sonuçlar 89
Tablo 4.27. Transfeksiyon bileşen oranları 90
Tablo 4.28. Bradford analizi için hazırlanan standartların ölçüm sonuçları 99
Tablo 4.29. Bradford analizi için hazırlanan örneklerin ölçüm sonuçları 100

1. GİRİŞ

İskemi, dokulara giden kan akımının kesilerek dokuda hücresel metabolizma için gerekli olan oksijen ve glikoz desteğinin ortadan kalkması olarak tanımlanmıştır (1). İskemik durumda, hücrenin metabolik ve yapısal pek çok değişikliğe ve bozukluğa uğradığı, özellikle oksijen bağımlı fosforilasyonun bozulup enerji üretiminin kısıtlandığı, hücre bütünlüğünü sağlayan hücre zarının fonksiyonunun bozularak, bir dizi reaksiyon zinciri sonucu hücrenin ölüme sürüklendiği daha önceki araştırmalarda kanıtlanmıştır (2). Günümüzde dünya üzerinde halk sağlığını ciddi tehdit eden pek çok hastalığın temelinde iskemi bulunmaktadır (3). Bu hastalıklar arasında, miyokard enfarktüsü (kalp krizi), inme, periferik damar yetmezliği, anjina pektoris- göğüs ağrısı, emboliye bağlı damar tıkanmaları, kalp cerrahisi gerektiren girişimlerdir. Bu hastalıkların dünya üzerinde meydana getirdiği sağlık problemi büyüklüğünü ve neden olduğu ekonomik yükü anlamak, iskemi üzerine yapılacak çalışmaların önemini daha iyi açıklamaktadır.

Daha önce yapılan bir istatistiksel çalışmaya göre (4, 5), 2013 yılında sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde (6) 635 000 yeni kalp krizi atağı vakası meydana gelirken, 386 324 kişi kalp krizi nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Aynı çalışmaya göre, ABD'de her 6 ölümden 1 tanesi koroner kalp hastalığından kaynaklanmaktadır. ABD'nin 2013'te koroner kalp hastalığı için 108.9 milyar dolarlık harcama yapmasının beklendiği belirtilmiştir (5).

Benzer sonuçlar, beyin damarlarından birinin tıkanması sonucu beyin hücrelerinin zarar görmesini tanımlayan inme için de söz konusudur. ABD'de 795 000 yeni inme vakasının saptandığına işaret edilirken bunların %87'sinin iskemi kaynaklı olduğu vurgulanmaktadır. Çalışmada, her 4 dakikada inmeye bağlı bir ölümün gerçekleştiği; bunun da ABD'deki her 19 ölümden birine karşılık geldiği ifade edilmiştir (4). Aslında dünya genelinde görülen ölüm sebeplerinde kalp hastalıkları ilk sırayı alırken inmenin dördüncü sırada olduğu görülmektedir ki, her iki önemli sorunun temelinde iskemi mekanizması yer almaktadır (5).

İskeminin tek başına hücrede meydana getirdiği problem, sorunun sadece küçük bir kısmını meydana getirmektedir. İskeminin sebep olduğu yukarıda bahsedilen tüm sağlık sorunlarında hastalarda ölümcül sonuçlar oluşturan diğer bir önemli mekanizma ise reperfüzyon hasarı olarak adlandırılmaktadır. Reperfüzyon hasarı; oksijen ve glikoz eksikliği çeken hücre topluluğuna tekrar kan gelmesinin ardından, oksidatif fosforilasyon fonksiyonunun geri gelmesine rağmen hücreye ciddi zararı dokunan reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller denilen özel kimyasalların üretilmesi sonucu iskemi hasarının daha da artması olarak tarif edilmiştir (3). Literatürdeki verilere dayanarak günümüzde kalp krizi tedavisinde kullanılan tüm tedavi girişimleri (trombolitik ilaç tedavisi, damar içine stent yerleştirme, koroner by-pass vb.) bahsedilen reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Şiddetli olgularda çoklu organ yetmezliği sendromuna (Multiple Organ Failure Syndrome) sebep olarak, yoğun bakımda yatan hastalarda % 30-40 oranında ölüme sebep olmaktadır (3).

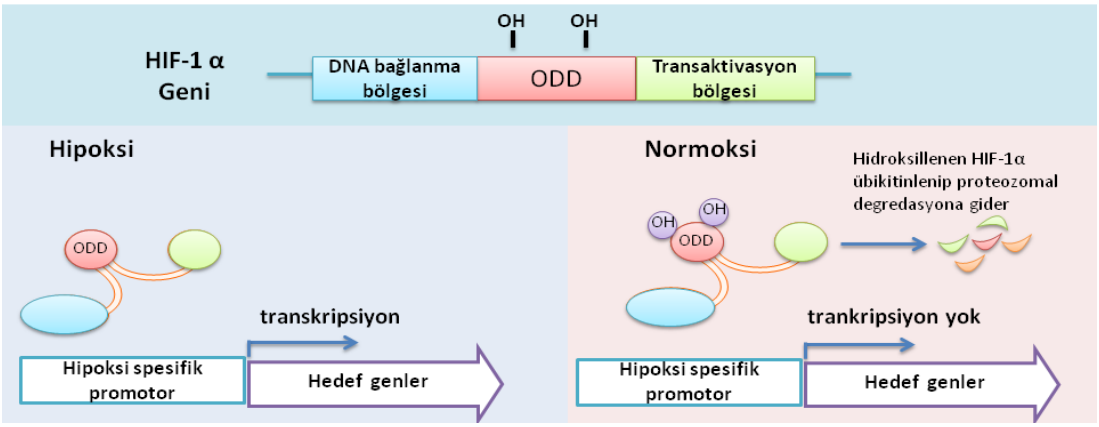
Diğer önemli bir nokta ise meydana gelen kalp krizlerinin %21'i, inmelerin % 6 ila % 28'i herhangi bir klinik belirti vermeksizin gerçekleşmekte, bu nedenle hasta henüz gerekli tıbbi müdahale uygulanmadan doku kaybına uğrayabilmekte veya ölebilmektedir (4). Tüm bunlar, bahsi geçen sağlık sorunlarının çözümü adına, hassas bir algılama özelliğine sahip, hızlı ve etkili bir tedavinin gerekli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, 2000'li yıllarda öne çıkan sentetik biyoloji alanındaki gelişmelerden (7) faydalanılarak vücudun kendi hücrelerine iskemi hasarıyla başa çıkabilecek donanımı kazandırmak amaçlanmaktadır. Bunun için hücreye, O_2 değişiminin algılanmasını arttıracak bir sensör sistemi eklenerek, hipoksiye karşı hızlı ve etkili bir cevap oluşturulması hedeflenmektedir.

Bu amaç doğrultusunda, oksijen değişimine yanıt verebilir bir gen sistemi tasarlamak ve bu sistemin yanıtı olarak üretilecek tedavi amaçlı bir protein belirlemek gerekmektedir. Hücrenin doğal mekanizmasında, hipoksi sinyalinin hücre içinde aktive ettiği belli transkripsiyon faktörleri ve bu faktörlerin aktive ettiği gen dizileri mevcuttur. Hücrenin hipoksik duruma adapte olabilmesi için bir grup gen spesifik olarak tetiklenmektedir. Hipoksi tarafından tetiklenen bu genler anjiyojenik büyüme faktörleri, anti-apoptotik genler, ısı şoku proteini gibi genlerdir. Bu genler,

hipoksi indükleme faktörü olarak bilinen HIF transkripsiyon faktörü tarafından hedeflenip, ekspresyonları tetiklenir (8). Hipoksik durum, bu transkripsiyon faktörünün hücre içi miktarını kontrol eder ve bu gen üzerinden de diğer genler kontrol edilir (9).

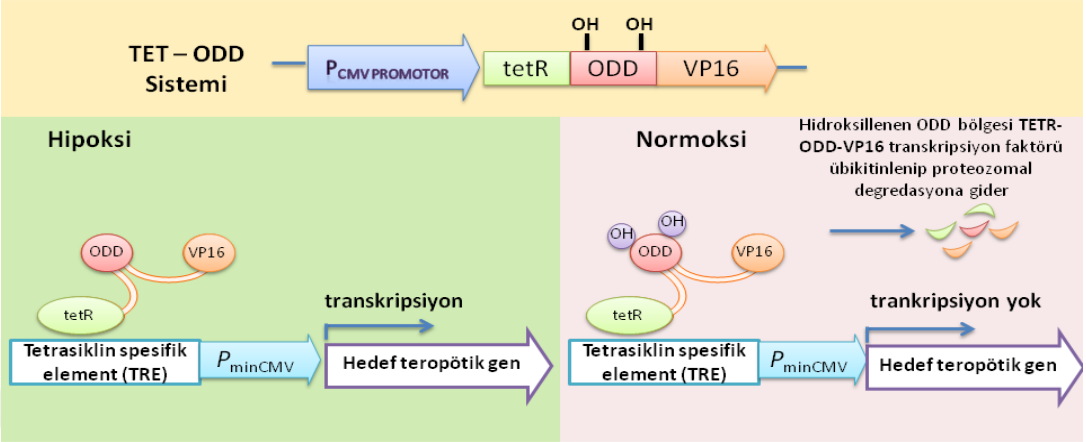
HIF-α'ya bu regülasyon özelliğini veren, oksijen bağımlı yıkım bölgesi (ODD) olarak adlandırılan yaklaşık 200 aminoasit rezidüsünden oluşan bir peptit dizisidir (10). Oksijenin hücre içinde yeterli olduğu durumlarda, HIF-α'ya prolil hidroksilaz enzimi (PHD) tarafından hidroksil gruplarının takılarak, übikütin-proteozom yıkım yolu üzerinden yıkımının sağlandığı bilinmektedir (10, 11) (Şekil 1.1). Bununla birlikte aynı peptit, hipoksi durumunda oksijen substrat olarak kullanılamadığından yıkım yolağına yönlendirilemez ve hipokside hücre içinde yüksek konsantrasyonlara ulaşabilir (12). ODD bölgesinin bu özelliğini, seçilen bir transkripsyon aktivatör proteinine kazandırarak bir çeşit hipoksi sensörü tasarlamak tezin temelini oluşturmaktadır.



Şekil 1.1. HIF1-α geninin hücre içi çalışma prensibi (10). Şekil Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.

ODD'nin bu yaklaşımla hipoksi durumunda, hedef gende yüksek bir ekspresyon miktarına ulaşmayı kolaylaştırabileceği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. ODD bölgesi GAL4-p65 hibrit transkripsiyon faktörlü ile bitişik sentezlenerek, hipokside promotor cevabını kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırabilmiştir (13). Bu çalışmada, benzer bir sistem, TetR-VP16 kompleksi kullanılarak elde edilmiştir. Bu sistemde TetR bölgesi uygun tetrasiklin bağımlı element (6) ile etkileşime geçerken, VP16 transaktivasyon bölgesi, ilgili promotoru çalıştırmaya başlatacaktır. ODD bölgesi ile hibrit hale getirilen TetR-ODD-VP16

kompleksi hipoksi koşullarında hücre ortamında stabil kalabileceği için, sadece hipoksi durumunda çalışabilen bir protein kompleksine dönüştürülmüş olacaktır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Tasarlanan TET-ODD-VP16 transkripsiyon faktörünün çalışma prensibi. Şekil Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.

Bu sistem sayesinde, kalp krizi veya inmede olduğu gibi çoğunlukla emboli sonucu oluşan iskeminin hücrelerce hızlı ve etkili şekilde algılanabileceği öngörülmektedir. Bu sistem tarafından pıhtı eritici bir protein üretilecek olursa, iskemi sebebi olan pıhtının kontrollü olarak ortadan kaldırılması mümkün olabilecektir. Bu çalışmada, tasarlanan gen sisteminden hedef terapötik protein olarak doku plazminojen aktivatörü (tPA) üretilmesi korener arter rahatsızlıkları sonucu oluşan iskemik kardiyomiyopati için tedavi yöntemi olarak sunulmuştur.

Doku plazminojen aktivatörü, bilinen en önemli pıhtı çözücü maddelerden bir tanesidir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin verdiği bilgilere göre doku plazminojen aktivatörü, plazminojeni plazmine çevirerek aktifleştirir ve oluşan pıhtının plazmin tarafından yıkılmasını sağlar (14). İnsan hücrelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Doku plazminojen aktivatörü rekombinant olarak ilk defa *Escherichia coli* bakterisine üretilmiştir. Üretilen plazminojenin doğal formu ile aynı etkinliği gösterdiği de deneysel olarak kanıtlanmıştır (15, 16). Bu yüzden terapötik olarak hedef gösterilebilecek bir proteindir.

1.1. Tezin Özgün Değeri ve Amacı

Doku iskemisi ile ilgili farmakolojiden biyomedikal endüstrisine, çeşitli ilaç ve tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. Bununla beraber, hala tam bir tedavi yöntemine ulaşılabilmiş değildir. Tedavi geliştirmede kullanılan yaklaşımlardan biri de sentetik biyoloji ve gen terapisidir (17).

Sentetik biyoloji ve gen terapisi yöntemleri kullanılarak kalp yetmezliğine yönelik tedavi denemeleri (Kardiyak sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca+2 ATPase pompalarını etkileyen SERCA2a geni hedefli çalışmalar) Faz II aşamasını başarılı ve güvenli bir şeklide tamamlamıştır (18, 19). Gen terapis kardiyovasküler rahatsızlıklar için çeşitli ve güvenli uygulama yöntemlerinin halihazırda mevcut olması, iskemik kardiyomiyopati için hipoksi duyarlı sistemlerin tasarlanabileceğinin göstergesidir (19). İnsanda hipoksi regülasyon mekanizmasının temelini oluşturan HIF-α geninin mekanizması, çalışmamızda tasarlanmak istenilen gen sisteminin temelini oluşturmaktadır.

HIF-1α, hipoksik şartlarda aktif olan bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1α proteininin düşük oksijen düzeyinde stabil olması, normal oksijen düzeyinde ise yıkılması hücre içi regülasyonunu sağlayan önemli bir özelliktir. HIF-1α proteini, normal oksijen seviyesinde prolil hidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenir ve hidroksillenen HIF-1α proteini übikütinlenerek yıkılır (20, 21).

HIF-1α transkripsiyon faktörünün bağlandığı hipoksi cevap elementi (HRE) ile birleştirilen herhangi bir promotör sistemi ile transkripsiyon düzeyinde hipoksiye cevap verebilen sistemler kurmak mümkündür (22). Ancak, bu sistemlerin aktivitesi HIF-1α'nın ekspresyon düzeyine göre hücreden hücreye değişmektedir (23). Bu sebeple çalışmamızda hücre içi HIF-1α seviyesinden bağımsız olarak çalışan endo/ekzojen sinyallerle kontrol edilebilen bir sistem tasarlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, iskemi- reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik yeni bir gen terapisi yöntemi geliştirmektir. Bu amaçla, hücrelerin düşen oksijen seviyesine karşı regülasyonunu hızlandırabilecek bir sistem tasarlanıp, iskemideki çalışması karakterize edilmiştir. Bu sayede, iskemi sonrasında oluşan hasar oluşmadan engellenecek, doku düşük oksijenden kaynaklanan stresten kurtarılacaktır. Hücreleri

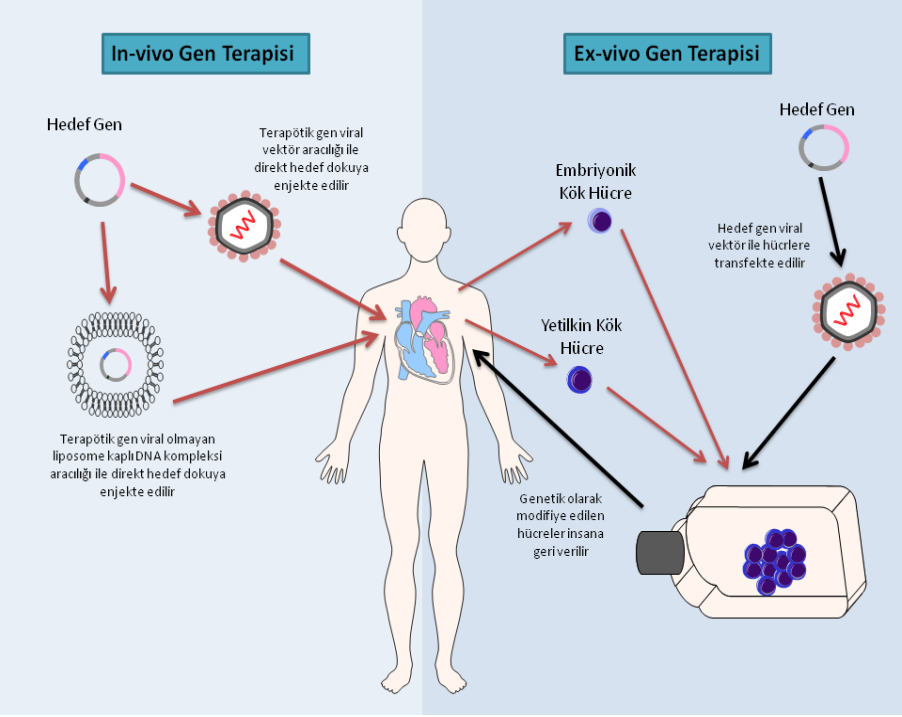
modifiye edebilmek için daha önceki çalışmalarda denenmemiş olan TETR-VP16 transkripsiyon faktörü, ODD bölgesi ile hibrit hale getirilecek, bu sayede hipoksiye duyarlı bir gen sistemi kurulacaktır. Bu gen sistemi, iki vektörden oluşacaktır. Birinci vektörden güçlü ve sürekli çalışan bir promotordan ODD-TETR-VP16 transkripsiyon faktörü üretilecek, bu faktör oksijen (O_2) seviyesine bağlı olarak normal O_2 seviyesinde proteozomal yıkıma gidecek, hipokside aktif kalarak ikinci vektör üzerindeki TETR bağlanma bölgesine (TRE) bağlanarak hedef proteinin transkripsiyonunu başlatacaktır. Bu vektör sistemi, aynı zamanda tetrasiklin ile de kontrol edilebildiği için, tasarlanan sensör sistem iki parametre (oksijen, tetrasiklin varlığı/yokluğu) ile kontrol edilebilen gen terapisinde kullanılmaya aday bir müdahale yolu olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gen Terapisi

2.1.1. Giriş

Gen terapisi, genin kendisine ya da fonksiyonuna farklı açılardan müdahale edilen her bir tedavi yöntemine denir. Bu yöntemler, genetik modifikasyonlar ile hastalık semptomlarını azaltmaya veya tedavi etmeye yöneliktir. Bu şekilde bir müdahale bir geni, genin sadece belli bir kısmını veya oligonükleotid transferini kapsar (24). Bu genetik materyallerin transferi, direk olarak hastanın hücrelerini transfekte ederek (in vivo gen terapisi) ya da hastanın kendi hücreleri alınıp in vitro olarak laboratuvar ortamında transfekte edilip, modifiye hücrelerin hastaya nakli (ex vivo gen terapisi) ile olabilir (25) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Gen terapisi ile hastaya hedef genin transferi (25). Şekil Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.

Gen terapisi ile genetik bir defektin düzeltilmesi, kanser hücrelerinin eliminasyonu ya da farklılaşması, nörolojik rahatsızlıkların yavaşlatılması/ durdurulması, enfeksiyon sebep olan patojenlerin ortadan kaldırılması hedeflenebilir

(24). Hastalığın tipine, baskılanacak semptomlarına ya da mutasyon şekline bağlı olarak tedavi planı düzenlenir. Bir mutasyon bir proteinin kısalmasına, uzamasına ya da yanlış katlanmasına sebebiyet verebilir (26). Ayrıca, bir mutasyon protein ekspresyonunun hız ve miktarını da etkileyebilir (27). Kanser dahil farklı hastalıklar için kullanılan 5 temel gen terapi stratejisi mevcuttur. Bunlar, gen ekleme (gene addition), gen düzeltme (gene correction), gen susturma (gene silencing), hücreyi tekrar programlama (cell reprogramming) ve hücre eliminasyonudur (cell elimination) (27, 28).

Gen Ekleme

Hastalıkla ilişkilendirilen genin (eksiklik ya da fonksiyon kaybı durumunda) fonksiyonel bir kopyasının hücreye transfekte edilmesidir. Yerleştirilen genin kendi kontrol, başlangıç ve bitiş sinyalleri mevcuttur. Eklenecek gen viral ya da viral olmayan bir taşıyıcı vektör içinde transfekte edilir (29, 30). Hedef geni içeren ekspresyon vektörü direkt olarak dokuya, damardan (IV) ya da intraperitoneal boşluğa enjeksiyon yolları ile transfer edilir (30). Gen ekleme terapisi, adenozin deaminaz eksikliği, konjenital körlük, kistik fibrozis, hemofili, müsküler distrofi gibi tek gen hastalıklarında geliştirilmeye çalışılan bir tedavi çeşididir (27).

Gen Düzeltme

Genel itibari ile mutant veya hastalık sebebi olan genin, fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için sağlıklı kopyanın hücre içine transferidir (27). Hedef genin ekspresyonu artırılarak translasyon ve transkripsiyon seviyesindeki mutant mRNA ve protein yerine, fonksiyonel olan kopyanın üretilmesi hedeflenmektedir (27, 31).

Gen Susturma

Defekti olan genin devre dışı bırakılması ile genin sebep olduğu zararlı etkiler önlenebilir. Gen susturmada DNA'nın direk kendisi hedeflenebildiği gibi mRNA'sıda hedeflenebilir. Bunun için tek zincirli oligonükleotid denen DNA dizileri, hedef genin bulunduğu lokasyona göre tasarlanırlar. 10- 40 baz çifti uzunluğundaki bu diziler DNA'nın geniş oluğuna bağlanır ve bu bölgenin 3 zincirli hale gelmesine neden olarak transkribe olmasını engeller (32). Ayrıca, üçlü zincirli hale gelen DNA bölgesi lezyon olarak algılanır ve DNA tamir mekanizması tetiklenerek bu bölge

DNA'dan çıkartılır. Genomda çıkarılmak istenen diziye spesifik olarak tasarlanan rehber RNA'lar ile endonükleaz ya da Cas9 gibi enzimler hedefe spesifik bir şekilde çift zincir kırığı ile istenen gen bölgesinin genomdan çıkarılmasını sağlar (31, 33).

Sadece mRNA'nın hedeflendiği terapilerde, RNA interferans ve ribozimler kullanılan yollardan bazılarıdır. RNA interferansta, mRNA'ya spesifik tasarlanan oligonükleotidler hedef genin mRNA'sını çift zincirli hale getirir ve bu zinciri RNA bağımlı susturma kompleksi (7) tarafından parçalayarak genin ifadesini engeller (34).

Son olarak ribozim temelli gen susturmada, ribozim denilen enzim gibi hareket eden RNA dizileri kullanılır. Ribozim mutant genin mRNA'sına özel tasarlanır ve tanıdığı dizileri moleküler bir makas gibi davranarak parçalar (35).

Hücrenin Tekrar Programlanması

İstenilen bir özelliğin kazandırılması, hassasiyetinin artırılması, belli bir proteinin ekspresyonunun artırılması için bir ya da daha fazla genin eklenmesi ile hücrenin modifiye edilmesidir (27). Hücrelerin tekrar programlanarak yeni fonksiyon kazandırılmasında diyabet hastalığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Tip 1 diyabet pankreas adacık hücrelerinin hasarlı olmasından kaynaklanır ancak ekzokrin hücreleri sağlamdır. Bazı gen terapi denemelerinde, ekzokrin hücrelerinin tekrar programlanarak adacık hücreleri gibi insülin üretmesi hedeflenmektedir (36).

Hücre Eliminasyonu

Bu teknik genellikle malign tümörlerde veya hızlı büyüyen benign tümörlerde kullanılır. Temel strateji, intihar (suicide) geni, antianjiyojenik ajanlar veya toksik proteinler kullanılarak kanser hücresini sağlıklı hücrelere zarar vermeden elimine etmeye çalışmaktır (27).

2.1.2. Kalp Hasarlarına Yönelik Potansiyel Gen Terapileri

Kalp rahatsızlıklarında, konvansiyonel ve koruyucu tedaviler kullanılarak semptomların baskılanmasından ziyade kapsamlı bir tedavi sağlayabilen yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Gen terapileri, kalıtsal tek gen hastalıkları kadar periferik vasküler hastalıklar, aritmiler, iskemik kalp damar rahatsızlıkları gibi

poligenik hastalıklar için de geliştirilmeye çalışılan bir tedavi yoludur (19). Hastalığın moleküler temellerinin aydınlatılması, güvenli ve verimli gen transfer metotlarının geliştirilmesi sayesinde, günümüzde gen terapileri kardiyovasküler hastalıkların çözümü için güçlü bir alternatif haline gelmektedir (19).

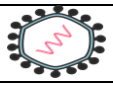
Kalp rahatsızlıklarının moleküler patolojisine göre belirlenen terapötik hedefler ile gen terapi yolları tasarlanır. Bu stratejiler, anjiyogenezin tetiklenerek oksijen ve besin ihtiyacının dokuda dengede tutulması (37), kardiyomiyositlerin kontraktilitesinin artırılarak kalp fonksiyonlarının iyileştirilmesi (38), apoptotik sinyal yollarının kalpte baskılanması (39), hücre döngüsü kontrol noktalarının uyarılarak hücre farklılaşması ve bölünmesinin tetiklenmesi (40) gibi çalışmalardır.

2.1.3. Gen Terapisinde Kullanılan Vektörler

Başarılı gen transferlerinin asıl dayanağı, hedef genin yüksek verimli vektörler kullanılarak, düşük toksisiteye sahip tekniklerle, konak hücreye spesifik olarak iletilmesidir (26). Bunun gerçekleştirilebilmesi için hedef hücre, transgen biyolojisi ve kardiyovasküler patofizyolojik süreçler hakkında geniş bilgi gerekmektedir. Ayrıca, hedef gen ve vektör iletim sistemleri, klinik olarak alınacak sonuçları etkileyen kritik etmenlerdendir (41). Bahsi geçen etmenler, kardiyovasküler sistemin tedavisi için gereken başarılı şekilde modifiye edilmiş vücuttaki hücre sayısı ile gen transfer metodu ilişkisini ortaya çıkarmaktadır. Kalp krizi sonrası hasar gören kalbe, ventriküler fonksiyonları tekrar kazandırmak için minimal invaziv perkütan koroner arter katater yöntemi ile gen iletimi sağlanmaktadır (41). Bu yol kalp yetmezliğinde son aşamada olan hastalar için uygun olsa da akut ve kronik kalp rahatsızlıklarına göre farklı gen transfer yolları da mevcuttur (37).

Gen transfer metotları viral olmayan sistemler ve rekombinant viral sistemler olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır (41) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kardiyovasküler gen terapilerinde kullanılan genel vektörler ve özellikleri. Şekiller Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.

	Viral Vektörler			**Viral olmayan vektör**
	AAV	**Lentivirüs**	**Adenovirüs**	**Plazmit**
				
Çap	20 nm	90 nm	100 nanometre	-
Genom Çeşidi	Tek zincirli DNA	RNA	Çift zincirli DNA	DNA
Maksimum kardiak ekspresyonuna ulaşma süresi	2-4 gün	4-6 gün	2-4 gün	2-4 gün
Ekspresyon Süresi	2-4 hafta	Uzun dönem	1-4 hafta	2-4 hafta
İmmün Tepki	Hafif	Orta	Güçlü	Hafif

Viral olmayan vektör sistemleri; plazmit DNA, lipozomal DNA kompleksi veya DNA taşıyıcı polimerleri içerir. Plazmitler; kendi promotör, start-stop kodonları olan ve içine hedef genin yerleştirildiği çift zincirli dairesel DNA'lardır (19).

Viral vektörler lentivirüs ve retrovirüslerin tropizma, yüksek ekspresyon gibi özelliklerinden dolayı tercih edilir. Geliştirecekleri immün cevabın baskılanmasını sağlayacak şekilde modifiye edilerek gen terapisine uygun hale getirilirler. Retrovirüsler, RNA dizisi ve ters transkriptaz enzimi taşıyan bir viral vektör grubudur. Taşıdıkları enzim sayesinde konak genom ile birleşebilirler ancak bu esnada konak hücre mitoz aşamasında olmalı yani nükleer zar kalkmış olmalıdır (42). Bu durum, retrovirüslerle sadece aktif bölünebilme hızı yüksek hücrelerin transdüksiyon olabilmesi sıkıntısını ortaya çıkarır. Bu yüzden, kardiyomiyositler bu sınıf içinde değildir (37).

Aynı aileden olan Lentivirüsler, retrolardan farklı olarak bölünmeyen hücrelerin genomuna da entegre olabilirler. Bu sayede lentiviral vektör transfer metodu ile hedef gen, uzun süreli konak genomunda eksprese olabilir. Ancak bu virüs, konak genomuna rastgele entegre olduğu için konak hücredeki genlerin işlevini bozma ihtimali yüksektir. Bu durumdan dolayı, kardiyomiyositlerde tercih edilebilir bir taşıyıcı olarak kullanılabilirler ama bu virüslerin modifiye hallerini kullanmak gen terapisi için daha uygun görülmüştür (42). Bunun için kapsit ve ters transkriptaz enzimi lentivirüs genomundan ayrılarak farklı bir vektöre klonlanır. Bu

şekilde, lentivirüs vektörüne hedef gen klonlanır. Kapsiti üretecek paketleme vektörü ile viral vektör hedef doku ya da hücreye birlikte kotransfekte edilir. Bu şekilde oluşturulan çift plazmit sistemi ile daha güvenli ve yüksek verimli bir gen terapi yöntemi oluşturulmuştur (27).

Adenovirüsler, lenti ve retrovirüslere göre daha büyük olduğu için gen terapisinde daha uzun genlerin aktarımında kullanabilirler. Ayrıca, çift zincir DNA taşıyabildikleri için ters transkrpitaza gerek duymazlar ve terapide işlem bir basamak daha kısa olur. Ancak, insan üzerindeki uygulamalarda içerdikleri E1-E4 proteinlerinden dolayı yüksek oranda immün tepki ortaya çıkarırlar (43). Bu proteinler baskılanarak patojenite profili düşük vektörler elde edilmeye çalışılmaktadır. Ekspresyon seviyesinin maksimum seviyeye ulaşması hızlı ancak etki süresi kısadır. Bu yüzden kronik kalp hastalıklarında tercih edilebilir bir yöntem değildir (19).

Adeno benzeri virüslerin (AAV), uzun ekspresyon süreleri ve kapsit protein antijenlerine göre farklı dokulara tropizma göstermeleri bu virüsleri kardiyovasküler ve genel terapilerde tercih edilir hale getirir. 20 nm'lik çaplarından dolayı gen taşıma kapasitelerinin düşük olması ise bu gen transfer metodunun dezavantajıdır (29).

Her gen iletim metodunun kendi avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Başarılı bir gen terapisinde asıl amaç, yüksek ekspresyon gösterebilen, doku yönelimi olan yani hedef hücreye transfeksiyon sırasında seçicilik gösterebilen, düşük immün tepkiye sebep olan metodu seçebilmektir. Bu nedenle, vektör ve vektör iletim sistemlerinin modifiye edilmesi ile bu seviyeye ulaşmak hedeflenmektedir (19).

2.2. Gen Tasarımı- Rekombinant Protein Üretimi

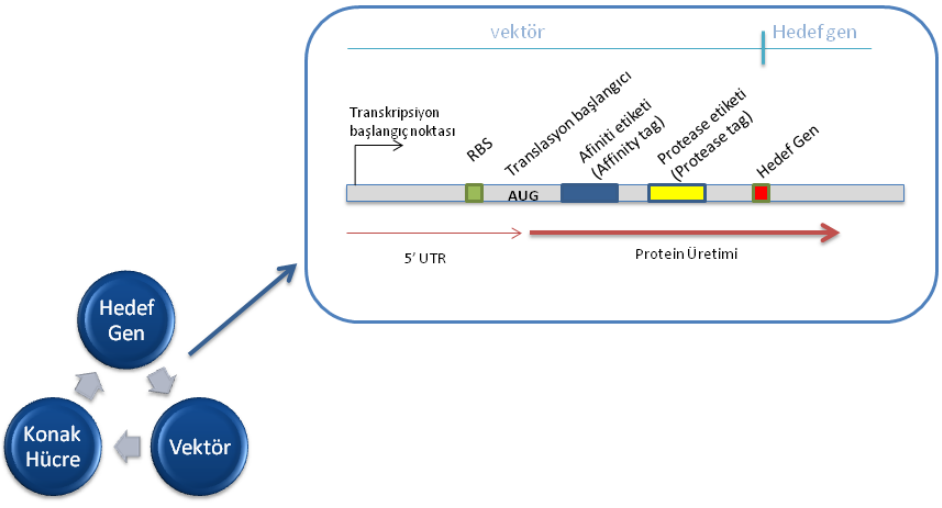
2.2.1. Giriş

Moleküler çalışmalarda, gen tasarımı ve optimizasyonu ile hedef rekombinant protein üretimi hedeflenmektedir. Bu çalışmalarda, yeterli miktarda hedef proteinin elde edilebilmesi için kodon optimizasyonu ve gen tasarımı aşamaları, özellikle post translasyonel modifikasyonlardaki problemleri önleme ve verimli üretim sağlayabilmek için önemli hususlardır. Ekspresyon vektörü kullanılarak sentetik bir

protein üretilirken üç husus önemlidir. Bunlar; (44) proteini üretmek istenilen konak hücre, (44) hedef genin klonlandığı ekspresyon vektörü seçimi ve (44) fonksiyonel bir protein elde edebilmek için hedef genin kodon optimizasyonudur (Şekil 2.2) (45).

Konak hücrede (prokaryot veya ökaryot) heterojen bir protein üretilmeye çalışılırken karşılaşılan bazı problemler mevcuttur. Bunlar; (44) ökaryot bir protein prokaryot bir konakta (mesela *Esherichia Coli*) eksprese edilirken post-translasyonel modifikasyonlar tamamlanamaz, (44) disülfit bağları sitoplazmada sınırlı olarak oluşturulabildiği için proteinin üç boyutlu yapısı ve fonksiyonu zarar görür, (44) yanlış katlanmalar sonucunda protein çözünmez bir formda kalır ve hücre içinde birikir, (4) translasyon hızı çok yavaş olduğunda yeterli miktarda hedef protein üretilemeyebilir, (5) kodon optimizasyonu ile konakta nadir olan kodonlar fazlaca hedef gene yerleştirilirse tRNA miktarının az olmasından translasyon yavaşlar (46).

Bahsedilen sınırlamaların aşılması için izlenecek protokoller halihazırda kullanılmakta ve ilerleyen çalışmalar ışığında ortaya çıkan yeni bilgilerle sürekli optimize edilmeye devam edilmektedir. Hedef genin sekansı içinde kendine ait sinyal sekansı mevcutsa protein ekspresyonu yüksektir, irisin (47), parkin (6), netrin (47) gibi proteinlerin doğal sinyalleri rekombinant protein tasarımında kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 2.2. Rekombinant protein üretimindeki anahtar belirleyiciler. *RBS: ribozom bağlanma bölgesi. Şekil Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.

2.2.2. Konak Hücreye Uyumluluk İçin Kodon Optimizasyonu

21 çeşit aminoasit varken bu aminoasitleri ifade eden 63 farklı kodon vardır. Her bir kodonun türe göre bulunma sıklığı farklıdır (48). Fenilalanin aminoasitini kodlayan 2 farklı kodon (TTT ve TTC) varken, translasyonu durduran 3 farklı stop kodon (TAA, TAG ve TGA) vardır. Bu kodonların hücre içinde bulunma frekansı konak hücreye göre değişir (49) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Türe spesifik fenilalanin ve stop kodon bulunma frekansları tablosu. Tablodaki değerler GenScript'in kodon kullanım sıklığı tablosu arayüzü kullanılarak hesaplanmıştır.

Konak Hücre Tipi	**Fenilalanin Frekansı (TTT; TTC)**	**Stop Kodon Frekansı (TAA; TAG; TGA)**
İnsan	0,45; 0,55	0,28; 0,20; 0,52
Fare	0,43; 0,57	0,26; 0,22; 0,52
Drosophila Melanogaster	0,37; 0,63	0,42; 0,32; 0,26
Arabidopsis Thaliana	0,51; 0,49	0,36; 0,20; 0,44
E. Coli	0,58; 0,42	0,61; 0,09; 0,30

Fenilalaninin 2 farklı kodonunun insanda bulunma sıklıkları birbirine çok yakın olduğu için tasarlanan gende hangi kodonla aminoasiti ifade edildiği çok önemli değildir. Ancak stop kodon için konak olarak insan hücresi kullanırken kodonun sürekli TAA ya da TAG olarak seçimi translasyonu durdurmayı zorlaştırabilmektedir (50). Dikkat edilen bir diğer husus da bulunma yüzdesi fazla olduğu için gen üzerindeki tüm fenilalenin aminoasitlerini hep aynı kodon ile ifade edilmesidir. Bu seçim, hücredeki sınırlı tRNA miktarından dolayı translasyonu çok yavaşlatabilir (tRNA deplesyonu) (48). Tüm bu parametreler göz önünde tutularak, sağlıklı bir gen tasarım için bilinen veritabanları ve programları (Tablo 2.3) kullanmak konak hücrede yeterli hedef protein eksprese etmeyi kolaylaştırmaktadır (51).

Tablo 2.3. DNA tasarım ve optimizasyonunda kullanılan programlar.

Uygulama Şekli	**İsim**	**Internet Adresi**	**Referans**
Kodon kullanım veritabanı		http://www.kazusa.or.jp/codon/	(52)
	GenScript	https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis	-
	CDBD	http://homepages.luc.edu/~cputonti/cbdb/	(53)

Tablo 2.3. DNA tasarım ve optimizasyonunda kullanılan programlar (devam).

Uygulama Şekli	İsim	Internet Adresi	Referans
Gen Tasarım Programları	Codonpt	https://eu.idtdna.com/CodonOpt	-
	DNAWorks	https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/	(54)
	EuGene	http://bioinformatics.ua.pt/eugene/	(55)
	Gene Designer	https://www.dna20.com/resources/genedesigner	(56)
	JCat	http://www.jcat.de/	(49)
	Visual Gene	http://visualgenedeveloper.net/index.htm	(57)
	SnapGene	http://www.snapgene.com/	-

Konak hücrede protein ekspresyonunu azaltan ve kodon optimizasyonuna ihtiyaç doğuran transkripsiyon, translasyon ve mRNA seviyesinde durumlar mevcuttur. DNA dizisi %70'in üzerinde GC içeriyorsa mRNA'nın ikincil yapısının oluşması yavaşlar ya da translasyon durur. %30'un altında GC varlığında ise transkripsiyon esnasında uzama basamağında yavaşlama olur. mRNA'nın ikincil yapısındaki kararsızlık ise translasyonun yavaşlamasına neden olur (58). Ayrıca, DNA dizisi üstündeki tekrar dizileri mRNA oluşumu esnasında sap-ilmik (stem-loop) yapısının oluşmasına ve translasyonun durmasına neden olur (59). Ek olarak, prematüre halde kalan poli A sinyal peptidindeki kararsızlık çekirdekte mRNA birikimine neden olur (60). Tablo 2.3'de listelenen programların kullanımı ile protein üretimini azaltan bu özellikler gen üzerinde modifiye edilebilir. Bunun için önce kodon optimzasyonu sonra DNA ya da RNA stabilitesini etkileyen faktörler optimize edilerek gen tasarımları yapılmaktadır (61).

2.2.3. mRNA- Protein ekspresyonu - Protein Katlanması Arasındaki İlişki

Kodon optimizasyonu yapılarak tasarlanan genden elde edilecek protein ekspresyonunun ayarlanması tam olarak aydınlatılmış değildir. Özellikle, türe göre frekansı değişen kodonların mRNA yapısına ve protein katlanmasına etkisi üretilen proteinin fonksiyonu için çok önemlidir. Son yapılan çalışmalara göre hücrede az bulunan kodonların gen üzerindeki yerlerine göre mRNA yapısını koruduğu sonucuna varılmıştır (62). Stabil mRNA miktarı protein ekspresyonu ile doğru orantılı seyreder (63). Optimizasyon yapılırken frekansı yüksek olduğu için sürekli aynı kodonu seçmek yanlıştır. Proteinin doğal üretildiği formunda, bir aminoasit gen üzerinde frekansı düşük olmasına rağmen az olan kodon ile ifade edilebilmektedir.

Bu yüzden nadir olan kodonların lokasyonları, gen üzerinde belirlenir ve optimizasyon esnasında o kısımlara dokunulmaz (64).

Bir genin yaklaşık 6 aminoasitlik başlangıç kısmına genin başı denir (48). mRNA yapısının stabilitesi için ilk 16 kodon önemlidir ve tasarım esnasında korunması gereken bir bölgedir. Bu yüzden, bu kısımdaki kodonları olduğu gibi bırakmaya dikkat edilmelidir. Bu durum hem ökaryotlar hem de prokaryotlar için geçerli olan bir durumdur (65). Protein ekspresyonu, mRNA stabilitesi ile doğru orantılı olduğu için sadece ilk 6 aminoasit için optimizasyon yapılıp geri kalan gene dokunulmaması gibi hipotezler de mevcuttur (66).

Protein katlanması ve translasyon hızı arasındaki ilişki çalışmalarda şu şekilde ortaya konmuştur. Biyoinformatik analizlerin yardımı ile genlerin 5' ve 3' uçlarında frekansı düşük olan kodonlara daha çok rastlandığı gösterilmiştir (67). Bu durum translasyonda uzama esansında ribozomu yavaşlatmakta ve proteinin katlanması için zaman kazandırmaktadır (68). Bu yüzden, optimizasyon esnasında translasyonu fazla hızlandırmak proteinde yanlış katlanmalara sebebiyet verebilmektedir. Optimizasyon sırasında, gen başlangıç ve bitiş noktalarının korunması, genin fonksiyonu için büyük önem arz etmektedir (68).

2.2.4. Sentetik Gen ve Ekspresyon Vektörü İlişkisi

Hedef proteinin konak hücre içinde üretilebilmesi için, gen bir ekspresyon vektörüne klonlanarak transforme ya da transfekte edilir. Hedef gen proteine çevrildiğinde, ekspresyon vektöründende parçalar taşır (69). Bu yüzden, yapılacak çalışmadaki proteine uygun konak hücre ve ekspresyon vektörü seçilmektedir.

Hedef gen, vektör üzerinde çoklu klonlama bölgesi (multiple clonning site) olarak adlandırılan bölgeye klonlanır. Bu bölge, çok sayıda restriksiyon enzim tanıma bölgesi içeren bir DNA dizisinden oluşur (70). Bu sayede, farklı enzim kombinasyonları kullanılarak bu bölgeye gen klonlanması yapılabilir

Transkripsiyonun başlaması için 3 DNA dizisi vardır; promotor, terminatör ve regülatör sekanslar. (44) Promotor: bir parametreye bağımlı (IPTG, tetrasiklin, N..vb) ya da sürekli çalışan çeşitleri olduğu gibi hızlı ve yavaş çalışanları da

mevcuttur. Yüksek miktarda üretilmek istenen bir protein, güçlü bir promotor kontrolünde tutulur. Bu aynı zamanda sürekli çalışan bir promotor ise konak hücre için yük oluşturur (46). Bu yüzden genellikle, hedef proteinin üretilmesi istenen şartlara bağlı olarak, promotor belirlenir. (44) Terminatör: transkripsiyonun bitirilmesi için gerekli DNA dizisidir. Translasyon stop kodon ile bitirilir. (44) Regülatör dizi: bir gen sürekli olarak ya da regüle olarak eksprese edilir. 2 farklı regülatör dizi mevcuttur; transkripsiyonal aktivatör ve represör diziler. Represör dizi, promotor dizisinin içinde ya da hemen sonrasında bulunur. Represör ortamda olduğunda bu operatör bölgeye bağlanarak RNA polimerazın promotöre bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonu durdurur (71). Transkripsiyon aktivatör dizileri, genellikle DNA'ya bağlanabilen proteinlere spesifik bölgelerdir. Transkripsiyon faktörü bu bölgeye bağlanır ve RNA polimeraz ile olan protein protein etkileşimi ile transkripsiyon hızlanır (46).

Translasyon ile ilişkili diziler; ribozom bağlanma bölgesi (RBS), start kodon ve RBS start kodon arasında ki 4- 8 nükleotid uzunluğundaki boşluktan oluşur (72). RBS, ökaryot canlılar için Kozak, prokaryot canlılar için Shine-Dalgarno dizisi olarak bilinir ve ribozomda translasyonun başlamasını sağlayan dizidir (73). RBS, start kodondan önce bulunur. Direkt olarak kendisi translayonu başlatamaz ancak yardımcı dizidir (45). Ek olarak, rekombinant genin mRNA'ları hücre içinde birikmeye eğilimlidir, bu durum mRNA stabilitesinin sağlanması ve ribozoma bağlanması ile çözülebilir. Bu yüzden, RBS ve RBS- start kodon arasındaki mesafe ekspresyon için önemlidir. Hedef genin son kısmına yerleştirilen polyA sinyali de RNA polimeraz II kompleksi ile pre-mRNA'nın sentezini sağlar ve ökaryot hücrede mRNA stabilitesi ve translasyonu arttırır (74).

Hedef protein vektör üzerinde C ucu ya da N ucundan bir füzyon proteini ile birlikte heterolog olarak üretilirek modifiye edilir (75). Histidine 6 his rezidüsünden oluşan bir proteindir. Bu rezidü, hedef protein ile birleştirilerek western analizi esnasında Anti-histidin antikoru ile proteini seçilebilir hale getirir. Aynı protein, Nikel iyonları ile birleşebildiği için nikel kaplı kolonlar kullanılarak kromotografik olarak total proteinden pürifiye edilir (46).

Tasarımlarda kullanılan vektör uzunluğu da vektörün kendi stabilitesi ve klonlama kalitesi için önemli bir faktördür (24). Ekspresyon vektörünün uzunluğu

genellikle klonlamada seçilimin yapılabilmesi için ampisilin, neomisin, fosofoteraz gibi antibiyotik direnci sağlayan dizilerden ya da floresan protein gibi reportör genlerden kaynaklanır. Büyük plazmitler konak hücrede metabolik yük oluşturacağı için hedef protein ekspresyon miktarını azaltır (76).

2.3. Rekombinant Protein Tasarımında Biyoninformatik Kullanımı

2.3.1. Giriş

Protein yapı tahmini için kullanılan programlar ve online sunucular, araştırmacılar tarafından hücresel ve moleküler çalışmalarda rutin olarak kullanılmaktadır. Deneysel olarak yapı ve fonksiyon karakterizasyonu belirlenmemiş olan proteinler, hesaplamalı modelleme (computational modeling) yöntemi kullanılarak analiz edilebilmektedir (77).

Dünya çapında protein yapı tahmini modellemelerinde (CASP: Critical Assessment of Protein Structure Prediction) kullanılan sunucular I-TASSER, Rosetta ve HHpred'dir (78). I-TASSER sunucusu aminoasit dizisi kullanılarak proteinin 3 boyutlu yapısının modellendiği ve öngörülen yapısına göre biyolojik fonksiyonunun belirlendiği en geniş çaplı online sunucudur. 2008 yılından itibaren 130 ülkeden 75 500 kullanıcı tarafından 320 000' den fazla protein modellemesi I-TASSER sunucusu kullanılarak yapılmıştır (79).

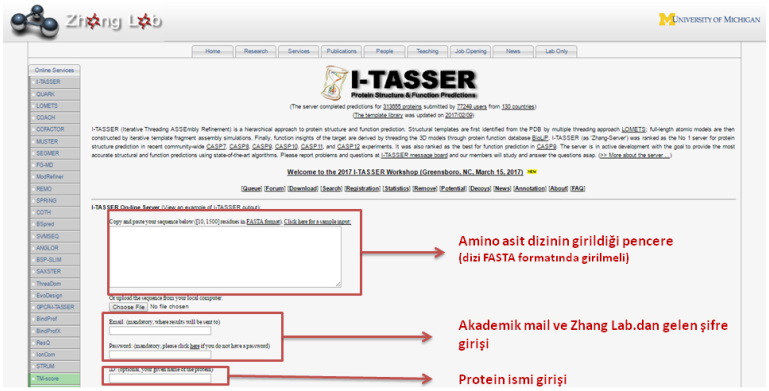
Bu sunucular, in vitro ve in vivo deneylere geçilmeden önce araştırmacıya çalışılacak protein ile ilgili ön bilgi kazandırmayı amaçlamaktadır. Sunucudan elde edilebilecek tahmini bilgiler; proteinin ikincil yapısı, 3 boyutlu yapısı, PDB (Protein DataBase) veritabanına kayıtlı proteinlerle olan benzerliği, bu benzerlik baz alınarak korunan bölgeleri (conserved region)'ne göre fonksiyon tayini, herhangi bir enzimle etkileşiminin skorlanmasıdır (80). Elde edilen tahmini bilgilerle, in vitro/vivo deney sonuçları kıyaslanarak proteinin çalışma şekli ve yapısı öngörülebilmektedir (81). Biyoinformatik sonuçlar, matematiksel modelleme sonuçları ve deney sonuçları birbiri ile örtüştüğünde çalışılan protein hakkında büyük ölçekte bilgi edinilebilir. Bir sisteme farklı açılardan yaklaşmak, sistem üzerinde çalışırken hangi parametreleri

değiştirilirse nasıl sonuçlar alınacağı hakkında da bilgi vermektedir (80). Bu sayede, sistemi anlamak ve üzerinde çalışmak kolaylaşmaktadır.

Sadece tek bir protein üzerinde yapılan çalışmalarda bile bir proteinin birden fazla bölgeye (domain) sahip olması, farklı reseptörlere bağlanabilmesi, bulunduğu biyolojik ortamdaki pH, sıcaklık...vb. değişimlerden dolayı 3 boyutlu yapısının değişmesi, değişen yapısından dolayı enzimlerle etkileşiminin değişmesi gibi parametreler çalışmanın çıktısını değiştirmektedir (81). Bu yüzden, araştırmacılar gen ve protein tasarımı çalışmalarında biyoinformatik sunuculardan yardım almaktadır.

2.3.2. I-TASSER Sunucusunun Kullanılması

Sunucunun kullanılabilmesi için ilk olarak sunucuya kayıt olmak gerekmektedir (78). Sisteme her seferinde bir protein sekansının modelleme girişi yapılabilmektedir. Protein dizisinin uzunluğuna göre sunucunun hesaplama ve sonucu yollama süresi değişmektedir. 10-1500 amino asit rezidüsü uzunluğundaki proteinler sisteme hesaplatılabilmektedir (80) (Şekil 2.3).

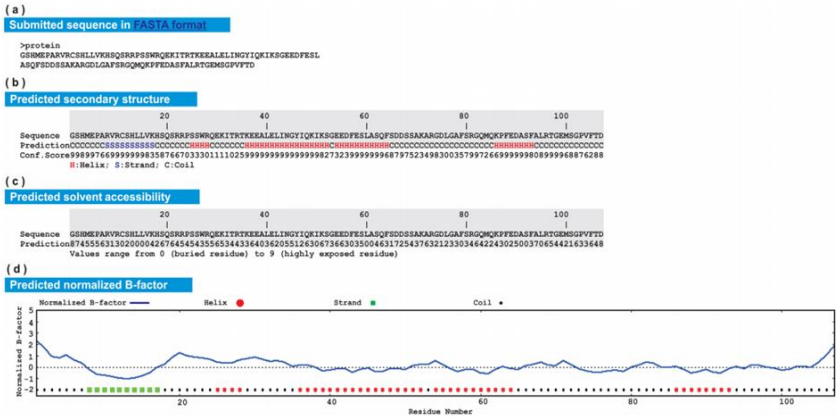


Şekil 2.3. I- TASSER sunucusunun giriş sayfası (78).

Sunucuya yollanan protein yapı modellemesi tamamlandığında sonuç linki yollanır. Sunucudan alınan bir protein modellemesi sonucunun içeriği Şekil (2.4-2.7)' deki gibidir.

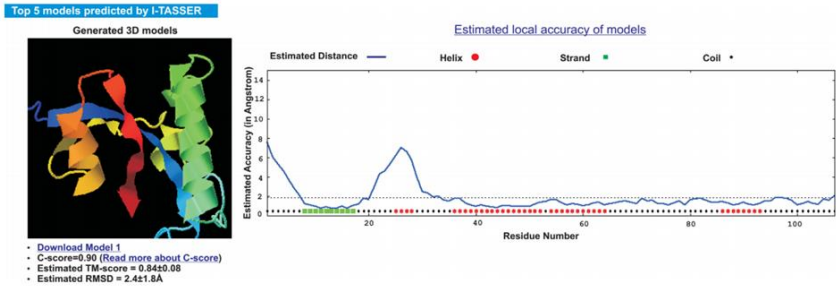
Sunucuda dizi ile birlikte proteinin ikincil yapısı, her bir rezidüsünün yapının içindeki lokasyonuna göre çözücüye maruz kalma değeri, her rezidü için esneklik

veya stabilite değeri bulunur (78). Sunucudaki hesaplamalar Monte Carlo simülasyonuna göre yapılmaktadır (77, 81) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 I TASSER analiz sonuçları. a) FASTA formatındaki amino asit dizisi; b) proteinin tahmini ikincil yapısı; c) her bir amino asit rezidüsünün 3 boyutlu yapı içerisindeki çözücüye maruziyet skoru; d) Normalize B Faktör değeri (B Faktör değeri, pozitif B-faktör değeri rezidülerin sarmal (loop) ya da kuyruk (tail) kısımlarında bulunduğunu yani esnek bölgelerde olduğunu, negatif B-faktör değeri stabil rezidülere işaret eder (80).

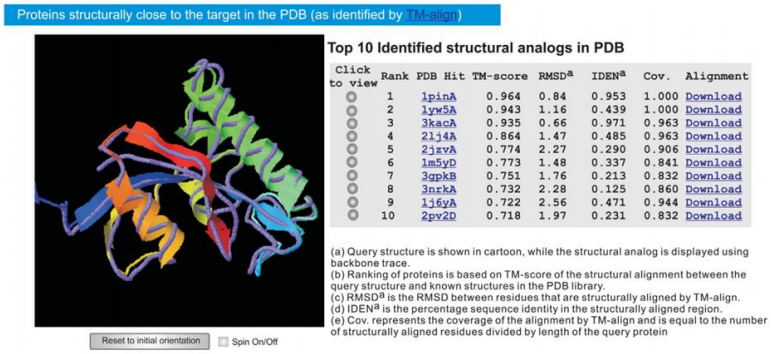
I-TASSER, yollanan her bir dizi için beş ayrı model hesaplar ve sonuçların içinde her biri belirtilir. Modelin C değerine bakarak modelin güvenirliliği belirlenir. C değeri [-5,2] arasında değişir, değer yükseldikçe güvenirliliği artar. Sunucu, 5 modeli kendi arasında sadece C değerine göre değil TM değeri ve RMSD gibi değerleri de kullanarak sıralar (81) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. I TASSER analiz sonuçları. Sol panel, proteinin 3 boyutlu yapı tahminini göstermektedir. Gösterilen sonucun doğruluk skoru C değerine göre belirlenir. Değer [-5,2] arasında değişir, değerin yüksekliği modelin güvenirliliğini gösterir. Sağ panel 3 boyutlu yapının belirlenmesi için her bir rezidü arası mesafeyi ve rezidü şeklini gösterir (80).

I-TASSER sunucusu, dizinin yapı modellemesini tamamladıktan sonra protein veritabanı kütüphanesindeki (PDB Library) tüm proteinlerle, tahmini modelin kıyaslamasını yapar. Yapısal olarak en benzer 10 proteinin sıralaması verilir.

Genellikle, benzer yapıya sahip proteinler benzer biyolojik fonksiyonlara da sahiptir (80). Bu dataları kullanarak fonksiyonalite çıkarımı yapmak kolaylaşmaktadır (82). Şekil 2.6'da verilen TM değerleri (0,1] arasında değişebilir. Değerin 1 olması kıyaslanan iki protein arasında ki benzerliğin %100 olduğuna işaret eder. Eğer değer 0,17 altında ise iki protein arasında rastgele benzerlik vardır ve fonksiyon çıkarımı yapmak sağlıklı değildir (81).

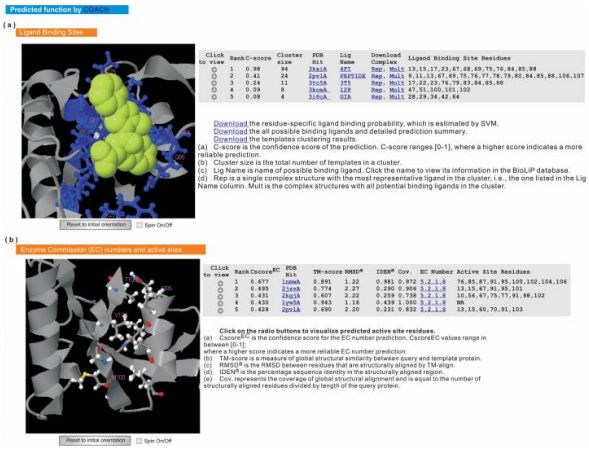


Click to view	Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD[a]	IDEN[a]	Cov.	Alignment
	1	1pinA	0.964	0.84	0.953	1.000	Download
	2	1yw5A	0.943	1.16	0.439	1.000	Download
	3	3kacA	0.935	0.66	0.971	0.963	Download
	4	2ljj4A	0.864	1.47	0.485	0.963	Download
	5	2jzvA	0.774	2.27	0.290	0.906	Download
	6	1m5yD	0.773	1.48	0.337	0.841	Download
	7	3gpkB	0.751	1.76	0.213	0.832	Download
	8	3nrkA	0.732	2.28	0.125	0.860	Download
	9	1j6yA	0.722	2.56	0.471	0.944	Download
	10	2pv2D	0.718	1.97	0.231	0.832	Download

(a) Query structure is shown in cartoon, while the structural analog is displayed using backbone trace.
(b) Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library.
(c) RMSD[a] is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.
(d) IDEN[a] is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.
(e) Cov. represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein

Şekil 2.6. I TASSER analiz sonuçları. Sunucuya gönderilen dizinin protein veritabanındaki yapısal olarak benzer 10 proteinle kıyaslanması (80).

Çalışılan protein bir enzim ise bu enzimin aktif bölgeleri ve bağlanabileceği ligantlar I-TASSER tarafından simüle edilerek listelenir (81) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. I TASSER analiz sonuçları. a) Muhtemel ligant bağlanma bölgeleri. b) Muhtemel aktif bölge rezidüleri (80).

2.4. HIF-α – Prolil Hidroksilaz ve Von Hippel Lindau Protein İlişkisi

İnsanlarda hipoksik duruma karşı oluşturulan kronik yanıt heterodimerik hipoksi indükleme faktörü (HIF1α) tarafından kontrol edilir (9). HIF transkripsiyon faktörünün hedeflediği genler, eritropoetin (EPO), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi hipoksiye metabolik ve fizyolojik adaptasyonu sağlayan proteinlerdir (83).

Oksijen bağımlı post translasyonel modifikasyonlar aracılığı ile düzenlenen protein-protein ve protein-nükleik asit etkileşimleri HIF sisteminin hipoksi regülasyonunun merkezini oluşturur (83). Bu sebeple HIF- prolil hidroksilaz etkileşimi (PHD) ve HIF–von Hippel Lindau tümör baskılayıcı proteini (pVHL) etkileşimi regülasyon şeklinin tanımlanması için daha önce üzerinde durulmuş çalışmaların temelini oluşturur (84, 85).

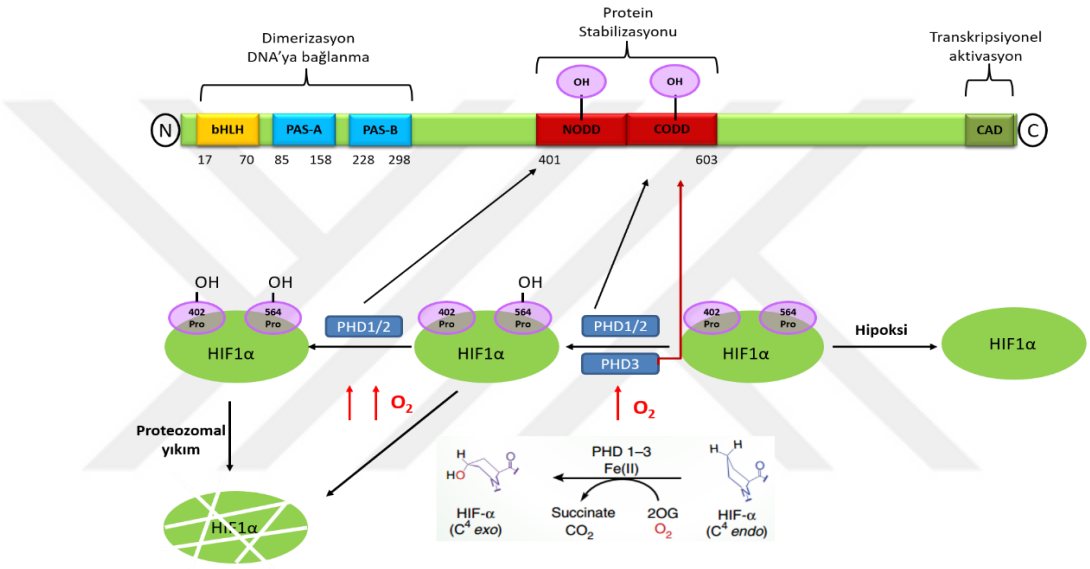
2.4.1. HIF Transkripsiyon Faktörü

HIF transkripsiyon faktörü oksijen bağımlı α alt birimi ve tamamlayıcı β alt biriminden oluşur (86). İnsanda bilinen 3 farklı HIF-α izoformu vardır. HIF-1α ve HIF-2α karakterize edilmiş olan izoformlardır. HIF-α HIF-β (ARNT) ile birleşerek aktif transkripsiyon formunu alır. HIF-1α ve HIF-2α yakın ilişkilidir ancak hipoksi durumunda upregülasyon seviyeleri birbirinden ayrılır (87). HIFα ve βalt birimleri bHLH/PAS transkripsiyon faktörü ailesindendir (86). bHLH ve PAS bölgeleri α-β alt birimlerinin dimerize olup DNA'ya bağlanmasını kontrol eder. N ve C terminal transkripsiyonel aktivasyon bölgeleri aktivatör proteinlerin DNA üzerinde aktif kompleks oluşturmasını sağlar (88). Ayrıca, HIFα alt birimleri değişken oksijen seviyelerinde hidroksillenmenin olduğu oksijen bağımlı yıkım bölgesini içerir (12).

2.4.2. HIF-α'nın Hidroksilasyon ile Kontrolü

HIF proteini normokside proteozomal yıkıma gittiği için yarı ömrü çok kısadır (12). Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı proteini (pVHL) ve E3 übikütin ligaz kompleksi HIF-α'nın lizin rezidülerinin übikütin ile işaretleyerek yıkıma gitmesini sağlar. Oksijen bağımlı yıkım (ODD) bölgesi üzerinde bulunan 402. ve

564. prolin rezidülerinin hidroksillenmesi ile konformasyon değiştiren HIF1-α, pVHL ile olan etkileşimini arttırır (84) (Şekil 2.8). Bunun sebebi prolil hidroksilaz enziminin β2/β3 ilmeğine denk gelen (Val 241, Ser 242, Lys 244, Ile 251) rezidülerinin, HIF proteininin korunmuş LXXLAP motifi ile etkileşerek prolinleri hidroksillemesindendir (89). Hidroksillenen 564. prolin VHL'nin histidin (115) ve serin (111) rezidüleri ile hidrojen bağı kurabilir. Bu da prolin halkasının konformasyonunun değişip (C^4 endo ››› C^4 exo) proteozomal yıkıma gitmesine neden olur (84).



Şekil 2.8. HIF protein sisteminin regülasyonu (9). Şekil Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.

2.4.3. Oksijen Bağımlı Yıkım Bölgesi ile pVHL ve PHD Etkileşimleri

Nükleer manyetik rezonans (NMR) ve diğer biyofizik çalışmaları gösteriyor ki, pVHL'nin ODD bölgesine bağlanmasında hidroksillenme aşamasının önemi büyüktür. PHD'nin β2/β3 yapısı arasındaki hareketli sarmal bölge ODD üzerindeki LXXLAP motifi ile etkileşip hidroksillenmeyi gerçekleştirir (90). Hidroksiprolin haline gelen 402 ve 564. prolin rezidüleri HIF konformasyonunu değiştirir. Bu sayede pVHL- HIF etkileşimi artar (89).

Mutasyon analizlerine göre ODD üzerindeki Leu 574, Pro 402,564 ve PHD üzerindeki hareketli sarmal bölgesindeki mutasyonlar HIF-PHD etkileşiminde

önemli pozisyonlardır (91). Antikor temelli çalışmalarda, HIF-α'nın kanser hücrelerinde yüksek miktarda eksprese olduğu ve hidroksillenmiş HIF-α'nın hücre sitoplazmasında biriktiği gözlenmiştir. Bu durumun mutant pVHL'den kaynaklanabildiği gibi, PHD ve HIF-α'daki mutasyonlardan da kaynaklanabileceği üzerinde durulmuştur (92).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Giriş

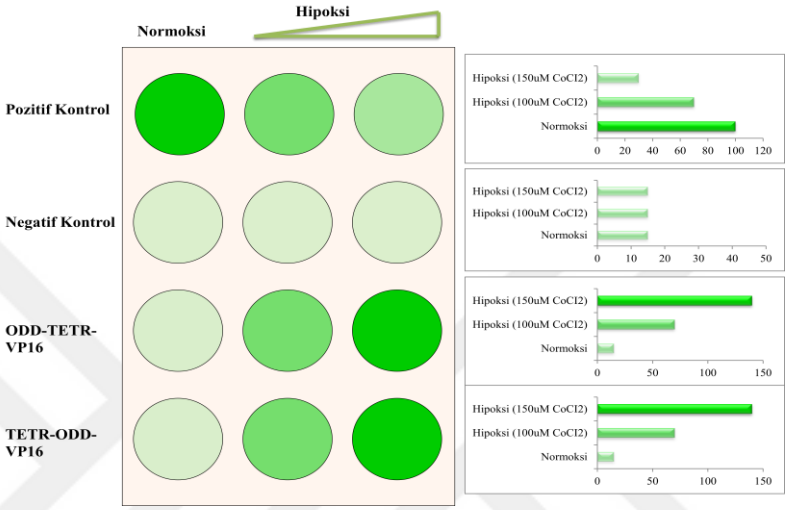
Bu çalışmada ispatlanmaya çalışılan hipotez, O_2 seviyesi değişikliğine cevap veren bir gen sistemi tasarlamaktı. Sistemde, sürekli çalışan güçlü bir promotordan (CMV promoter) ODD bölgesi eklenmiş hibrit bir transkripsiyon faktörü üretildi. ODD bölgesi ile birleştirilen protein, tetrasiklin bağlanma bölgesi (TETR) ve transaktivatör bölgesini (VP16) içerir şekilde seçildi. Çalışmada tasarlanan bu transkripsiyon faktörü, literatürdekilerden farklı olarak ilk defa denendi. Bu protein, O_2 varlığında proteozomal yıkıma gidip, sadece hipoksi durumunda stabil kalarak gen sistemi içindeki ikinci genin transkripsiyonunu aktive edip, hedef terapötik proteinin üretilmesini sağladı.

Çalışmada, önce gen sisteminin biyoinformatik ve matematiksel olarak nasıl çalışacağı modellendi. Sonrasında, yapılan moleküler deneyler ile gen sisteminin hipotezde kurgulanan deney şartlarındaki davranışı belirlendi. Bunun için gen sisteminin başarılı olarak klonlaması tamamlanıp, doğruluğu teyit edildikten sonra hipoksik ortamda hücre içindeki hedef protein üretimi takip edildi. Hücre hattı olarak transfeksiyon verimi yüksek olan bir hücre hattı (HEK 293T) seçildi. Genler hücreye aktarıldıktan sonra hipoksik ortam karakterizasyonu yapıldı. Hücre hattına göre uygun hipoksi şartları değişken olduğu için bu aşamada optimizasyon sağlandı. Gen sisteminin hipoksideki karakterizasyonunun yapılabilmesi için hedef protein olarak yeşil floresan protein (ZsGreen) yerleştirildi. Bu sayede, florometrik ölçümlerle alınan cevap ölçülebildi. Yapılan deneylerle, sistemin hem protein düzeyinde (western blotlama) hem de hücresel ve fonksiyonel düzeyde (İmmünfloresan test-florometrik ölçümler) hipoksi cevabı belirlendi (Şekil 3.1).

Hipotezde iddia edilen gen sistemini tasarlayabilmek için SnapGene moleküler biyoloji yazılımı, transkripsiyon faktörünün üç boyutlu protein yapı tahmini yapılabilmesi için I-TASSER ve NetSurfP online sunucuları kullanıldı. Bu sayede, tasarlanan transkripsiyon faktörünün hidroksillenecek bölgesinin aktivite değeri öngörüldü. Tasarlanan proteinin hücre içinde katılacağı biyokimyasal

kaskatlar (proteozomal yıkım sırasında) sonucu ne kadarının hücre içinde stabil kalacağının tahmini sonucu, matematiksel olarak MATLAB yazılımı ile hesaplandı.

Kısaca özetlenecek olursa, tez çalışmasında biyoinformatik sunucular, matematiksel hesaplamalar ve moleküler deneyler yardımı ile tasarlanan hipoksi duyarlı transkripsiyon faktörünün karakterizasyonu tamamlandı.



Şekil 3.1. Tasarlanan hipoksik sistemden alınması beklenen florometrik ölçüm sonucu.

3.1.1. Yöntem Taslağı

Çalışmada takip edilen deney sıralaması taslaktaki gibidir.

1. Genlerin Tasarlanması- Kodon Optimizasyonu:
    1.1. TET-ODD Gen Sistemi
        1.1.1 N ucu: ODD-TETR-VP16
        1.1.2 Orta: TETR-ODD-VP16
    1.2. pTRE-ZsGreen vektörü (Reportör analiz için)
    1.3. pTRE-tPA vektörü (Hedef terapötik protein)
2. Biyoninformatik- Üç Boyutlu Protein Yapı Modellemesi (I -TASSER)
3. Enzim Kinetiği Hesaplaması (MATLAB)
4. Kompetent Hücre Hazırlanması
5. Genleri Klonlanması

6. Protein İzolasyonu- Bradford Analizi- Western Blot Analizi

7. Tet-ODD Plazmid Sisteminin Karakterizasyonu

7.1 Hücre Kültürü- Transfeksiyon Optimizasyonu

7.1.1 Kobalt Klorür Doz Cevap Kontrol Deneyi

7.1.2 Zaman Bağımlı Protein Üretimi Takibi Deneyi

7.2 Hipoksi İndüksiyonu Sonrası Üretilen Protein Analizi

7.2.1 Reportör Protein Ölçümleri

7.2.2 İmmünfloresan Antikor Testi (IF)

7.2.3 Protein Lokalizasyon Analizi

7.2.4 Protein İzolasyonu ve Western Blot (WB)

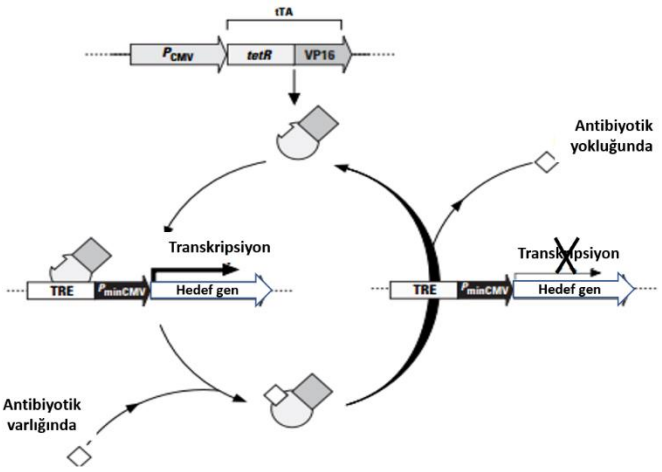
Her bir deney için kullanılan kimyasal, kit ve cihazların isim, kod ve markaları Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te belirtildi. Çalışmada kullanılan primerler ve hücre hattı ile ilgili bilgiler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de bulunmaktadır.

3.2. Materyal

3.2.1. Kullanılan pTet-Off Sistemi ve pSIREN-ZsGreen Vektörü

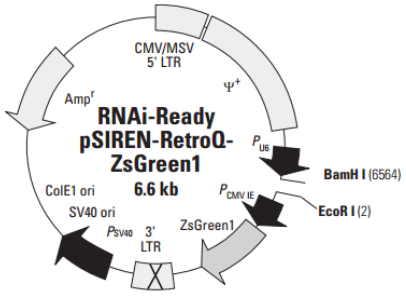
Tez çalışmasında kullanılacak pTet off (ClonTech, U.S.A., Kat. No: 631017) ve pSIREN-ZsGreen (ClonTech, U.S.A., Kat. No: 632455) vektörleri ClonTech firmasından satın alındı. Vektörler, 20 mikrogram miktarında geldi. İhtiyaç doğrultusunda tekrar kompetent bakteri kullanılarak çoğaltılıp, izole edilerek kullanıldı.

pTet-Off vektörü, CMV promotör taşıyan ve tetrasiklin duyarlı transkripsiyon aktivatörü (tTA) üreten bir plazmitle birlikte, CMV_{min} promotor ve promotor yukarısında TetR'ın bağlandığı bir operon (tetO) içeren ikinci bir plazmit içerir (93) (Şekil 3.2). tTA yokluğunda ikinci plazmitten üretilen X hedef geni üretimi çok düşüktür, bu sistemin kaçağı olmadığını gösterir. Sistemde, tetrasiklin ve tetrasiklinin türevi olan doksisiklin varlığında antibiyotik tTA'ya bağlanır ve transkripsiyon baskılanır (93) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tet Off vektör sisteminde gen regülasyonu (93).

pSIREN-RetroQ-ZsGreen vektörü (ClonTech, U.S.A., Kat. No. 632455) (Şekil 3.3) daha önce satın alınmış, enstitünün Tıbbi Genetik A.D. laboratuvarında halihazırda kullanılan bir vektördü. Tez çalışmasında, pTRE-ZsGreen vektörünü oluşturabilmek için pSIREN- RetroQ-ZsGreen vektörü kalıp DNA olarak kullanılıp üzerindeki ZsGreen uygun primerler (Tablo 3.1) kullanılarak PZR ile çoğaltıldı.



Şekil 3.3. pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 Retroviral vektörünün haritası (94).

3.2.2. Satın Alınan ODD ve Doku Plazminojen Aktivatörü Genleri

tTA ile birleştirilerek tasarlanmak istenen ODD-tTA transkripsiyon faktörü için ODD geni (GeneScript, China, Sipariş no: 484691-5) ve terapötik gen olarak seçilen doku plazminojen aktivatörü (GeneScript, China, Sipariş no: 484691-6) genleri GeneScript şirketinden satın alınmıştır. Genler taşıyıcı vektör olarak bilinen

üzerinde ampisilin direnç geni, çoklu restriksiyon klonlama bölgesi içeren pUC57 vektörü içerisine klonlanmış olarak satın alındı (EK 1).

3.2.3. Tez Çalışmasında Tasarlanan Primerler

pTet-Off , pTRE, pSIREN-RetroQ-ZsGreen vektörlerine uygun tasarlanan primerler birbirleri ile kombine edilerek uygun deneylerde kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Kullanılan primer isimleri ve diziler.

Primer İsmi	**Primer Dizisi**
CMV ileri	5' GTAGGCGTGTACGGTGGGAG 3'
TetR geri	5' TTCCGACCTCATTAAGCAGC 3'
Sal-G-ODD ileri	5'GGCGGTCGACGTCAGAAGATACAAGTAGCC3'
Sal-AG-ODD geri	5' GGCGGTCGACTCTTCCATACGGTCTTTTGTCAC 3'
TetR ileri	5' AAAGTGGGTCCGCGTACA 3'
VP16 geri	5' CGTCTAAGTGGAGCTCGTCC 3'
SV40 PolyA geri	5' CACTGCATTCTAGTTGTGGT 3'
EcoRI-ZsGreen ileri	5' GGCGGAATTCATGGCCCAGTCCAAGCAC 3'
BamHI-ZsGreen geri	5' GGCGGGATCCTTAGGGCAAGGCGGAGCC 3'

3.2.4. Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri

293T hücre hattı HEK-293 hücre hattının transfeksiyon deneylerinde yüksek protein ekspresyonu alabilmek için modifiye edilmiş haldedir. Bu işlem, Stanford Üniversitesi, Michele Calo lab.'ında HEK-293 hücresine sıcaklık bağımlı mutant SV40 T antijeni kodlyan bir plazmitin transfekte edilmesi ile oluşturulmuştur. Bu şekilde stabil transfeksiyon ile elde edilen HEK293T hücre hattı, SV40 replikasyon orijini taşıyan bir vektör transfeksiyonu için yüksek gen ekspresyonu ve protein üretimi için konak hale getirilmiştir (44, 95). Özelliklerinden dolayı, tez çalışması için seçilen bu hücre hattının özellikleri Tablo 3.2'de belirtildiği gibidir.

Tez çalışmasında, HEK293T hücre hattı kimyasal ajanlar ile yüksek transfeksiyon verimi görüldüğü ve rekombinant protein üretimi yüksek olduğu için seçilmiştir. SV40 modifikasyonundan (yüksek protein üretimi) yararlanabilmek için de vektör olarak SV40 orijini içeren pTet-off vektör sistemi seçilmiştir.

Tablo 3.2. HEK-293T hücre hattının özellikleri (44).

Hücre Hattı	Organizma	Doku	Yaş	Morfoloji	Medyum Çeşidi	Biyogüvenlik Seviyesi
HEK-2937 (ATCC® CR L3216™) (44)	Homo sapiens	Embriyonik Böbrek	Fetüs	Epitel	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	2

3.2.5. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Tez için yapılan deneylerde kullanılan kimyasallar, marka ve katalog bilgileri Tablo 3.3'deki gibidir.

Tablo 3.3. Deneylerde Kullanılan Gen-Kimyasal-Kit Listesi.

Deneylerde Kullanılan Gen-Kimyasal-Kit Listesi		
Kullanılan Vektörler ve Sipariş Edilen Gen Tasarımları		
Malzeme İsmi:	**Marka:**	**Katalog No:**
pTet Off Vektör Sistemi	Clontech	631017
pSIREN-ZsGreen Vektör Sistemi	Clontech	632455
ODD geni	GeneScript	Sipariş no: 484691-5
Doku Plazminojen Aktivatörü Geni	GeneScript	Sipariş no: 484691-6
Klonlama ve Kontrollerde Kullanılan Enzimler ve Tampon Çözelti		
XbaI	NEB	R0145T
SpeI HF	NEB	R3133S
BamHI HF	NEB	R3136S
SalI HF	NEB	R3138T
EcoRI HF	NEB	R3101S
XhoI	NEB	R0146L
Alkalin Fosfataz (CIP)	NEB	M0290S
Shrimp Alkalin Fosfataz (rSAP)	NEB	M0371S
Antarktik Fosfataz	NEB	M0289S
10X CutSmart Tampon	NEB	B7204S
Jel Elektroforez Malzemeleri		
Agaroz Jel	Invitrogen	16500-100g
Etidyum Bromür	Merck	11608.0030
Tris-asetat-EDTA Tampon	Sigma	T8280
Yükleme Boyası (3X)	Thermo Scientific	R0611
1 kb Ladder	NEB	N3232S
100 bp Ladder	NEB	N3231S

Tablo 3.3. Deneylerde Kullanılan Gen-Kimyasal-Kit Listesi (devam).

Deneylerde Kullanılan Gen-Kimyasal-Kit Listesi		
Western Blot Deneyinde Kullanılan Malzemeler		
RIPA Liziz Tampon	Thermo	89900
Lusiferaz Hücre Liziz Tampon	NEB	B3321S
Protein Stabilizasyon kokteyli	Thermo	89806
Coomassie (96) Protein Analiz Kiti	Thermo	23200
Tris base	Biorad	#1610719
HCI	Sigma	H1758
%10 SDS Solüsyonu	Biorad	#161-0416
% 1.0 Bromofenol mavisi	Biorad	161-0404
Akrilamit (for electrophoresis, ≥99% (HPLC), powder)	SIGMA	A3553
N,N'-Metilenbisakrilamit	SIGMA	M7279
Giliserol (Extra Pure)	Fischer	56-81-5
%10 (w/v) APS	Biorad	# 161-0416
TEMED	Thermo	17919
Ammonyum persulfate (APS)	SIGMA	A3678
2-Merkaptoetanol	SIGMA	M3148
Clarity Western ECL solüsyonu	BioRad	1705060
Polimer Zincir Reaksiyonu Malzemeleri		
Taq Polimeraz ve Tamponlar	ThermoFisher	EP0402
dNTP Seti - 100mM	ThermoFisher	R0181
HyClone Nükleazsız Su	GE Healthcare Life Sciences	SH30538.02
Q5-High-Fidelity 2X Master Mix	NEB	M0492S

3.2.6. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi.

Cihaz İsmi:	**Markası:**
Steril Hücre Kültürü Kabini	Thermo BioSafety Cabinet Class II
Hücre Sayım Cihazı	BioRad Cell Counter
Pipet Tabancası	Thermo scientific
Santrifüj Cihazı	Hettich Rotina 380R -Germany
Nüve Bench Top Santrifüj	Nüve-Turkey
Manyetik karıştırıcı -ısıtıcılı	MTOPS MS300
PCR cihazı	Techne TC-5000-USA
Multiplate Okuyucu	Thermo Varioskan
Benmari- Su Banyosu	Memmert Benmari WNB-14 -Germany
Hassas terazi	Shimadzu AUW220D- Japan
UV Transluminatör	Herolab UV transluminator- Germany
Vorteks	VWR International Vortex- Germany
Buz makinesi	Scotsman AF80- IL, USA
Mikrosantrifüj	VWR Galaxy Ministar- Korea
Western Görüntüleme Cihazı	The ChemiDoc MP system (Bio-Rad)

Tablo 3.4. Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi (devam).

Cihaz İsmi:	Markası:
Nikon inkübatörlü floresan mikroskop	Nikon Eclipse Ti-E- NİS Elements- Japan
Jel Elektroforez Sistemi	Thermo Scientific OWL EASYCASTTM B2-USA-Schimadzu
Elektroforez Güç Kaynağı	Consort EV265 - Belgium
Elektroforez Tankı	Cleaver Scientific MSCHOICE
Ultra Distile Su Cihazı	Thermo Scientific Barnstead Easypure II-USA
Blok Isıtıcı	Techne Dri-Block DB-2D Heatblock- UK
Mikrodalga Fırın	SAMSUNG MV71E- Korea
Manyetik Karıştırıcı	VWR advanced VMS-C7
-20^0 C Dondurucu	Bosch- Germany
Distile su cihazı	Thermo scientific barnstead
Spektrofotometre	Thermo-NanoDrop2000
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter/Allegra X15R
Çalkamalı- Isıtmalı İnkübatör	Thermo/4334
Sekans PCR	ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer
CO_2 inkübatörü- Hücre kültürü	Sanyo CO_2 inkübatörü
Floresan Mikroskop	Leica DM1000
-80^0C Dondurucu	Sanyo
Western Blot Yürütme/ Transfer Cihazı	The Mini Trans-Blot® (Bio-Rad)
Elektroforez Sistemi	Electrophoresis Systems (BioRad)
Katı ve Sıvı Otoklav Cihazları	Nüve Steamart Mini and Midi Format-Turkey

3.3. Yöntem

3.3.1. Yapılan İn Siliko ve İn Vitro Deneysel Çalışmalar

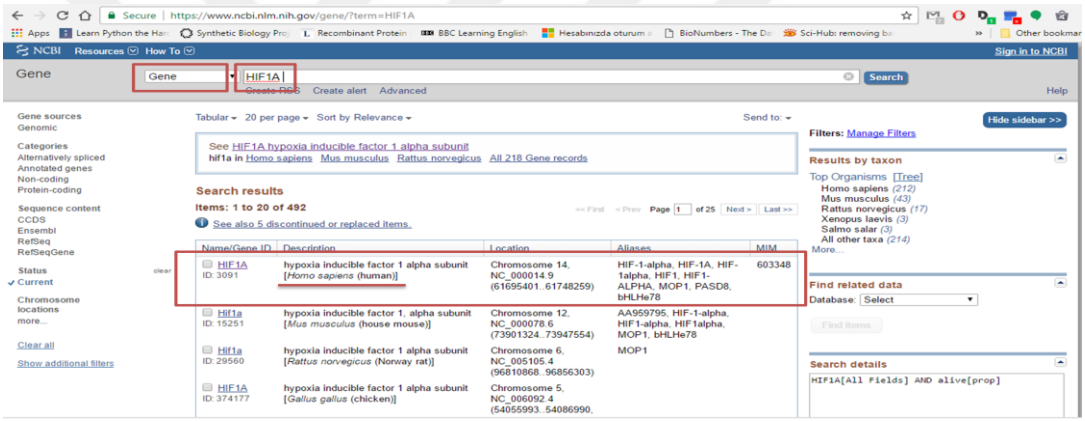
Tez kapsamında yapılması planlanan genlerin tasarlanması, kompetent hücre hazırlama, klonlama deneyleri, western blot, immünfloresan antikor testi, spektrofotometrik ölçümler, karakterizasyon ve protokol optimizasyonu aşamaları başarı ile tamamlandı. Çalışmada kullanılan kimyasallar (Tablo 3.3) ve cihazlar (Tablo 3.4) ayrıntılı belirtildi.

Oksijen bağımlı yıkım (ODD) bölgesi, doku plazminojen aktivatörü, flöresan proteinle (ZsGreen) alakalı genlerin seçimi ve tasarımı “Gen Tasarımı (3.3.1.1)” bölümünde ayrıntılı açıklandı. Proteinlerin hipoksi duyarlılığını öngörebilmek için tamamlanan 3B protein yapı modellemeleri “Üç Boyutlu Protein Yapı Modellemesi (3.2.1.2)” bölümünde ayrıntılı açıklandı.

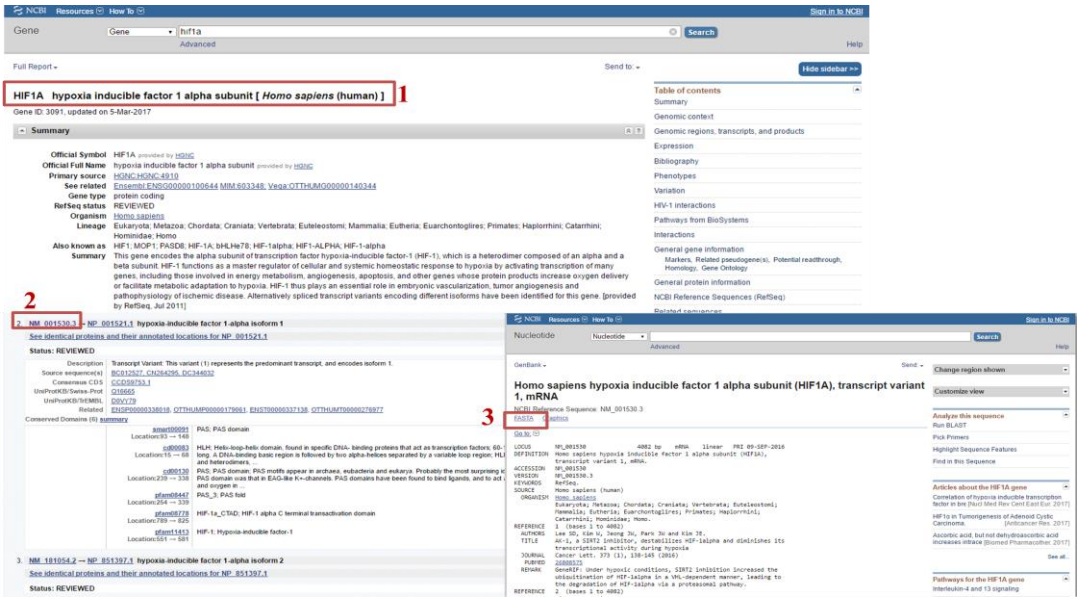
Kompetent hücrelerin hazırlanması, moleküler klonlama deneylerindeki her bir basamak, hücre kültürü ve gen sisteminin iskemik şartlardaki karakterizasyon deneylerinin ayrıntılı protokol basamakları referansları ile birlikte bölüm "(3.3.1.3) – (3.3.1.12)" arasında bulunmaktadır.

3.3.1.1. Gen Tasarımları

Gen tasarımı için hedef genlerin sekansları NCBI veritabanından belirlendi. Bunun için, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) veritabanında gen kısmından HIF1A geni seçilip, homo sapiens gen bilgilerine girildi (136) (Şekil 3.4). Buradan genin mRNA dizisine ulaşıldı (136) (Şekil 3.5). Kullanılan dizi, daha önceki araştırmalarda da kullanılmıştır (13).

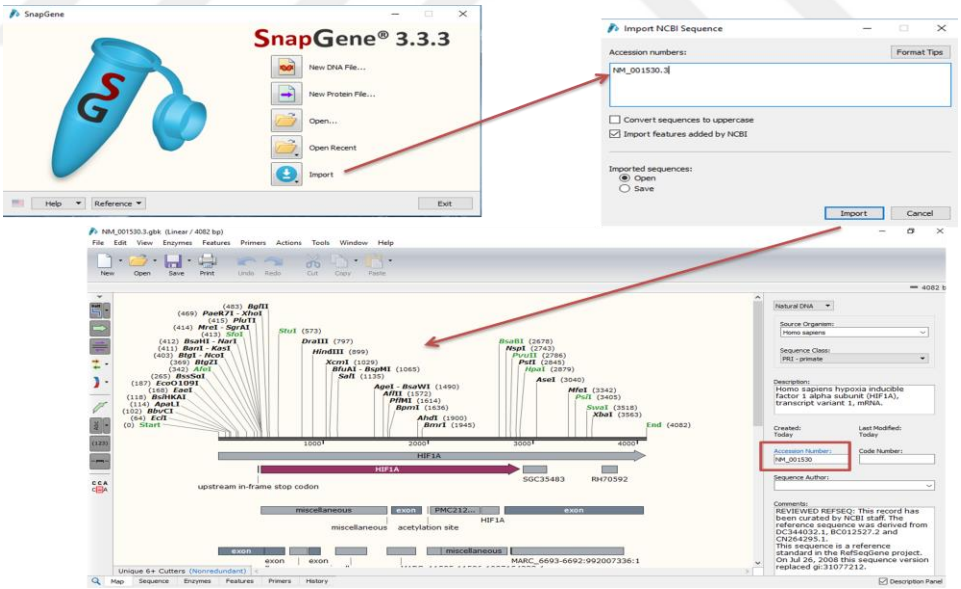


Şekil 3.4. NCBI veritabanındaki HIF1A gen bilgileri (136).



Şekil 3.5. HIF1A geninin mRNA sekansı. HIF1A geninin NM_001530.3 numaralı mRNA sekansının FASTA formatına ulaşılması 1- HIF1A gen bilgileri, 2- mRNA-protein bilgileri, 3- mRNA sekansı (136).

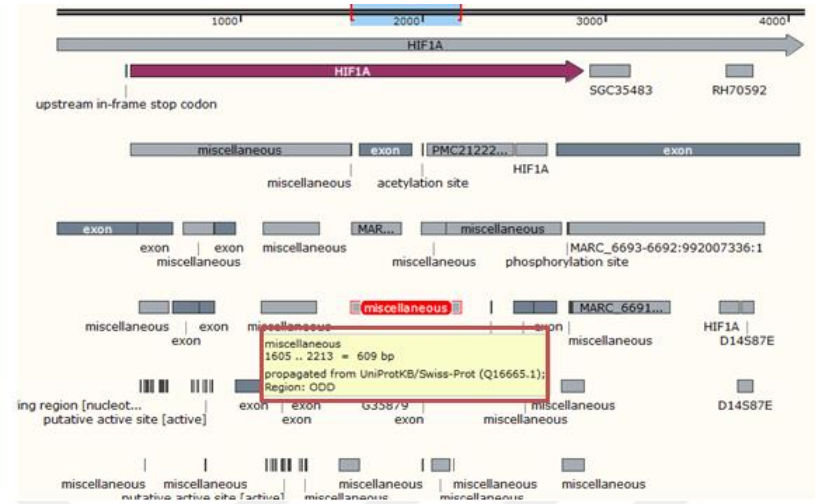
Gen üzerinden, ODD bölgesinin sekansını belirlemek için NCBI'dan belirlenen sekans SnapGene moleküler biyoloji yazılımına yüklendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. SnapGene kullanımı. SnapGene programında HIF1A geninin sekansının indirilmesi (136).

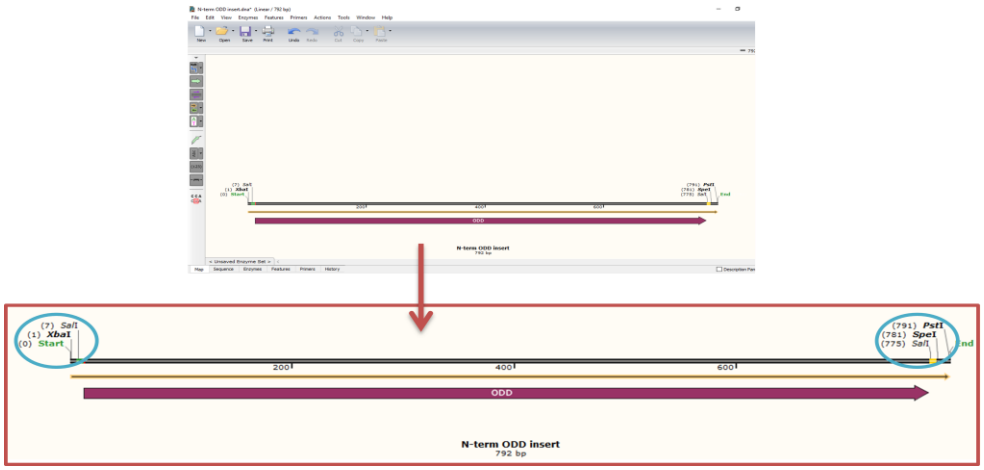
HIF1A üzerinde ODD bölgesi belirlendi ve dizinin sadece bu kısmı çalışmada transkripsiyon faktörü ile birleştirileceği için ayrı bir dosya olarak kaydedildi ve üzerinde sipariş verilmeden gereken modifikasyonlar (restriksiyon kesmi

bölgelerinin sekans üzerinde düzenlenmesi, kozak, start, stop, terminatör sekansların eklenmesi, ORF dizisinin kontrolü) yapıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. ODD sekansının belirlenmesi. HIF1A geni üzerindeki ODD bölgesinin SnapGene programında belirlenmesi (136).

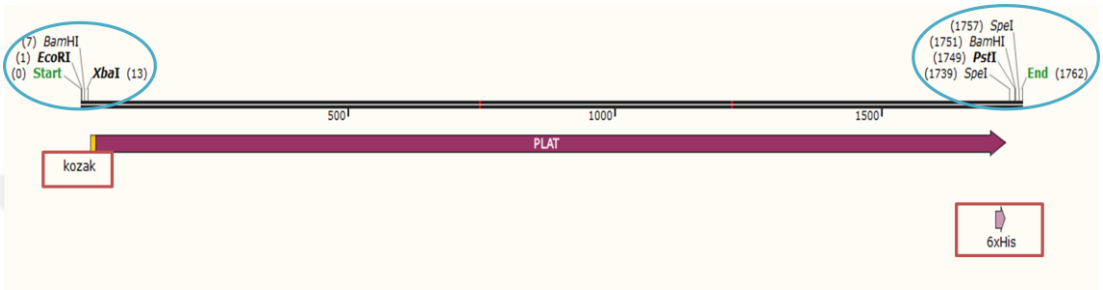
Sipariş verilecek ODD geninin vektöre klonlanabilmesi içine dizinin başına XbaI ve SalI restriksiyon kesim bölgesi son kısmına da SpeI, PstI ve SalI restriksiyon kesim bölgeleri eklendi (Şekil 3.8). Tasarımı tamamlanan ODD geninin GeneScript şirketine siparişi (GeneScript, Çin, Sipariş no: 484691-5) verildi.



Şekil 3.8. ODD bölgesinin klonlama için optimizasyonu. ODD bölgesinin SnapGene programında klonlama için uygun enzim kesim bölgelerinin eklenmesi ve optimizasyonu.

Hedef gen olarak kullanılacak tPA geninin (NM_000930.3) sekansı da NCBI veritabanından indirilip (136), SnapGene programına kaydedildi. Geni, pTRE vektörüne klonlamak için başına EcoRI, XbaI ve sonuna SpeI, PstI, BamHI enzim

kesim bölgeleri eklenerek tasarlandı. Tasarlanan tPA geninin 5’ ucuna translasyonun başlaması için Kozak dizisi (ribozoma bağlanma dizisi) eklendi. Ayrıca, protein üretildikten sonra Western blot analizi yapılabilmesi için 3’ ucuna stop kodondan önce His-tag (6X-His) dizisi eklendi. Genin tasarım aşamaları, ODD geninde anlatıldığı gibi NCBI veritabanı ve SnapGene programı kullanılarak aynı aşamalar izlenerek tamamlanmıştır (Şekil 3.9). Genin siparişi GeneScript firmasına verilmiştir (Sipariş no: 484691-6).



Şekil 3.9. Doku plazminojen aktivatörünün klonlama için optimizasyonu. Doku plazminojen aktivatörü (tPA- PLAT geni) üzerinde SnapGene programında yapılan optimizasyonlar.

Hem ODD hem de tPA geninde klonlama yapılabilmesi için N ve C ucuna eklenen restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri eğer gen üzerinde de varsa bu diziler aminoasiti değiştirmeden uygun başka bir kodon ile değiştirildi. Bunun sebebi, klonlama için enzim kesimi yapıldığında gende istenmeyen kesimlerin önlenmesidir.

3.3.1.2. Üç Boyutlu Protein Yapı Modellemesi (I -TASSER)

Tasarladığımız pTRE vektörü üzerindeki hedef genin üretilebilmesi, ODD ile hibrit hale getirdiğimiz TETR-VP16 proteinin hipoksik şartlarda stabilize kalabilmesine bağlıdır. Bu yüzden, tasarlanan proteinlerin stabiliteleri I-TASSER (78) sunucusu kullanılarak kıyaslandı. Ayrıca literatürde daha önce çalışılmış olan farklı uzunluklardaki ODD bölgeleri Gal4-p65 ve TetR-VP16 ile hibrit hale getirilerek karşılaştırıldı. Bu işlem için yapı modellemesi yapılan aminoasit dizileri Tablo 3.5'de gösterildi.

Tablo 3.5. I-TASSER'de yapı modellemesi yapılan aminoasit dizileri. Sunucudan alınan her bir dizini tüm hesaplama sonuçları EK.2'de sunulmuştur.

Gen İsmi	Tasarlanan genlerin I-TASSER sunucusuna yollanan aminoasit dizileri
HIF1A	MEGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSS HLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLDIEDDMKAQMNCFYLKALDGFVMVL TDDGDMIYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVFDFTHPCDHEEMREMLTHRNGL VKKGKEQNTQRSFFLRMKCTLTSRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTNSN QPQCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHSLDMKFSYCDERITEL MGYEPEELLGRSIYEYYHALDSDHLTKTHHDMFTKGQVTTGQYRMLAKRGG YVWVETQATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESS DMKMTQLFTKVESEDTSSLFDKLKKEPDALTLLAPAAGDTIISLDFGSNDTET DDQQLEEVPLYNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQE VALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSDM VNEFKLELVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQL SPLESSSASPESASPQSTVTVFQQTQIQEPTANATTTTATTDELKTVTKDRMEDI KILIASPSPTHIHKETTSATSSPYRDTQSRTASPNRAGKGVIEQTEKSHPRSPNV LSVALSQRTTVPEEELNPKILALQNAQRKRKMEHDGSLFQAVGIGTLLQQPDD HAATTSLSWKRVKGCKSSEQNGMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLT SYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN
ODD-TETR-VP16	MSRVDSEDTSSLFDKLKKEPDALTLLAPAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLEEV PLYNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPN PESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSDMVNEFKLELV EKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSSASP ESASPQSTVTVFQQTQIQEPTANATTTTATTDELKTVTKDRMEVDTRLDKSKV INSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLD RHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETL ENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDS MPPLLRQAIELFDHQGAEPAFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYSRARTKNNYG STIEGLLDLPDDDAPEEAGLAAPRLSFLPAGHTRRLSTAPPTDVSLGDELHLDG EDVAMAHADALDDFDLDMLGDGDSPGPGFTPHDSAPYGALDMADFEFEQMF TDALGIDEYGG
TETR-ODD-VP16	MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALL DALAIEMLDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTR PTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKE ERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEPAFLFGLELIICGLEKQLKCESGSAYSR ARTKNNYGSTIEGLLDLPDDDAPEEAGLAAPRLSFLPAGHTRRLSTSEDTSSLF DKLKKEPDALTLLAPAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLEEVPLYNDVMLPSPN EKLQNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPNPESLELSFTMPQI QDQTPSPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLFAEDTEAK NPFSTQDTDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSSASPESASPQSTVTV FQLSTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLDMLGDGDSPGPGFTP HDSAPYGALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGG
GAL4-ODD-P65	ANFNQSGNIADSSLSFTFTNSSNGPNLITTQTNSQALSQPIASSNVHDNFMNNEI TASKIDDGNNSKPLSPGWTDQTAYNAFGITTGMFNTTTMDDVYNYLFDDEDT PPNPKKESEDTSSLFDKLKKEPDALTLLAPAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLE EVPLYNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLE PNPESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSDMVNEFKLE LVEKLFAEDTEAKNPFSTQDTDLDLEMLAPYIPMDDDFQLRSFDQLSPLESSSA SPESASPQSTVTVFQQTQIQEPTANATTTTATTDELKTVTKDRMEPSGQISNQA LALAPSSAPVLAQTMVPSSAMVPLAQPPAPAPVLTPGPPQSLSAPVPKSTQAG EGTLSEALLHLQFDADEDLGALLGNSTDPVFTDLASVDNSEFQQLLNQGVSM SHSTAEPMLMEYPEAITRLVTGSQRPPDPAPTPLGTSGLPNGLSGDEDFSSIAD MDFSALLSQISS

3.3.1.3. Kompetent Hücrenin Hazırlaması

Çalışmada kullanılmak üzere BL21, BL21 (DE3) VE DH5α suşları kompetent hale getirildi. Bu işlem için izlenen protokol aşağıdaki gibidir (97).

1- Gliserol stoktan alınan bakteriler daha önce hazırlanan LB (-) (antibiyotik içermeyen agar) petriye ekim yapıldı.

2- 1 gece 37^0C 'de inkübe edildi.

3- İnkübasyondan sonra bakteriler 5 ml'lik antibiyotiksiz sıvı kültüre (LB (-)) aktarıldı.

4- OD_{600} = 0.8 'e gelene kadar 37^0C 'de inkübe edildi.

5- OD_{600} = 0.8'e ulaşınca 5ml'lik kültür 250 ml'ye aktarılıp geniş ölçekli sıvı kültüre geçildi.

6- OD_{600} = 0.4 – 0.5'e gelinceye kadar 23^0C' de inkübe edildi.

7- Uygun OD değerine ulaşılınca erlenmayerdeki sıvı kültür 10 dk buzda bekletildi.

8- Soğuyan sıvı kültür, buzda bekletilen 50 ml'lik falkonlara aktarıldı.

9- Tüpler 4500 rpm'de 5 dk, 4^0C'de santrifüj yapıldı.

10- Süpernatant atılıp peletler buzda kurumaya bırakıldı.

11- Peletler 100ml'lik TB tamponunda pipetaj yapılarak çözülüp, 10 dk buzda bekletildi.

12- Tüpler 4500 rpm'de 5 dk, 4^0C'de santrifüj yapıldı.

13- Süpernatant atılıp peletler buzda kurumaya bırakıldı.

14- Pelet 25 ml'lik TB tamponunda yavaşça pipetajla çözüldü.

15- Tüplere 875 µl DMSO damla damla eklenip karıştırıldı ve tüpler 10 dk buza bekletildi.

16- Tekrar tüplere 875 µl DMSO damla damla eklenip karıştırıldı ve tüpler birkaç dk buza bekletildi.

17- Hücreler 1,5 ml'lik ependorflara 500 µl olacak şekilde paylaştırıldı.

18- Hazırlanan ependorflar sıvı azotta donduruldu ve – 80^0C' de saklandı.

Trasnformasyon Tamponunu Hazırlanması (97)

1- 500 ml'lik cam bir şişeye 475 ml milliQ su eklendi.

2- Üzerine 1.5 g PIPES, 1.1g $CaCI_2.2H_2O$ ve 9.3 g KCI eklenip, çözüldü.

3- Çözeltinin pH 'ı 6.7'ye KOH eklenerek ayarlandı.

4- 5.45 g $MnCI_2$. $4H_2O$ eklendi.

5- Hazırlanan çözelti 500 ml'ye tamamladı, filtrelenip, kompetent hazırlamak için hazır hale getirildi.

Bakteri Besiyerinin Hazırlanması (97)

Besiyerinin hazırlanması için gerekli bileşenler Tablo 3.6'daki gibidir. Nükleazsız suda çözülen bileşenler +4^0C'de muhafaza edildi. Çoğaltılacak vektör üzerindeki antibiyotik direncine göre besiyerine antibiyotik eklendi. pTet off ve pTRE vektörleri ampisilin direnç geni içerdiği için çalışmada antibiyotik seçilimi ampisilin ile yapıldı.

Tablo 3.6. LB (Lysogeny Broth) besiyeri bileşenleri.

LB (Antibiyotik negatif)	Final	Hacim
Bact Tripton	1%	2.5 g
Maya ekstraktı	0.5%	1.25g
NaCI	1%	2.5g
Nükelazsız su	-	250ml

Hazırlanılan kompetent hücrelerin verimliliğini hesaplamak için, antibiyotik eklenerek bakteriyel agar petrileri hazırlandı. İçine farklı konsantrasyonlardaki kontrol vektörü transforme edilip, oluşan koloni sayısı eklenen vektör konsantrasyonuna orantılanarak verim hesaplandı.

Verim Hesaplama (98)

Hazırlanan kompetent hücreler kullanılarak transformasyon yapıldığı takdirde elde edilecek koloni sayısını anlamak için, kompetent hücre verimi hesaplandı.

1- pTRE vektörü (1950 ng/µl) 1 ng/µl' ye sulandırıldı.

2- Amp (+) olan agara 2ng/µl, 20 ng/µl pTRE vektörü transformasyonu yapılan ve transformasyon yapılmayan kompetent hücreler ekildi.

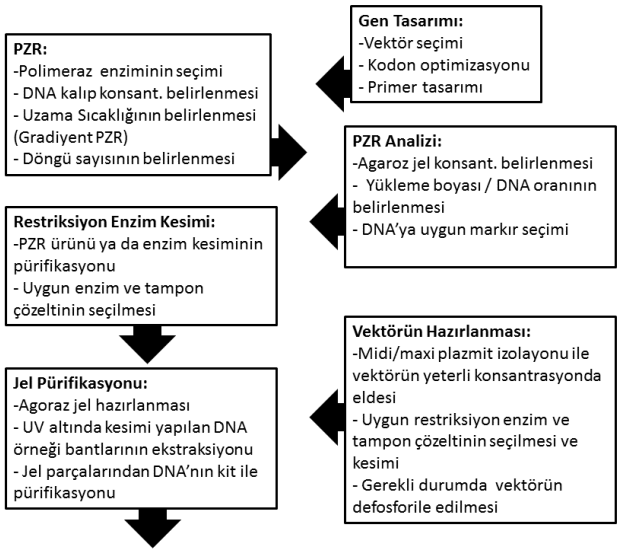
3- 1 gece, 37^0C'de inkübe edildi.

4- Oluşan koloniler sayılıp ve verim hesaplandı.

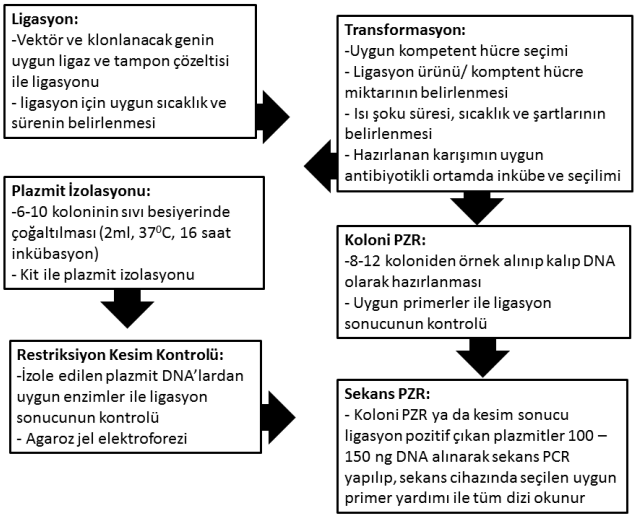
Hesaplama 1 ng kompetent hücre ekildiğinde oluşan kolonilere göre 1 mikrogram bakteriden elde edilecek koloni sayısı belirlenerek bulunur. 1 mg bakteriden oluşan koloni miktarına koloni oluşturma birimi (cfu: colony forming unit) denir (98).

3.3.1.4. Moleküler Klonlama

Klonlama işlemi sırasında tamamlanan tüm aşamaların şematik gösterimi Şekil 3.10'daki gibidir.



Şekil 3.10. Klonlama işlemini oluşturan tüm basamakların şematik gösterimi (137). Şekil Motifolio biyomedikal çizim paketi ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.10. Klonlama işlemini oluşturan tüm basamakların şematik gösterimi (devam).

Transformasyon

Elde edilen kompetent hücreler kullanılarak tasarlanan genleri bakteri suşuna aktarmak için transformasyon aşamalarına geçildi. İzlenen protokol aşağıdadır (99).

1- Kompetent hücreler (BL21 VE DH5α) ve transformasyon tüpleri buza kondu. 10 dk hücreler eriyene kadar beklendi.

2- Kompetent hücreler 150 µl olacak şekilde tüplere dağıtıldı.

3- Üzerlerine 10- 20 µl ligasyon ürünü, DNA ya da 10 ng vektör ilave edildi. Şirketten gelen genlerin olduğu vektörler BL21 ve DH5α suşlarına transforme edildi.

4- Buz üzerinde 15-20 dk beklendi.

5- Su banyosunda 42^0C'de 30 sn ısı şoku yapılıp, buza aktarıldı ve 3 dk bekletildi.

6- Isı şoku yapılan hücrelere 500 ml LB (-) ya da 250 ml SOC medyum eklenip, yarım saat çalkalayıcıda 37^0C'de inkübe edildi. (225 rpm)

7- Petriye ekilen hücreler kuruyana kadar beklenip, 37^0C'de 1 gece (16 saat) ters çevirilip inkübe edildi.

8- Büyüyen kolonilerin olduğu petriler $+4^0$C'de saklandı.

Bakteri Kültürü (97)

Transformasyon sonucu elde edilen bakteri kolonilerinden plazmit izolasyonu yapılabilmesi için bakterilerin sıvı kültürde büyütülmesi gerekmektedir. LB hazırlama protokolü, kompetent hazırlama kısmında anlatılan LB (-) protokolü ile aynı idi (Tablo 3.2.2). Ampisilin miktarı 50 µl/ml olacak şekilde hazırlanan LB sıvı kültüre eklendi.

Plazmit İzolasyonu (100)

Bakteri suşuna transforme ettiğimiz genlerin LB içinde çoğaltılmasından sonra bakteri debrisi parçalandı ve plazmit DNA izole edilip, gen yüksek konsantrasyonda izole edildi. Plazmit izolasyonu için Macherey-Nagel plazmit izolasyon kiti kullanıldı ve kitin kendi protokolüne sadık kalınarak işlem gerçekleştirildi. Plazmit izolasyon protokolü şu şekildedir;

1- 15'lik falkonlarda 5 ml'lik medyum içinde büyütülen hücrelerimiz 8000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.

2- Süpernatant atıldı ve kalan pelet 250 µl çözücü solüsyon ile homojen olana kadar çözüldü.

3- Üzerine 250 µl Liziz solüsyonu eklenip alt üst ederk karıştırıldı ve 5 dk'dan fazla beklemeden bir sonraki aşamaya geçildi.

4- Son olarak üzerlerine 350 µl'lik Nötralizasyon solüsyonu eklenip ve alt üst edilerek karıştırıldı.

5- 14.000 g'de 5 dk santrifüj edildi.

6- Üstte kalan süpernatant peletle karıştırılmadan alınıp spin kolona aktarıldı.

7- 12.000 g'de 1dk santrifüj edilip alt tüp boşaltılıp ve 500 µl yıkama tamponu eklendi.

8- 12.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrüj sonrası alt tüp boşaltıldı.

9- Yıkama tamponu içindeki alkolün uzaklaştırılması için spin kolon birşey eklemeden bir kere daha 12.00g'de santrifüj edildi.

10- Boşaltma tüpü değiştirilip 1.5 ml'lik ependorfa aktarıldı.

11- Spin kolonun ortasından filtreye dokunmadan 50 µl ayırma tamponu eklendi. 2 dk oda sıcaklığında beklendi.

12- 12.000 g'de 2 dk santrifüj edildi. İzole edilen plazmit DNA'lar – 20^0C'de saklandı.

Restriksiyon Enzim Kesimi (101)

Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden izole edilen plazmit DNA'larının doğruluğunun tayin edilmesi için uygun enzimlerle kesim işlemi yapılır.

Genlerin dizaynı esnasında eklenen enzim kesim bölgelerine göre bu enzimler tayin edilir. Tez çalışmasında kesim işlemleri için satın alınan tüm enzimler New England Biolab ürünü olduğu için ürünün kendi kesim protokolüne göre 37^0C' de yaklaşık 1-2 saat inkübe edildi. Devamında, 65^0C' de 20 dakika enzim inaktive edildi (101) (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu içerik ve şartları.

Plazmit DNA	500ng-1000ng/µl
Restriksyion enzimi (ör: XbaI/PstI; NEB)	1 µl / 1 µl
10X Restriksiyon tamponu	2 µl
Nucleazsız saf su	20 µl 'ye kadar tamamlanır

Agaroz Jel Elektroforezi (98)

Seçilen restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan plazmit DNA'ların kontrolü jel elektroforezi ile belirlendi.

1- Tasarlanan genler ve klonlama vektörü 800-8000 bp arasında değiştiği için %1'lik agaroz jel kullanıldı.

2- Bu jeli hazırlamak için 1X TBE (100 ml alınır ise) ve 1 gr agaroz mikrodalgada ısıtılıp çözüldü.

3- Hazırlanan karışıma 4 µl EtBr eklenip ve jel kasetlere dökülüp işleme hazırlandı.

4- Jellere izolasyonu ve enzim kesimi yapılarak hazırlanan plazmit DNA'lar yüklenip ve 30 dk 100 V'ta yürütülüp UV altında cihazda görüntülendi.

Jel Ekstraksiyonu (102)

Elektroforez sonucu doğru yerlerde olan genlerimiz Macherey-Nagel jel ekstraksiyon kiti kullanılarak saf DNA olarak jelden izole edildi. Jel Ekstraksiyon protokolü şu şekildedir;

1- Kesilen jel parçaları tartılarak 100 mg agaroz jele 100 µl Bağlanma Tamponu eklenip, vortekslendi.

2- Isıtıcıda 55^0 C'de 10 dk bekletilip, 3 dk'da bir vortekslendi.

3- Oda sıcaklığına gelmesi beklenip, kolona aktarıldı.

4- 1300 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı.

5- 700 µl Yıkama Tamponu eklenip, 1300 rpm'de 1dk santrifüj yapıldı.

6- Alttaki tüp boşaltılıp alkolün uzaklaştırılması için boş olarak 2 dk 1300 rpm'de santrifüj yapıldı.

7- Kolon yeni tüpe aktarılıp 70^0C'de nükleazsız saf su eklenip, 1300 rpm'de 2 dk santrifüj yapılıp, saf DNA ayrıldı.

PZR Sonrası Pürifikasyon İşlemi (102)

Ligasyon aşamasında birleştirilecek gen ve plazmitler farklı şekillerde çoğaltılıp elde edildi. Birinci yolda, GeneScript firmasından alınan genler (ODD, tPA) bakteride çoğaltılıp, izole edilip, direk tasarımda baş ve son kısımlarına eklenen restriksiyon kesim bölgelerine göre seçilen enzimlerle kesilip, bantların ekstraksiyonu yapılıp ligasyon aşamasına getirildi.

İkinci yol ise, diğer bir hedef gen olan ZsGreen geni için, enzim kesim bölgesi içeren primerler ile pSIREN-ZsGreen vektöründen çoğaltılan ZsGreen geni PZR sonrası pürifiye edilip, kesilip, tekrar pürifiye edilip, ligasyon aşamasına geçildi. PZR sonrasında ürünü pürifiye etmek için Macherey-Nagel pürifikasyon kiti kullanıldı. Pürifikasyon protokolü şu şekildedir;

1- 1,5 mL'lik ependorf tüpe 50 µI enzim kesim ürünü konuldu.

2- Enzim kesimi ürününün iki katı olacak şekilde (100 µI) bağlanma tamponu eklendi.

3- 1-2 dk beklendi. 11.000 g'de 30 sn santrifüj yapıldı.

4- Örnekler spin kolona aktarıldı.

5- Toplama tüpü boşaltıldı.

6- 700 µI yıkama tamponu eklendi.

7- 11.000 g'de 30 sn santrifüj yapıldı.

8- Toplama tüpü boşaltıldı.

9- 700 µI yıkama tamponu eklendi.

10- 11.000 g'de 30 sn santrifüj yapıldı.

11- Toplama tüpü boşaltıldı.

12- 11.000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

13- 25 µl ayırma tamponu spin kolonun ortasına eklendi. 2-3 dk bekletildi.

14- 11.000 g'de 3 dk santrifüj yapıldı.

15- Nanodrop cihazında ölçüldü.

Ligasyon Aşaması (103)

Şirketten gelen taşıyıcı vektör içindeki genler, tez çalışmasında seçilen pTet -off ve pTRE vektörlerine aktarılmak için buraya kadar olan aşamalar takip edildi.

Uygun kesim bölgeleri kullanılarak hedef DNA'larımız ve ptet off ve pTRE vektörlerinde yapışkan uçlar (sticky ends) oluşturuldu. Böylece, ligasyon enzimleri kullanılarak genimizi vektörümüz ile birleştirebildi. Ligasyon işleminde, Thermo T4 DNA ligaz kullanıldı ve ürünün Tablo 3.8'deki protokole sadık kalınarak işlem gerçekleştirildi. Hazırlanan ligasyon tüpleri oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.8. Ligasyon Protokolü.

Gen Miktarı	[(kb DNA)/(kb vektör)] × ng vektör
Vektör Miktarı	20-100 ng
10X ligasyon tamponu	2 µl
T4 Ligaz Enzimi	1 µl

Koloni PZR (99)

Koloni PZR işleminde kullandığımız kalıp DNA, transformasyonu sonucu petride büyütülen bakterilerden elde edildi.

1- Her bir petriden 8-12 arası koloni seçildi.

2- Seçilen koloniler 5 ul nükleazsız saf su ile karıştırıldı.

3- Örnekler 95^0C'de 5dk bekletildi.

Yukarıdaki işlem sonucu elde edilen kalıp DNA Taq polimeraz (Thermo Fisher- EP0402) kullanılarak ürünün Tablo 3.9'daki protokole (104) sadık kalınarak DNA çoğaltıldı.

Tablo 3.9. PZR reaksiyon içerikleri.

Bileşenler	**Miktar (µl)**	**Şartlar**	
NH_4 Tampon	5	İlk denatürasyon	95^0C
dNTP karışımı (2 mM)	5	Denatürasyon	95^0C
İleri Primer (5 pmol)	1	Primer bağlanma	57^0C
Geri Primer (5 pmol)	1	Uzama	72^0C
$MgCI_2$ Tampon	5	Son uzama	72^0C
Taq Polimeraz	0.2	Döngü sayısı	35
DNA örneği	Koloni pZR:5 ul; PZR: 1ng		
Nükleazsız saf su	50 ul'ye kadar		

Sekans PZR (105)

Sekans PZR'da direkt PZR ürünü kalıp DNA olarak kullanılıyorsa DNA pürifiye edilmelidir aksi takdirde sekans kalitesi primer ve dNTP'den dolayı çok düşük olur (105). Çalışmada kullanılan kalıp DNA'mız plazmit izolasyonu sonrası elde edilip sekans aşamasına geçildiği için ayrı bir pürifikasyon aşaması bizim için gerekmemektedir. Bir düzgün okuma almak için gerekli DNA miktarı gen

uzunluğuna, tek ya da çift zincir DNA'ya göre değişmektedir. Çift zincirli plazmit DNA'yı sekansladığımız için bizim bir reaksiyonda 150-300 ng arası kalıp DNA kullanmamız gerekti. Reaksiyon içerikleri ve şartları Tablo 3.10'daki gibidir (105).

Tablo 3.10. Sekans PZR reaksiyon bileşenleri ve şartları.

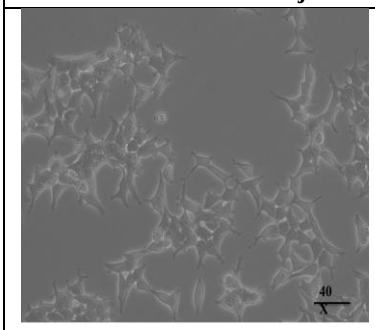
Bileşenler	**İleri okuma**	**Geri okuma**	**Şartlar**	
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaksiyon Karışımı	4 ul	4 ul	96 ^{0}C	1 dk
BigDye™ Terminator 3.1 5X Tampon Çözeltisi	2 ul	2 ul	96 ^{0}C	15 s
İleri Primer	3.2 pmol	-	50 ^{0}C	15 s
Geri Primer	-	3.2 pmol	60 ^{0}C	4 dk
Nükleazsız su	20 ul kadar	20 ul kadar	4 ^{0}C	∞
Kalıp DNA	(150 - 300 ng)	(150 - 300 ng)	25	
Final Hacim	20 ul	20 ul		

3.3.1.5. Hücre Kültürü (106)

Hücrelerin kültür edilmesi süresince, HEK293T hücre hattı için DMEM/High Glucose medyumu kullanıldı. %5 CO_2, 37°C'lik inkübatörde hücreler büyütüldü. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirildi. HEK293T hücre hattının büyütülmesi için gerekli medyum şu şekilde hazırlandı;

- 500 mL DMEM (HyClone, BE12-604F) besiyeri içerisine;
- 50 mL FBS (Wısent- 080110 veya HyClone- CH30160.02),
- 5 mL penisilin / streptomisin (Lonza, DE17-602E),
- 4 mL L-Glutamin (Lonza, BE17-605E)
- 50 µl Plasmosin (ant-mpt- İnvitrogen) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Tablo 3.11. HEK293T hücre hattının kültürü esnasındaki morfolojisi.

Satın Alınan HEK293T hücre hattının morfolojisi	**Açıklama:**
	Satın alınan HEK293T hücre hattının yöntemde geçen medyum ve bileşenleri ile kültür edilmesinden sonra çekilen resimde morfolojileri beklendiği gibi görünmektedir. Resim ışık mikroskobunda (Nikon A1R- NİS Elements) 40X'de çekilmiştir.

Hücre Pasajlama ve Stok Süreci

Stoktan Hücre Ekimi (107)

1- Sıvı azot tankından alınan hücre, 37°C'de ki benmari içerisinde 1-2 dk bekletildi.

2- Falkon içerisine 7 ml medyum eklendi ve kirovial tüplerin %70 alkol ile temizlenip içindeki hücreler falkona aktarıldı.

3- 25°C'de 1100 rpm 'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı.

4- Hücrelerin üzerine peletin yoğunluğuna göre gerekli miktarda medyum konulup, ekim yapılacak flaskın boyutuna göre hücrelerin üzerine medyum eklendi

5- Pipetaj yapılarak hücreler çözdürüldü ve flaska ekildi. Ekilen hücreler 37°C'de, %5 CO_2'lik inkübatörde inkübe edildi.

Medyum Değişimi (107)

1- Medyum 37 °C'ye ısıtıldı.

2- 25,75'lik veya 175'lik flasktaki medyum uzaklaştırıldı.

3- Flask büyüklüğüne göre sırasıyla 8, 15, 20 mL medyum eklendi ve etüve kaldırıldı.

4- Hücre yoğunluğuna göre gerektiğinde hücreler pasajlandı.

Harvest İşlemi (107)

1- Flasktaki medyum boşaltıldı.

2- Flaska 10 ml 1xPBS (Lonza, 51226) ilave edilerek canlı, yüzeyde tutunan hücreler temizlendi.

3- Flaskın büyüklüğüne göre 0,5 mL- 2 mL tripsin (Biological İndustries, 03-052-1B) eklenip, etüvde 2- 5 dk arasında inkübe edilip, hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması sağlandı.

4- Flasktan toplanan hücreler falkona aktarıldı.

5- 25°C'de 1100 rpm'da 3 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı.

6- Medyumda peletteki hücreler çözülüp eşit bir şekilde hücre kültür tabaklarına (well=kuyucuk) tekrar ekildi. Bu ekim sırasında kullanılacak tabakların (well-plate) boyutları ve hücre tipi önemlidir. Her kuyu için uygun sayıda hücre ekimi gerçekleştirildi.

3.3.1.6. Hücre Canlılık Analizi (Tyrpan Blue Cell Viability Assay)

Hücre kültürü aşamalarında kuyucuklara hücrelerin eşit dağıtılması için hücreler sayılarak ekim yapıldı. Bunun için hücre sayımı şu şekilde yapıldı (108);

1- Flasktan yukarıda belirtildiği gibi kaldırılan hücreler medyumda çözündürülüp karışım homojenize edildi, hücre sayımı için; 10 µl Tiripan mavisi, 10 µl hücre örneği ile karıştırıldı.

2- Bu karışımdan 10 µl alınıp, Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter cihazının slaytına eklenip, bu cihazda hücre sayımı yapıldı. Cihaz 1 ml örnekte ne kadar canlı hücre olduğu sayısını verir.

3- Konsantrasyon (hücre/ml) = canlı hücre sayısı ve canlılık oranı belirlenir. Ekim yapılacak kuyulara uygun hesap yapılıp ekim gerçekleştirildi.

4- Tez çalışmasında genellikle transfeksiyon için hücreler 6'lı veya 12'li tabaklara (well-plate) ekildi. HEK293T hücreleri kuyu başına 250 000 hücre 12'li tabaklara, 500 000 hücre 6'lı tabaklara ekildi.

3.3.1.7. Transfeksiyon İşlemi

Transfeksiyon işleminde önemli olan temel aşamalar; transfekte edilecek gen ve bunu hücreye transferine yetecek PEI miktarını belirlemektir. PEI hücreye zarar verdiği için transfeksiyon yapıldıktan sonra maksimum 24 saat içinde hücre medyumunun değiştirilmesi gerekir. Sonrasında, transfer edilen hedef protein üretimi için transfeksiyonun yapıldığı andan itibaren 72 saat beklenir ve protein analizi aşamasına geçilir (florometrik ölçüm ya da protein izolasyonu) (109).

6'lık ya da 12'lik tabaklara ekimi yapılan hücreler inkübatörde büyümeye bırakıldı. Hücre yoğunluğu mikroskopta kontrol edilerek %40-60 yoğunluğa ulaştığında transfeksiyon işlemine geçildi. Trasnfeksiyon işlemi için kimyasal ajan olarak polietilenamin (Polyethylenimine-PEI) kullanıldı (109, 110). Takip edilen protokol aşağıdaki gibidir;

Her bir kuyu için kullanılması gereken DNA miktarı kuyunun büyüklüğü ile değişmektedir. Tablo 3.12'de kuyu büyüklüklerine göre kullanılması gereken DNA miktarları verilmiştir.

Tablo 3.12. Kullanılan hücre tabağına göre DNA miktarları.

Mikroplate	**Her bir kuyu için gereken DNA miktarı**
6'lık	0.5 pmol
12'lik	0.25 pmol
24'lük	0.125 pmol

Transfekte etmek istediğimiz DNA'nın moleküler ağırlığını aşağıda verilen formülü kullanarak hesaplayabiliriz. Formülde her bir baz çiftinin moleküler ağırlığı ortalama 650 g/mol olarak kabul edilmiştir. Kullanılan DNA'nın içermiş olduğu baz

çifti sayısı ile belirtilen sayı çarpılarak kullanılan DNA'nın moleküler ağırlığı hesaplanabilmektedir (111).

Plazmit Moleküler ağırlığı = (……. bp) x (650 g/mol/1bp) = …….X…… g/mol

Her bir kuyu için kullanılması gereken DNA miktarı mol cinsinden daha önce verilen tabloda belirtilmiştir. Plazmitin moleküler ağırlığını hesapladıktan sonra elde edilen DNA'dan ne kadar kullanmamız gerektiğini aşağıda verilen formülü kullanarak hesaplandı.

DNA µg / well = (X g/mol) x (0.125 / 0.25 / 0.5 pmol/well) x (10^6 µg/1g) x (1 mol / 10^{12} pmol) = ……Y…… µg

Çift zincirli DNA'nın her bir mikrogramında 3 nmol bulunmaktadır. Ayrıca 1 mg/ml PEI stok solüsyonunun her bir mikrolitresinde 23.26 nmol azot bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda en iyi Azot/Fosfat (N/P) oranının yaklaşık 20 olduğu gösterilmiştir (111). Tüm bunlar dikkate alındığında her bir kuyu için kullanılması gereken PEI miktarı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

PEI µl / well = (3 nmol·P) x (..Y…·dna) x (20) / (23.26 nmol·N / µl·PEI) = ……Z…….. µl

Her bir kuyu için verilen değerler kullanılacak kuyu sayısı ile çarpılarak kuyu sayısı arttırılabilir. Protokol şu şekildedir (109, 111);

1. Öncelikle belirlenen miktarlarda DNA, serum içermeyen medyum (OPTIMEM-Gibco) içerisine eklendi ve iyice vorteks yapıldı.
2. Sonrasında belirtilen miktarlarda PEI solüsyonu; DNA;serum içermeyen medyum karışımı üzerine eklendi ve karıştırıldı.
3. Bu solüsyon oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara eşit bir şekilde dağıtıldı.
5. Hücreler 4-24 saat inkübasyona bırakıldı ve protein analizi aşamasına geçildi.

3.3.1.8. $CoCI_2.5H_2O$ Kullanılarak Hipoksik Ortam Karakterizasyonu

Kobalt klorür hekzahidrat (moleküler ağırlık=237.9) hipoksi mimik ortam oluşturarak HIF1A'nın ekspresyonunu tetikleyen seçtiğimiz kimyasal bir uyarıcıdır (112). Bu kimyasal (Sigma-Aldrich-C8661-25G) su içerisinde çözünür ve kırmızı renk verir. Literatürde, 100 uM konsantrasyonda $CoCI_2$ ile HEK293T hücre hattında hipoksik ortam elde edilmiş (113). Bu çalışmada, doz cevap eğrisi oluşturmak ve uygun hipoksi karakterizasyonunu sağlayabilmek adına 100 uM, 150 uM, 200 uM konsantrasyonlar ayrı ayrı denendi. Hazırlanışı şu şekildedir (113);

1- Öncelikle 25 mM'lık stok hazırlandı. Bunun için 1ml saf su içerisinde 5,95 mg $CoCI_2.6H_2O$ çözülerek stok hazırlandı.

2- Hücrenin ekildiği kuyu içerisinde transfeksiyon sonrasında 3 ml medyum eklendi. 3 ml'lik hacim içerisinde hipoksik ortamın oluşturulabilmesi için 100 uM, 150 uM ve 200 uM konsantrasyonları sağlayacak stok solüsyon eklendi. (100 uM için 12ul stok solüsyon; 150 uM için 18 ul stok;200 uM için 24 ul stok solüsyon kuyuya eklendi)

3- $CoCI_2.6H_2O$ eklenen hücreler inkübatöre tekrar yerleştirildi. (8-24 saat süresi ile hipoksi şartı oluşturuldu.)

4- Deney, kontrollü yapıldığı için hipoksik ortama konan hücrelerle aynı anda normokside de hedef protein takibi yapılacak hücrelerinde medyumu yenilendi ve inkübatöre yerleştirildi. (ikiz kültür inkübasyonu).

Bu aşamadan sonra hücrelerin 6 saat inkübe aşaması tamamlanıp, hedef ZsGreen floresan proteinin florometrik ölçümü yapıldı.

Not: Eğer immünfloresan test yapılacaksa protokol bir iki basamak hariç tamamen aynıdır.

3.3.1.9. İmmünfloresan Antikor Testi (IF testi)

İmmünfloresan antikor testi için yapılan hücre ekiminde tek fark, bu analizin sonunda hücreler lama aktarılıp mikroskopta görüntüleneceği için ekim işleminin başında tabakların içine oval 13 mm'lik lameller konur ve ekim işlemi sonra gerçekleştirildi. Bu sayede, oval lamel üzerinde büyütülen, transfeksiyonu yapılan ve

hipoksiye maruz bırakılan hücreler alınıp mikroskopta görüntülenebildi. Bu işlem, IF testi esnasında daha az antikor harcamayı ve floresan koruyucu ile lamı kaplayarak görüntü alma esnasında örneklerin solmasını engelledi. İmmünfloresan testin aşamaları şu şekildedir (114);

1- Lamel üzerindeki hücrelere 500 ul %4'lük paraformaldehit eklenip, 15 dk $+4^0$C'de inkübe edilerek fikse edildi.

2- Fikse edilen her kuyudaki hücreler 500 ul PBS solüsyonu ile yıkandı.

3- Hücreler, %0,5'lik Triton X + PBS solüsyonu ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

4- Hücreler 500 ul PBS solüsyonu ile yıkandı. (X2)

5- %0,1'lik Triton X + PBS solüsyonu ile %1'lik hazırlanan süt tozu ile örnekler 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

6- 100 ul' lik %0,1'lik Triton X + PBS solüsyonu içerisine 1ul Anti-VP16 antikoru eklenerek, her lamel üzerine 15 ul 1.antikor eklenip oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.

7- %0,1'lik Triton X + PBS ile hücreler yıkandı. (X2)

8- 3.yıkamada 1/200 oranında 2.antikor (Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488; Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488) eklendi. 30 dk, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi.

9- %0,1'lik Triton X + PBS ile hücreler yıkandı.

10- PBS içinde 1/5000 oranında DAPI (çekirdek boyası) eklendi ve her kuyuya 500ul konuldu. 10 dk, oda sıcaklığında inkübe edildi.

11- 1ml PBS ile hücreler yıkandı.

12- Lameller lam üzerine dikkatlice kapatılıp, üzerlerine solmalarını engellemek için floresan kalkan (Abcam- ab104135) damlatıldı.

13- Floresan mikroskopta görüntü almaya hazır hale gelen örnekler eğer bekletilecekse +4^{0}C'de, karanlıkta saklandı.

3.3.1.10. Hücreden Protein İzolasyonu

Transfeksiyonu yapılıp, 3 gün takibi yapılan hücreler hipoksik ortamda 6 saat inkübe edilip western blot yapabilmek için protein izolasyonu işlemine geçildi. Bunun için gerçekleştirilen aşamalar aşağıdaki gibidir. Protein izolasyonu protokolü şu şekildedir (115);

1- Her kuyudan pipetle medyum uzaklaştırıldı.

2- 1 ml PBS tamponu kullanılarak önce yıkama yapıldı, sonra tekrar 1 ml PBS tampon eklenip hücre kazıyıcı yardımı (cell scrapers, Kat. No: 89260-222) ile hücrelerin tamamı kaldırıldı.

3- 1 ml PBS içinde ki hücreler ependorf tüplere aktarıldı ve 4000 rpm (4 krpm)'de, +4^{0}C'de, 4 dk santrifüj edildi.

4- Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp, pelet ayrıldı. (Bu aşamada bekleme yapıldığında peletler -80^{0}C'de saklandı.)

5- Hücre debrisinden protein ekstrasiyonu için RIPA liziz tamponu (RIPA Lysis and Extraction Buffer; Kat. No: 89900) kullanıldı. Liziz tamponu içinde protein stabilizasyonunu sağlamak için Protein Stabilizasyon Kokteyli (Protein Stabilizing Cocktail; Kat. No: 89806) eklendi. Bu karışım 1 ml RIPA içine 10 uL koktely olarak hazırlanıp her tüpe 150 uL eklendi.

6- Örnekler hafifçe vortekslenip 10 dk buzda bekletildi.

7- Sonikasyon cihazında örnekler yine buz içerisinde orta güç frekansta 3 dk bekletildi. Tüpler çıkarıldığında eğer homojen ve şeffaf değilse sonikasyon 5 dk'ya tamamlanır ancak buz yenilendi.

8- Tüpler sonikasyondan sonra +4^{0}C'deki santrifüjde maksimum hızda 5 dk santrifüj edildi.

9- Proteinin bulunduğu süpernatant başka bir tüpe aktarıldı. Bu aşamada saklama işlemi -80^{0}C'de yapıldı.

3.3.1.11. Bradford Analizi ile Protein Miktar Tayini (96)

Protein örnekleri, 1:5 seyreltilmiş Coomassie mavisi ile 1:20 oranında karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (96). Mikroplate okuyucuda örneklerin 595 nm dalga boyundaki absorbansı ölçüldü. Standart proteinler, 2 mg/ml Bovin serum albüminden (BSA) hazırlandı. Standartlardan elde edilen absorbans sonuçlarına göre yapılan regresyon analizi ile protein konsantrasyonları belirlendi.

3.3.1.12. Western Blot Analizi

Proteinlerin Western İşlemi için Hazırlanması (115)

1- Boya hazırlanışı; 250mM Tris-HCI (pH: 6.8), %10 SDS, %0.1 Bromofenol Mavisi, %50 gliserol içeren tamponu hazırlandı. Tampon miktarının %5'i kadar merkaptoetonol eklendi.

2- Protein örnekleri miktarının %25'i hacimde boya ile karıştırıldı ve ısıtıcı blokta 95^{0}C'de 5 dk bekletildi, böylece proteinlerin üç boyutlu yapısı bozuldu ve lineer hale getirilerek Western Blot işlemine uygun forma getirildi.

SDS-PAGE Jel Hazırlanması (115)

Bir proteinin net yükü, yapısındaki aminoasitlerin yüklerine göre belli olur. SDS-PAGE esnasında, proteinlerin elektrik alanındaki hareketi net yüklerine ve moleküler ağırlıklarına göre değişir. Bu yüzden, aynı ağırlığa sahip olmasına rağmen net yükleri farklı proteinler elektrik akımında farklı hızlarda hareket eder. Bu sıkıntıyı ortadan kaldırmak için sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanı ile protein lineer hale getirilir ve proteinin net yükü negatif olur. Poliakrilamid jele yüklemeden lineer ve (-) yüklü hale getirilen proteinler moleküler ağırlıklarına göre elektrik alanında ayrılabilir (116). Kullanılan protokol aşamaları ve hazırlanan solüsyonlar aşağıdaki gibidir (116) (Tablo 3.13);

Tablo 3.13. Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması.

%30 ACA (akrilamid)	58 gr ACA + 2 gr N,N,metilen bis ACA + 200 mL saf su (distelled water)
2M Tris HCL	72 gr Tris + 250 ml saf su karışımı hazırlandı ve iyice çözündükten sonra pH:8,8 e ayarlandı.
0.5M Tris HCL	6 gr Tris + 80 ml saf su karışımı hazırlandı ve iyice çözündükten sonra pH:6,8 e ayarlandı.
%10APS (amonyumpersülfat)	25 mg APS + 250µL dW karışımı hazırlandı. Bu karışım uzun süreli saklanamaz, bu yüzden bir hafta yetecek kadar hazırlandı.
%10SDS (sodyumdodesilsülfat)	5gr SDS tartılıp 50 ml saf su ile karıştırıldı.

Yukarıdaki içeriklere göre hazırlanan solüsyonlar ile hizalama (stacking gel) jel ve yürütme (running) jeli hazırlandı (Tablo 3.14, Tablo 3.15). Hizalama jelinin pH'ı 6.8, yürütme jelinin 8.8'dir. pH elektrik akımı yönünde protein hızını etkiler. Ayrıca, yürütme jelindeki akrilamid oranına göre jel porlarının boyutu değişir. ACA oranı artıkça jel yoğunluğu artar (116). Tez çalışmasında, %10'luk jel seçilerek deneyler gerçekleştirildi.

Tablo 3.14. Yürütme jeli içeriği.

	%4	**%5**	**%6**	**%7**	**%8**	**%9**	**%10**	**%12**
dW	11.86 ml	11.26 ml	10.6 ml	10 ml	9.46 ml	8.84 ml	**8.26 ml**	7 ml
%30 ACA	2.4 ml	3 ml	3.6 ml	4.2 ml	4.8 ml	5.4 ml	**6 ml**	7.2 ml
2M Tris	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	**3.38 ml**	3.38 ml
%10 APS	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	**180 µL**	180 µL
%10 SDS	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	**180 µL**	180 µL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	**20 µL**	20µL

Tablo 3.15. Hizalama (Stacking) jeli ve tampon çözelti bileşenleri.

dW	4.055 ml
%30 ACA	0.7 ml
0.5 M Tris	1.5 ml
%10 APS	50 µL
%10 SDS	60 µL
TEMED	10 µL

Yürütme Tampon İçerikleri (1lt saf su içinde- 10X için)	**Tris**	30.3 gr
	Glisin	144.1 gr
	SDS	10gr
Transfer Tampon İçerikleri (1lt'ye saf su ile tamamlanır)	**Methanol**	250ml
	Glisin	14.4 gr
	Tris	3gr

Jellerin hazırlanışı şu şekildedir (115);

1- Öncelikle yürütme jeli hazırlandı.

2- Belirtilen oranlarda çözeltiler birleştirildi ancak APS ve TEMED polimerleşmeyi sağlayan ajanlar olduklarından dolayı karışıma en son eklendi.

3- Jel karışımı iki camdan oluşan kasetin arasına dikkatlice akıtıldı.

4- Üzerine 1 ml 2-propanol eklendi.

5- Jel kuruduktan sonra propanol akıtıldı.

6- Hazırlanan hizalama jel karışımı donmuş haldeki yürütme jeli üzerine akıtılarak tarak takıldı.

7- İyice kuruduktan sonra tarak çıkartıldı ve jel yürütme tamponu doldurulan tankın içine yerleştirildi.

SDS-PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer (115)

1- Örnekler protein belirteç ile birlikte 90 V'da 5', 110 V'da 3 saat yürütme tamponunda yürütüldü.

2- Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transfer (%15 Metanol içeren 1X Transfer Tamponu) edildi. Sonrasında, yağsız süt tozu ile 30' oda sıcaklığında çalkalandı. (100 ml %0,001 Tween-20 içeren Tris Tuz Solüsyonu için 5g süt tozu).

İmmunoblotlamada Birincil Antikorla Muamele (115)

1- Proteinleri jelden membrana aktardıktan sonra, membran TBST- 1X tamponu (Kat. No: #9997) ile yıkandı.

2- Falkonda 2.5 g süt tozunun üzerini TBS-T ile 50 ml ye tamamlayarak süt tozu çözeltisi hazırlandı (%5'lik).

3- 1. Antikor ile muamele için antikorlar 1/500 (10ul) ve 1/1000 (5ul) oranlarında 5ml, %5'lik süt tozu içinde hazırlandı. (Tablo 3.16)

4- 1 saat süt tozu ile bloklamaya bırakılan membrandan süt tozu uzaklaştırıldı ve 5 ml birincil antikor çözeltisinden eklendi.

5- 1 saat ve tüm gece boyu inkübasyonlar ayrı ayrı denendi, sonuçlar kısmında membran görüntüleri mevcut.

Tablo 3.16. Western Blot'ta kullanılan antikorlar. Her antikor kendi markasına ait protokolünde geçen oranlarda ve sürede inkübasyon işlemine tabi tutuldu.

1. Antikor/oran	**2.Antikor/oran** Hepsi için oran 1/4000	**Marka**
Anti-VP16 Antikoru (1-21)	Fare	SantaCruz sc-7545
Anti-VP16 Antikoru	Tavşan	BD Transduction Laboratories 3844-1
Anti-6X Histag Antikoru	Fare	Abcam ab18184
Beta Aktin	Tavşan	SantaCruz sc-47778

Yıkama- İkinci Antikor Muamelesi- Görüntüleme (115)

1- Birinci antikorlar falkona tekrar alınıp, +4°C'ye kaldırılıp, tekrar kullanım için muhafaza edildi. Saklamak için antikor içerisine 1/1000 oranında koruyucu madde eklendi.

2- Membranlar TBST (1X) ile 3'er kez yıkandı.

3- 5 ml TBST içine 1/4000 oranında 1. antikora uyumlu olan 2. antikor eklendi ve oda sıcaklığında 40 dk çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

4- 2. antikordan sonra membran 3'er kere TBST (1X) ile yıkandı.

5- BioRad marka ECL solüsyonları (Kat. No:1705060) her bir membran için 1:1 oranında olmak üzere 300ul hazırlandı ve membran üzerine yayılıp 1 dk bekletildi. (Bu aşamada uzun beklemek görüntüde kararmaya neden oldu, çünkü ECL içindeki HRP enzimi 2. antikora bağlanır, bağlanma çok fazla olunca UV altında çok ışıma yaptı.)

6- Görüntüleme cihazında (ChemiDoc MP system/Bio-Rad) görüntülenen membranın, cihazın kendi yazılımı (BioRad Image Software) ile bant yoğunluk analizi (densiometric analysis) yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Gen Tasarımı ve Kodon Optimizasyonu

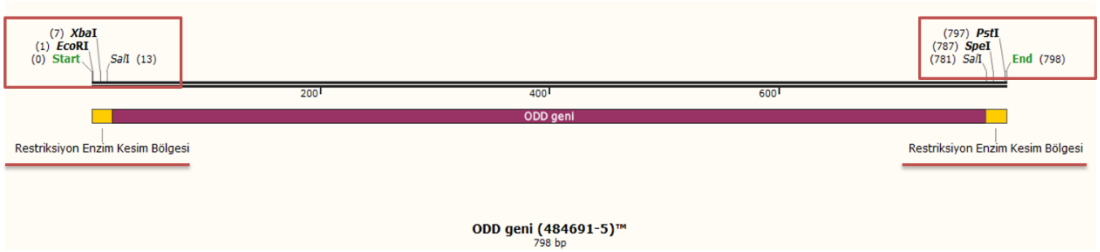
4.1.1. ODD Gen Tasarımı

ODD geni tez çalışmasında pTet-off vektörü üzerindeki tTA (tetrasiklin bağımlı transkripsiyon faktörü) geninin N ucuna klonlanabilecek özelliklerde tasarlandı ve GeneScript firmasına sipariş edildi (Çin, Sipariş no: 484691-5). Tasarımda genin pTet-off vektörüne klonlamak için N ucuna EcoRI, XbaI, SalI C ucuna ise SalI, SpeI, PstI restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri eklendi (Şekil 4.1). Bu enzimlerin seçim nedeni ikili kesim (double digestion) için uyumlu enzimler olmaları ve tek reaksiyonda yani aynı tüp içinde iki enzimle kesim yapılabilmesidir (99). Bu enzimler aynı zamanda pTet-off vektöründe çoklu kesim bölgesinde bulunan genlerdir. Bu sayede, vektör ve ODD geni XbaI, SpeI (tez çalışmasında klonlamada kullanılan enzim) enzimleri ile kesildiğinde iki gende de birbiri ile birleşmelerini sağlayacak yapışkan uçlar (sticky ends) oluşturulmuş oldu.

pTet-off vektörü üzerindeki tTA transkripsiyon faktörü, TETR (DNA bağlanma bölgesi) ve VP16 (transkripsiyon aktivatörü) bölgelerinden oluşur (69). Bu çalışmada, tTA proteini ODD ile hibrit hale getirildi. Protein halinde bu gen dizisine yeni bir bölge eklenmesi proteinin 3 boyutlu yapısını değiştirdi. Bu yüzden en uygun ODD bağımlı tTA transkripsiyon faktörünü bulabilmek için ODD geni SalI enzimi kullanılarak TETR-VP16 ortasına da klonlandı. Böylece, elimizde 2 farklı 3 boyutlu yapıya sahip ODD bağımlı tTA transkripsiyon faktörü oldu ve deneylerde aktivasyon karşılaştırılması yapılabildi (Tablo 4.25). N ucuna ODD eklenen gen tasarımı ODD-TETR-VP16 dizisi olarak, tTA ortasına eklenen dizide TETR-ODD-VP16 olarak isimlendirildi.

Not 1: Tasarımda genin N ve C ucuna birden fazla tanıma bölgesi yerleştirilmesinin nedeni deneyler esnasında farklı enzim kombinasyonları yapabilmek ve klonlamayı tamamlayabilmek içindi.

Not 2: *Gen Tasarımları (3.2.3.1)* kısmında sekansın NCBI veritabanından bulunması ve SnapGene programı ile modifiyesi ayrıntılı anlatılmıştır. GeneScript'ten alınanan 484691-5 sipariş no.lu ODD gen dökümanları EK.1'dedir.

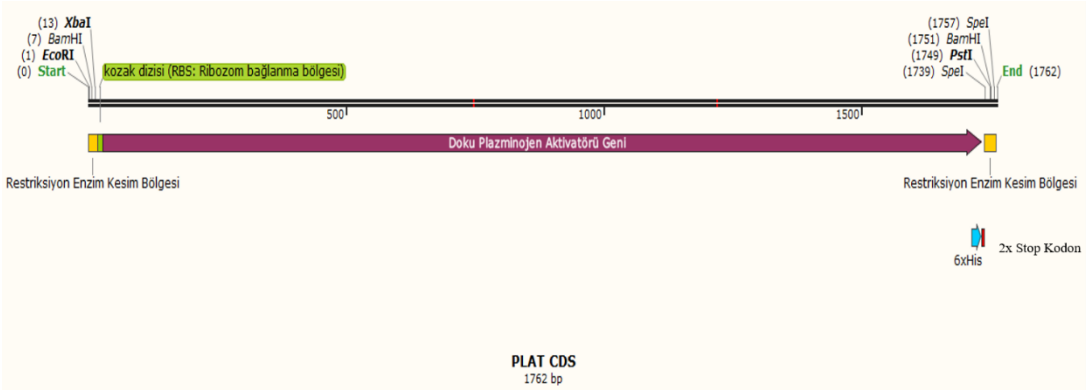


Şekil 4.1. pTet-off vektörüne klonlanacak ODD gen tasarımı. ODD sekansının uçlarına klonlama için XbaI, EcoRI, PstI ve SpeI restriksiyon kesim bölgeleri eklendi. Aynı enzimlerin tanıma bölgeleri sekans üzerinde mevcut ise aminoasit değiştirilmeden uygun başka bir kodon ile değiştirildi. Tasarım SnapGene programında yapılmıştır.

4.1.2. Doku Plazminojen Aktivatörü Tasarımı

Hedef gen olarak kullanılacak tPA geninin (NM_000930.3) sekansı NCBI veritabanından indirilip (136), SnapGene programına kaydedildi. Geni, pTRE vektörüne klonlamak için başına EcoRI, XbaI ve sonuna SpeI, PstI, BamHI enzim kesim bölgeleri eklenerek tasarlandı. Tasarlanan tPA geninin 5' ucuna translasyonun başlaması için Kozak dizisi (ribozama bağlanma dizisi) eklendi. Ayrıca, protein üretildikten sonra Western blot analizi yapılabilmesi için 3' ucuna stop kodondan önce His-tag (6XHis) dizisi eklendi. Genin tasarım aşamaları ODD geninde anlatıldığı gibi NCBI veritabanı ve SnapGene programı kullanılarak aynı aşamalar izlenerek tamamlandı (Şekil 4.2). Genin siparişi GeneScript firmasına verildi. (EK.1, Sipariş no: 484691-6).

Hem ODD hem de tPA geninde klonlama yapılabilmesi için N ve C uçlarına eklenen restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri eğer gen üzerinde de varsa bu diziler aminoasiti değiştirmeden uygun başka bir kodon ile değiştirildi.

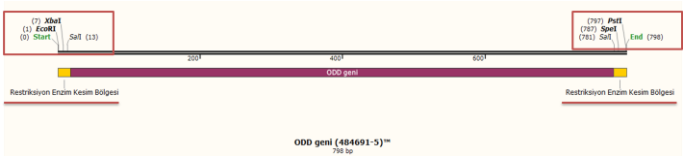
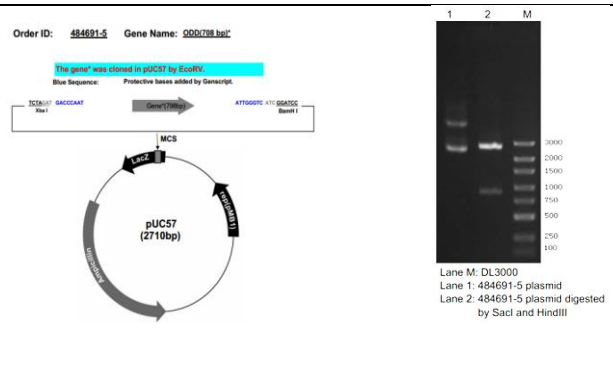


Şekil 4.2. tPA gen optimizasyon simulasyonu. pTRE vektörüne klonlanacak doku plazminojen aktivatörü tasarımı için sekansa kozak dizisi, 6xHis bölgesi, 2X stop kodon ve restriksiyon kesim bölgeleri eklendi. Aynı enzimlerin tanıma bölgeleri sekans üzerinde mevcut ise aminoasit değiştirilmeden uygun başka bir kodon ile değiştirildi. Tasarım SnapGene programında yapılmıştır.

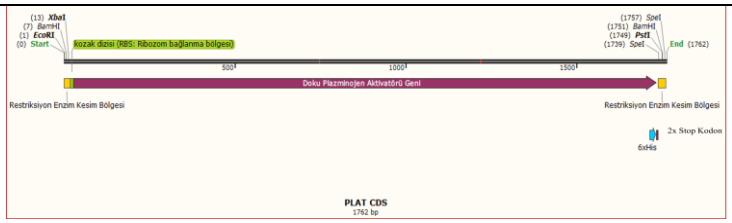
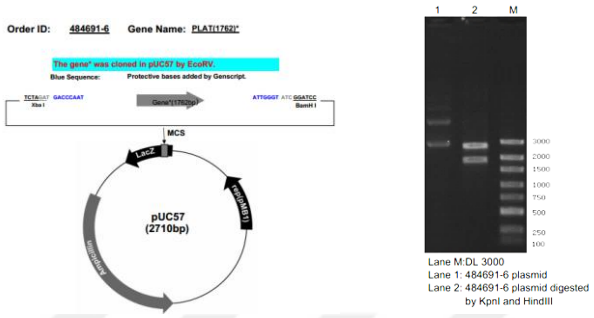
4.1.3. GeneScript Firmasından Gelen Genler

GeneScript firmasına genler bahsedildiği üzere sipariş edildi ve teslim alındı. Elimizdeki genler 1-3 ng arasında seyreltilerek BL21 bakterisine transforme edilip klonlama işlemine geçmek için çoğaltıldı. Firmadan elimize ulaşan genler ile ilgili dökümanlar EK.1'de sunuldu. Genlerin tasarlanan halleri ve ürettirilen genlerin kontrol sonuçları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Sipariş edilen ODD gen kontrolü.

Tasarlanan ODD Geni	
pUC 57 vektörü + ODD GeneScriptten gelen genlerin kontrolü	

Tablo 4.2. Sipariş edilen tPA gen kontrolü.

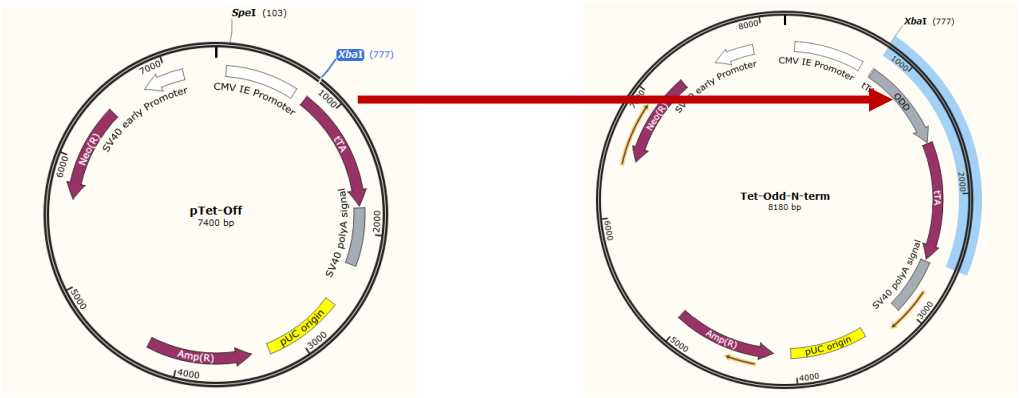
Tasarlanan tPA Geni	
pUC 57 vektörü + tPA GeneScriptten gelen genlerin kontrolü	

4.2. Genlerin Klonlanması

4.2.1. Tet-ODD Vektörünün Klonlanması

4.2.1.1. N Ucuna ODD geninin Klonlanması (ODD-TETR-VP16)

GenScript'ten sipariş edilen ODD bölgesi, pUC57 vektörü içinde geldi. pUC57-ODD vektörü XbaI,SpeI; pTet off vektörü XbaI enzimleri ile kesilip standart klonlama teknikleri ile N terminal ODD-TETR-VP16 vektörü oluşturuldu. Klonlamanın simülasyonu Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. N ucuna klonlanan ODD'nin haritası. pTet off vektörüne klonlanması hedeflenen ODD bölgesinin vektör haritası üzerindeki gösterimidir. Simülasyon SnapGene programında hazırlandı.

Enzim Kesimi

Yaklaşık 5000 ng olacak şekilde pUC57-ODD ve pTet off vektörü uygun enzimlerle kesildi (Tablo 4.3). pTet off vektöründe ODD'nin CMV IE promotorunun ve tTA'nın arasına yerleştirilmesi için vektör sadece XbaI, pUC57-ODD XbaI;SpeI ile kesildi. (XbaI ve SpeI kesim sonrası yapışabilir uçlar (compatible stick ends) oluşturur). 37^0C'de, 2 saat su banyosunda kesim yapıldı.

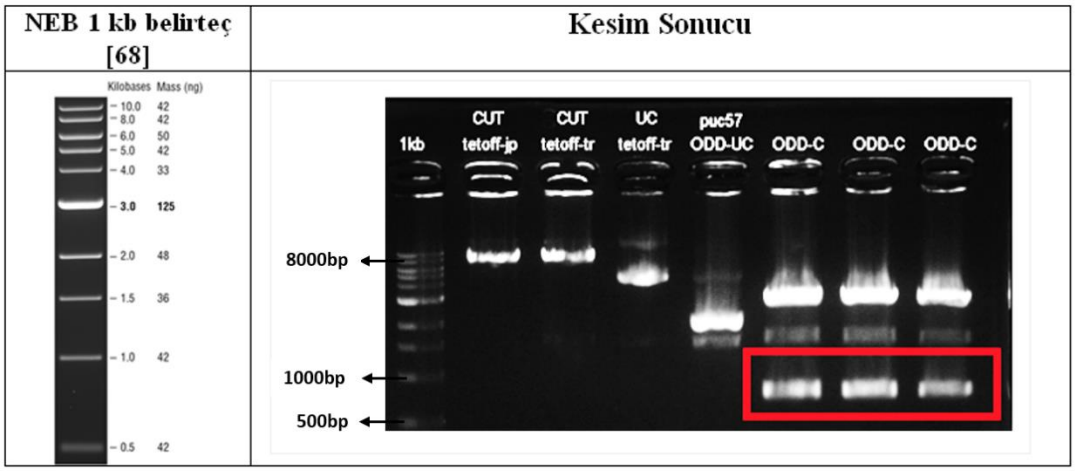
Tablo 4.3. pTet-off ve pUC57-ODD vektör kesimi.

Konsantrasyon ug/ul	**Bileşenler**	**1.tüp**	**2.tüp**
2.5	pTet off vektörü	1ul	
0.23	PUC57-ODD vektörü		21.6 ul
20 ünite/ml	XbaI-NEB	0.5ul	0.5ul
20 ünite/ml	SpeI-NEB		0.5ul
	10X Cut Smart Tampon	5ul	5 ul
	Saf su (Milli Q)	43.5ul	22.4 ul

Tek enzim ile kesilen vektörün ligasyon esnasında kendi üzerinde birleşmesini engellemek için CIP (calf intestinal Phosphatase) enzimi ile 5' ve 3' uçları defosforile edildi. 1 pmol uç için 1 ünite CIP kullanıldı. İşlem, 37^0C'de 1 saat 50^0C'de 30 dk sürdü. Kesim sonrası, pUC57-ODD vektörüne jel ekstraksiyonu, pTet off vektörüne pürifikasyon yapıldı.

Agaroz jel elektroforezi

Kesim sonucunu kontrol etmek ve ODD'nin pUC57'den ekstraksiyonunu yapmak için kesim ürünleri %1'lik agaroz jele yüklendi. (Bkz. Bölüm 3.3.1.4) Örnekler, yükleme boyası ile birlikte kuyucuklara yüklendi (2 µl örnek: 1 µl yükleme boyası). 100 voltta 30 dk yürütme işleminden sonra görüntüleme işlemi yapıldı (Şekil 4.4). ODD geni ve pTet off vektörü jelden pürifiye edidi (Tablo 4.4) (Protokol için bkz. Bölüm 3.3.1.4).



Şekil 4.4. pUC57 XbaI-SpeI kesimi sonrası jel ekstraksiyonu yapılacak bantlar. **1. sütun** NEB 1kb belirteç; **2. ve 3. sütun** farklı plazmit izolasyonlarından elde edilen ptet off vektörünün XbaI ile kesimi; **4.sütun** kesilmemiş ptet off vektörü kontrol amaçlı jele yüklendi; **5. sütun** kesilmemiş pUC57-ODD vektörü kontrol amaçlı yüklendi; **6.7.8. sütun** pUC57-ODD vektörünün XbaI-SpeI ile kesimi, kare içindeki bantlar pürifiye edildi. Gözlenmesi beklenen bantlar: ODD: 786bç; pUC57:2710bç; pTet off: 7400bç.

Tablo 4.4. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar.

Örnek	Konsantrasyon (ng/ul)	260/280nm dalga boyu
pTet off - XbaI- CIP	35.1	1.83
PUC57-ODD-XbaI-SpeI	18.6	1.96

Ligasyon

Ligasyon için T4 DNA Ligase (Thermo Scientific Cat #EL0016) enzimi kullanıldı (Tablo 4.5). Vektör:insert oranı 1:3 olarak hesaplama yapıldı. CIP sonrasında pTet off vektörünün defosforilasyon oranını anlamak için hedef geni koymadan sadece vektör ligasyona tabi tutuldu. Ligasyon sonrasında transformasyon BL21 kompetenti ile yapıldı. İşlem 22^0C'de 1,5 saat sürdü.

Tablo 4.5. Ligasyon aşamasında örneklerin hazırlanışı.

Konsantrasyon (ng/ul)		**1.tüp**	**2.tüp**	**3.tüp**	**4.tüp**	**5.tüp**
35.1	pTet off, XbaI,CIP	3ul	**3ul**	3ul	3ul	3ul
18.6	ODD insert XbaI,SpeI	1ul	**1.7ul**	2.5ul	3ul	-
	10X Thermo Ligaz Tampon	2ul	**2ul**	2ul	2ul	2ul
	T4 DNA Ligaz-Thermo	0.5ul	**0.5ul**	0.5ul	0.5ul	0.5ul
	Milli Q	13.5ul	**12.8ul**	12.2ul	11.5ul	13.8ul
Transf. Sonuçları (BL21)		17	**13**	15	21	7

İnkübasyon sonrasında ligasyon ürünü yöntemde geçen transfromasyon protokolüne göre BL21 bakterisine transforme edilip, 37^0C' de, 16 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan koloni sayıları Tablo 4.6'daki gibidir.

Tablo 4.6. Ligasyonda hazırlanan her bir tüpten yapılan transformasyon sonucu.

Transf. Sonuçları (BL21)	**1.tüp**	**2.tüp**	**3.tüp**	**4.tüp**	**5.tüp**
Oluşan koloni sayısı	17	13	15	21	7

Koloni PZR işlemi

Tablo 4.7'deki oranlara göre hazırlanan reaksiyon için aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1- Her bir petriden 8-12 arası koloni seçildi.

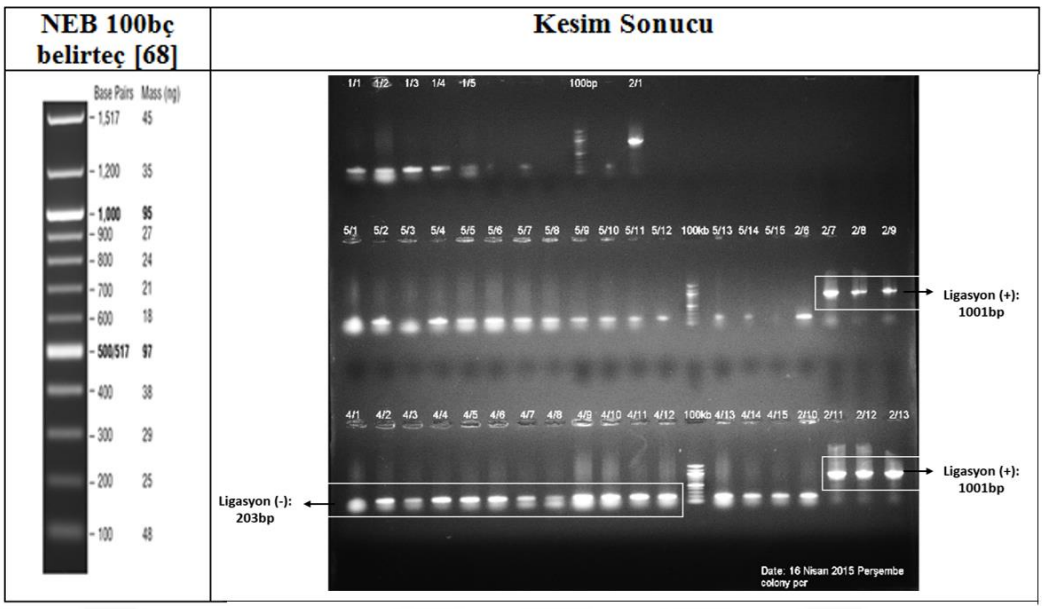
2- Seçilen koloniler Nükleazsız saf su ile karıştırıldı.

3- Örnekler 95^0C'de 5dk bekletildi.

Tablo 4.7. Koloni PZR bileşenleri.

Bileşenler	**Miktar (µl)**	**Şartlar**	
PZR Master Karışımı	5 µI	İlk denatürasyon	95^0 C
CMV ileri primer (5 pmol)	0,5 µI	Denatürasyon	95^0 C
TetR geri primer (5 pmol)	0,5 µI	Primer bağlanma	Tm = 57^0 C
Nükleazsız saf su	4 µI	Uzama	72^0 C
Toplam Hacim	10 µI	Son uzama	72^0 C
		Döngü sayısı	35

Koloni PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklendi. Alınan sonuç Şekil 4.5'deki gibidir.



Şekil 4.5. ODD-TETR-VP16 vektörünün koloni PZR sonucu. Belirtecin **(117)** olduğu sütunlar hariç tüm sütunlar transformasyon sonucu oluşan farklı koloni örnekleridir. Koloni PZR'da primerler, klonlamada kullanılan enzimlerin vektör üzerinde bulundukları yerin gerisine doğru tasarlandı. Bu sayede bu iki primerin arasına enzimlerle ODD geni yerleştirilirse 1001bç (ligasyon +), eğer klonlanamadıysa 203 bç (ligasyon -) oldu.

Pozitif olan kolonilerden sıvı kültür yapıldı ve bakteriler 16 saat inkübe edildikten sonra plazmit izolasyonu yapıldı. Koloni PZR sonucu pozitif olan plazmitlerin klonlamasının doğrulanması için 500ng DNA XbaI; BamHI ile kesildi. Aynı zamanda, ODD'nin N ucundaki klonlama yönü de tayin edilmiş oldu.

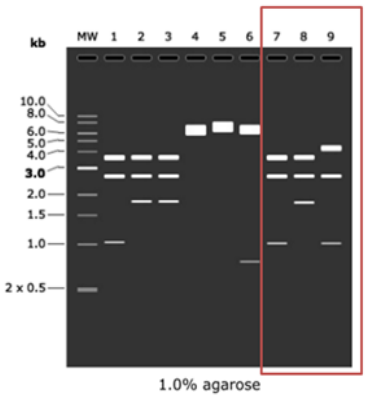
Enzim Kesimi

Tekrar kontrolün sebebi, klonlamanın başında yapılan kesimde vektör sadece XbaI enzimi ile kesildi. Bu durumda, ligasyon aşamasında şu ihtimaller oluşur;

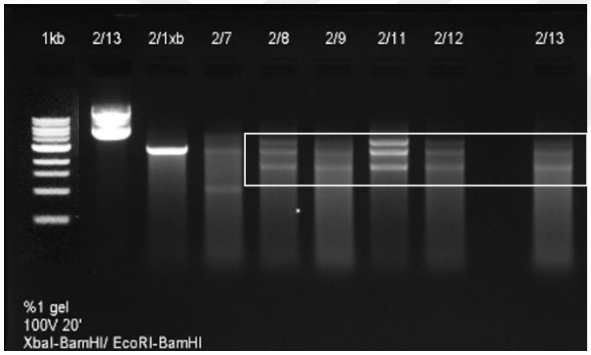
1- Vektörün iki ucu birleşebilir durumda olduğu için, içine gen almadan kendi üzerine birleşebilir (self-ligation).

2- Genin iki ucu farklı enzimlerle kesilmiş olmasına rağmen uyumlu yapışkan uçlar (compatible sticky ends) oluştuğu için gen vektörle ters ya da düz birleşebilir**.**

Bu yüzden, SnapGene programı kullanılarak pTet off, pTet off- ODD (düz) ve pTet off - ODD (ters) vektörlerini hangi enzimlerle kesersek, 3'ü için farklı kesim sonucu elde edileceğini bulmak için agaroz jel simülasyonundan yararlanıldı. (Şekil 4.6- 4.7)

Snapgene'de Yapılan Enzim Kesimi Simülasyonu	Beklenen Sonuç:
	**1,4,7. sütun** --- pTet off vekörü **2,5,8. sütun** --- pTet off-ODD (düz) **3,6,9. sütun** ---pTet off-ODD (ters) Her 3'lü grupta farklı enzim çiftleri denendi. Son grupta **XbaI, BamHI** enzim çifti ile 3 vektör arasında ayırt edilebilir bir şekil elde edilince, kesim kontrolü bu enzimlere göre yapıldı. **MW sütunu**- NEB 1kb belirteç

Şekil 4.6. SnapGene programı ile yapılan enzim kesimi simülasyonu.

Enzim Kesimi Sonucu	Gözlenen Sonuç:
	2/1,2/7,2/8,2/9,2/11,2/13 ligasyon sonrası koloni pzr sonucu pozitif olan farklı koloniler **1.sütun** NEB 1kb belirteç **2.sütun** kesilmemiş pTet-odd (kesim kontrolü için) **Diğer sütunların tamamı** farklı kolonilerden çoğaltılmış ligasyon pozitif örneklerin XbaI,BamHI enzimi ile kesimi Kutu içinde olan bantlar Şekil 4.2.4'de ki 8. sütun gibi olduğu için klonlamanın düz gerçekleştiği doğrulandı.

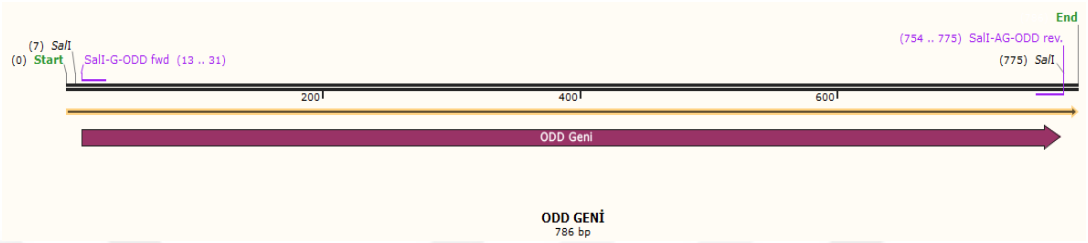
Şekil 4.7. Ligasyon sonucu pozitif çıkan örneklerin enzim kesim sonuçları.

4.2.1.2. ODD geninin TETR-VP16 Ortasına Klonlanması (TETR-ODD-VP16)

TETR-VP16 ortasına SalI enzimi ile ODD bölgesi yerleştirildi. Bunun için, GenScript'ten sipariş edilen pUC57-ODD vektöründen ODD kısmı uygun primerler ile çoğaltılıp (Tablo 4.8), SalI kesim bölgesi eklendi. Sonuç olarak, pTet off vektörü ve PZR sonucu SalI kesim bölgesi eklenen ODD geni SalI enzimi ile kesilip standart klonlama teknikleri ile TETR-ODD-VP16 vektörü oluşturuldu. Klonlama sonrası sekans PZR ile TETR-ODD-VP16 geni kontrol edildi (Şekil 4.8).

Tablo 4.8. Kullanılan primerler.

Primerler	**Dizisi (5' -- 3')**	**Ürün büyüklüğü**
SalI-G-ODD ileri	GGCGGTCGACGtcagaagatacaagtagcc	786 bç
SalI-AG-ODD geri	GGCGGTCGACtcTTCCATACGGTCTT TTGTCAC	



Şekil 4.8. SnapGene programı ile simüle edilen PZR ürünü.

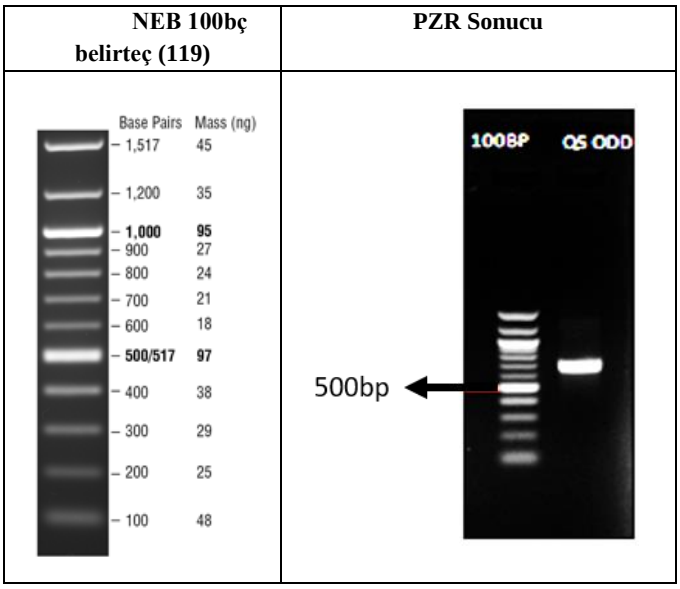
Q5 PZR

Q5 High-Fidelity 2X Master Mix (NEB marka, Kat no: M0492S) klonlama yapılacak genlerin çoğaltılmasında hassas çalıştığı için tercih edildi. Primer ile restriksiyon bölgesi (SalI) eklemeyi hedeflediğimiz için amplifikasyon esnasında tek baz hatası olması bile klonlamayı engeller (118). Karışım içindeki Taq Polimeraz, amplifikasyon hatalarını azaltmak üzere modifiye edilmiştir (118). Bu yüzden, bu aşamada Q5 karışımı tercih edildi. Kalıp DNA olarak pUC57-ODD (1ng/ul) kullanıldı (Tablo 4.9). Tm sıcaklığı primerler için 72^0C olarak hesaplandı. PZR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile 700- 800 bp arasında görüntülendi. (Şekil 4.9)

Tablo 4.9. Q5 PZR reaksiyon miktarları.

Bileşenler	**Miktar (µl)**	**Şartlar**		
Q5 High-Fidelity 2X Master Karışımı	25 µI	95^0C	30"	**35 döngü**
SalI-G-ODD ileri primer (5 pmol)	5 µI	**95^0C**	**5-10''**	
SalI-AG-ODD geri primer (5 pmol)	5 µI	**72^0C**	**10-30''**	
pUC57-ODD (1ng/ul)	15 µI	**72^0C**	**20-30'' s/kb**	
Toplam Hacim	50 µI	**72^0C**	**2 dk**	

.



Şekil 4.9. Q5 PZR sonucu çoğaltılan ODD geni (786 bp).

PZR Sonrası ODD Geninin Pürifikasyonu

PZR sonrasında ürünü pürifiye etmek için Macherey-Nagel jel pürifikasyon kiti (Kat No: 740609.50) kullanıldı. Kullanılan protokol yöntem bölümünde ayrıntılı anlatılmıştır (Bkz. Bölüm 3.3.1.4). Elde edilen pürifikasyon sonucu Tablo 4.10'daki gibidir. Kesim yapılan örneklerden tekrar protokole göre pürifikasyon yapıldı (Tablo 4.12).

Tablo 4.10. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar.

Örnek	**Konsantrasyon (ng/ul)**	**260/280 nm dalga boyu**
ODD-SalI/Q5-PZR sonrası pürifikasyon	144	1.83

Enzim Kesimi

pTet off (1000 ng) ve pürifiye edilen ODD-SalI PZR ürünü (500 ng) SalI ile kesime bırakıldı (Tablo 4.11). Kesim 37^0C'de, 1,5 saat sürdü.

Tablo 4.11. Enzim kesimi bileşenleri.

Bileşenler	**Miktar (µl)**
10x Cut Smart Tampon	2 ul
SalI-NEB	0.5 ul
pTet off (1141ng/ul)	1ul
ODD SalI - pürifiye (144ng/ul)	3.5ul
ddH_2O	Up to 20 ul

Tablo 4.12. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar.

Örnek	**Konsantrasyon (ng/ul)**	**260/280 nm dalga boyu**
ODD-SalI-kesim sonrası pürifikasyon	7.4	2.0
pTet off SalI kesim sonrası pürifikasyon	13.9	1.92

Ligasyon

Ligasyon için T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific Cat #EL0016) enzimi kullanıldı. Vektör:gen oranı 1:1 olarak hesaplama yapıldı. (Tablo 4.13) Ligasyon sonrasında transformasyon BL21 kompetenti ile yapıldı. İşlem 22 C'de 1.5 saat sürdü. Ligasyon ürünü, yöntemde anlatılan protokole göre BL21 kompetentine transformansyon yapıldı.

Tablo 4.13. Ligasyon bileşenleri.

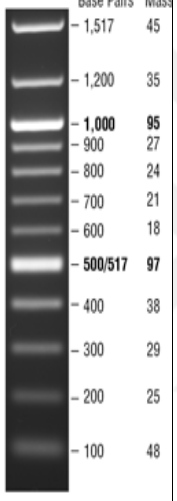
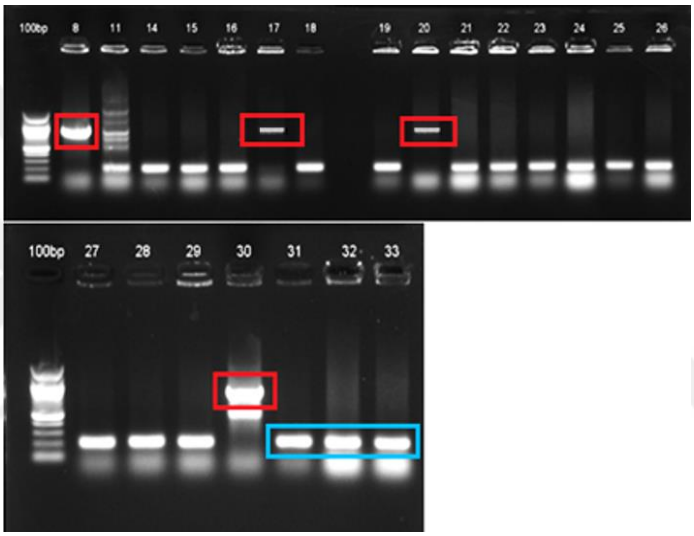
Konsantrasyon (ng/ul)	**Bileşenler**	**Miktar(ul)**
13.9	pTet off,SalI	3.6
7.4	ODD-SalI	1ul
	10X Thermo Ligaz Tampon	2ul
	Thermo T4 DNA Ligaz	1ul
	Milli Q	12.4ul
Transf. Sonuçları (BL21)		>80 koloni

Koloni PZR

Oluşan kolonilerden 33 tanesi seçilerek koloni PZR yapıldı. Kontrol için kullanılan primerler Tablo 4.14'deki gibidir. Koloni PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.10).

Tablo 4.14. Koloni PZR bileşenleri.

Bileşenler	**Miktar (µl)**	**Şartlar**	
PZR Master Mix Karışımı (Kat. No:K0171)	5 µI	İlk denatürasyon	95 ^{0}C
TETR ileri primer (5 pmol)	0,5 µI	Denatürasyon	95^{0}C
VP16 geri primer (5 pmol)	0,5 µI	Primer bağlanma	58^{0}C =Tm
Nükleazsız saf su	4 µI	Uzama	72^{0}C
Toplam Hacim	10 µI	Son uzama	72^{0}C
		Döngü sayısı	35

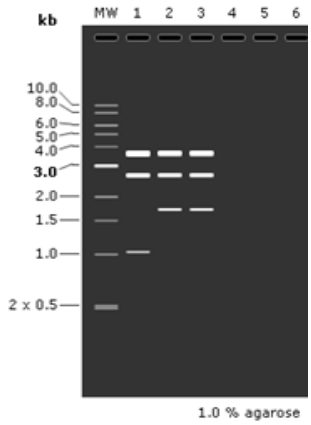
NEB 100 bç belirteç (119)	**Jel Görüntüsü**	**Sonuç**
		Pozitif ligasyon olduğu durumda beklenen bant uzunluğu = 993 bç Negatif ligasyon olduğunda = 207 bç -Belirteç harici diğer sütunlardaki örneklerin tamamı farklı kolonilerden alınmış örneklerdir.

Şekil 4.10. TETR-ODD-VP16 koloni PZR sonucu.

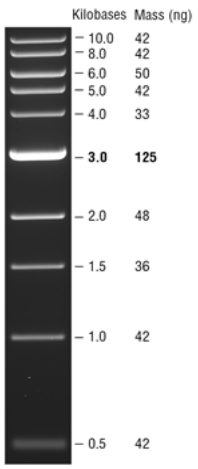
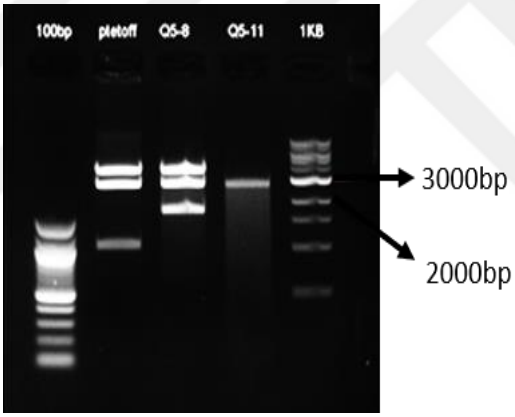
Koloni PZR sonucu pozitif çıkan kolonilerden sıvı kültür (97) ve plazmit izolasyonu (99) yapıldı. Elde edilen plazmit DNA'larla ikinci kontrol aşamasına geçildi.

Enzim Kesimi

Plazmit izolasyonu sonrası elde edilen koloni PZR'ı pozitif olan plazmitlerin klonlamasının doğrulanması için 500 ng DNA'lar EcoRI, BamHI enzim çifti ile kesildi (37^{0}C'de, 2 saat inkübe süresi). ODD geninin yönü kesim ile tayin edilemediği için (Şekil 4.11-12) klonlama pozitif olan koloniler sekanslandı (Şekil 4.13) (Bkz. Ek 2).

Snapgene'de Yapılan Enzim Kesimi Simülasyonu	Beklenen Sonuç
	**1. sütun:** pTet-off BamHI-EcoRI (E-B) kesimi **2. sütun:** ODD geninin düz klonladığı durumdaki E-B kesimi **3. sütun:** ODD geninin ters klonlandığı durumdaki E-B kesim sonucu *Simülasyonda ters ve düz klonlamayı ayırt edecek bir enzim çifti bulunamadı.

Şekil 4.11. TETR-ODD-VP16 geninin enzim kesim kontrolü simülasyonu.

NEB 1kb belirteç(117)	Enzim Kesim Sonucu	Gözlenen Sonuç:
	 (E: EcoRI, B:BamHI)	**1.sütun:** NEB 100 bç belirteç. **2.sütun:** E-B ile kesilen pTet-off vektörü **3. ve 4. sütun:** TETR-ODD-VP16 vektörünün E-B ile kesimi **5. sütun:** NEB 1kb belirteç

Şekil 4.12. TETR-ODD-VP16 enzim kesim ile klonlama kontrol sonucu.

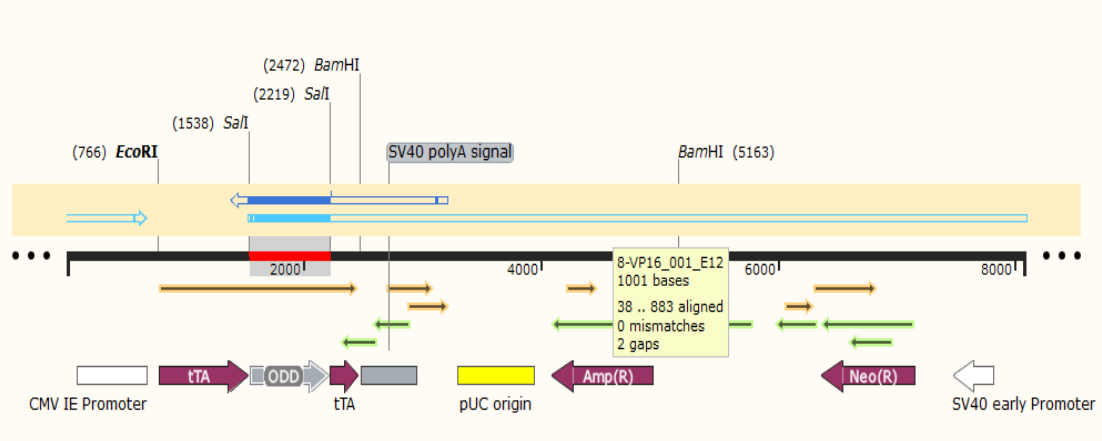
Enzim kesimi sonucu, yönü tayin edilemeyen örneklerin sekanslanması uygun görüldü.

Sekans PZR

Klonlama sonucu doğrulanan ODD-Q5_8 numaralı örnek sekanslanarak yön tayini yapıldı (Şekil 4.13). DNA 150-200 ng arasında eklendi ve Tablo 4.15'deki protokol izlendi (105). Sekans sonucu ve eğrileri EK 2'de sunulmuştur.

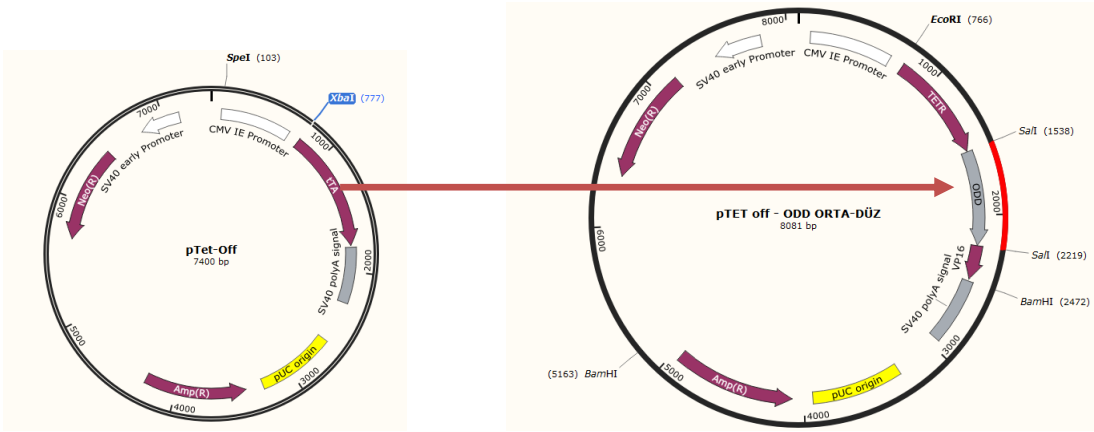
Tablo 4.15. Sekans PZR bileşenleri.

Bileşenler	**1.tüp (ul)**	**2.tüp(ul)**	**Şartlar**	
5X Tampon	2 ul	2 ul	96 ^{0}C	1 dk
VP16 geri primer (5 pmol)	-	1 ul	96 ^{0}C	15 s
TETR ileri primer (5 pmol)	1 ul	-	50 ^{0}C	15 s
Big Dye	2 ul	2 ul	60 ^{0}C	4 dk
ODD-Q5_8 Kalıp DNA (150ng)	1 ul	1 ul	4 ^{0}C	∞
Saf su	4 ul	4 ul	25	
Toplam Hacim	10 ul	10 ul		



Şekil 4.13. TETR-ODD-VP16 vektörünün sekans PZR sonucu. Sekans cihazından alınan sonucun SnapGene programında tasarlanan dizi ile karşılaştırılması.

Klonlama sonucu başarılı bir şekilde TETR-ODD ortasına yerleştirilen ODD bölgesinin pTET-ODD vektör haritası Şekil 4.14'deki gibidir.



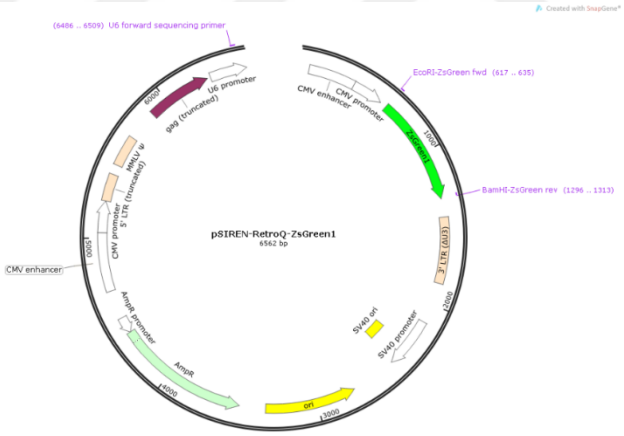
Şekil 4.14. ODD geninin TETR-VP16 arasına klonlanmış halinin haritası. Haritalar SnapGene programında hazırlanmıştır.

4.2.2. pTRE-ZsGreen Reportör Plazmitinin Oluşturulması

Reportör olarak transfeksiyonda optimizasyonu kolaylaştırmak için kullanılacak olan pTRE-ZsGreen vektörünün oluşturulması için aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı.

PZR

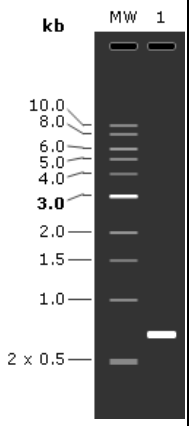
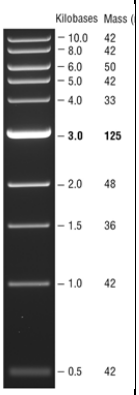
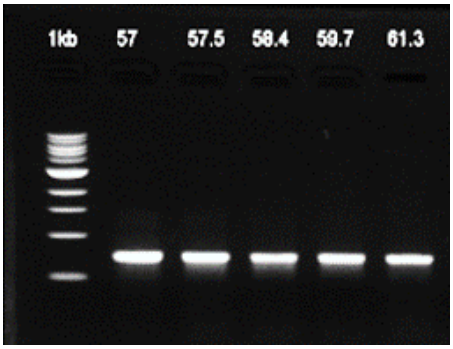
Reportör protein olarak belirlenen ZsGreen proteininin gen sekansını elde etmek için pSIREN-RetroQ-ZsGreen plazmitini (Şekil 4.15) kalıp DNA olarak kullanıldı. İstenilen bölge, plazmitten PZR yöntemiyle çoğaltıldı (Tablo 4.16). PZR işlemi sırasında, kullanılan primerlerle çoğaltılan genin 5' ucunda EcoRI, 3' ucunda ise BamHI enzimlerine ait restriksiyon kesim bölgeleri olacak şekilde dizayn edildi. Bu sayede, çoğaltılan gen pTRE plazmiti içerisinde uygun bölgeye kolaylıkla klonlanabildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. pSIREN-RetroQ-ZsGreen plazmit haritası. PZR ile klonlama için EcoRI ve BamHI kesim bölgeleri eklenen ZsGreen proteininin çoğaltıldığı primerler harita üzerinde gösterilmiştir. Haritalar SnapGene programında hazırlanmıştır.

Tablo 4.16. PZR Bileşenleri.

Bileşenler	**Miktar (µl)**	**Şartlar**	
PZR Master Karışımı (Thermo Cat no: K0741)	5 µI	İlk denatürasyon	95 ^{0}C
PSIREN- ZsGreen Kalıp DNA (5 ng/ul)	1 µI	Denatürasyon	95^{0}C
EcoRI-ZsGreen ileri primer (5 pmol)	0,5 µI	Primer bağlanma	57 - 63.5^{0}C
BamHI-ZsGreen geri primer (5 pmol)	0,5 µI	Uzama	72^{0}C
Nükleazsız saf su	3 µI	Son uzama	72^{0}C
Toplam Hacim	10 µI	Döngü	35

Beklenen	NEB 1kb belirteç (117)	Gözlenen	Açıklama
		 Amplifiye edilen EcoRI-ZsGreen-BamHI bandı: 716 bç	**1.sütun:** NEB 1kb belirteç **Diğer sütunların tamamında** aynı kalıp DNA farklı bağlanma sıcaklıklarında PZR yapıldı. Burdaki tüm bantlar ekstraksiyon için jelden pürifiye edildi.

Şekil 4.16. ZsGreen geninin PZR sonucu.

Jel Ekstraksiyonu

Yapılan PZR neticesinde doğru yerde olduğu görülen bantlar jelden alındı ve bu kısımlardaki DNA parçaları gel ekstraksiyonu yöntemi ile izole edildi (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar.

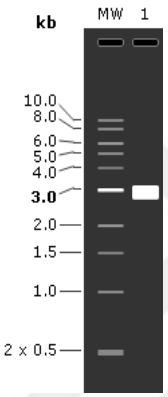
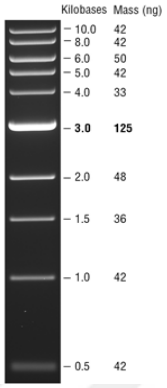
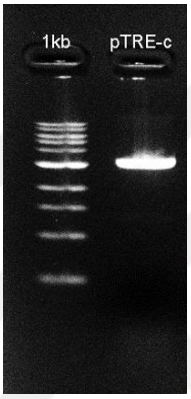
Örnek	Konsant(ng/ul)	260/280 nm
EcoRI- ZsGreen- BamHI	33.9	1.82

Enzim Kesimi

pTRE plazmiti ve jel ekstraksiyonu neticesinde elde edilen ZsGreen geni, XhoI ve BamHI enzimleri ile kesildi (Tablo 4.18). 37^0C'de, 2 saat su banyosunda kesim yapıldı. 2 saat inkübasyonun ardından örnekler %1'lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez yapıldı (Şekil 4.17).

Tablo 4.18. Enzim kesim bileşenleri.

Konsant. (ug/ul)		**1.tüp**	**2.tüp**
2.1	pTRE	1ul	
0.033	EcoRI- ZsGreen- BamHI (klonlanacak gen)		17 ul
20 ünite/ml	EcoRI- Neb	0.5ul	0.5ul
20 ü/ml	BamHI - Neb	0.5ul	0.5ul
	10X Cut Smart Tampon	2ul	2ul
	Nükleazsız su	16ul	-

Beklenen	**NEB 1kb belirteç (117)**	**Gözlenen**	**Açıklama**
			**1.sütun:** 1kb NEB belirteç **2. sütun:** pTRE vektörünün EcoRI,BamHI enzim çifti ile kesilmiş hali * EcoRI-ZsGreen-BamHI PZR ürününün doğruluğu Şekil 4.17 gösterildi. Kesim sonucu ekstraksiyon gerekmeyeceği için jele yüklenmedi ve sadece enzimden uzaklaştırmak için Macherey Nagel pürifikasyon kiti ile pürifiye edildi.

Şekil 4.17. pTRE vektörünün enzim kesim sonucu.

Jel ekstraksiyonu ve pürifikasyon

Yapılan restriksiyon kesimi neticesinde doğru yerde olduğu görülen bantlar jelden alındı ve bu kısımlardaki DNA parçaları gel ekstraksiyonu yöntemi ile izole edildi. ZsGreen geninin, restriksiyon enzimlerinden ayırılması için pürifiye edildi (102) (Tablo 4.19).

Tablo 4.19. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar.

Örnek	**Konsant.(ng/ul)**	**260/280 nm dalga boyu**
EcoRI- ZsGreen- BamHI (kesilen)	12.1	1.88
pTRE vektörü (kesilen)	28.9	1.84

Ligasyon

Ligasyon için T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific Cat #EL0016) enzimi kullanıldı. Vektör/gen oranı 1:1 olarak hesaplandı. (Tablo 4.20) Ligasyon sonrasında transformasyon BL21 kompetent bakterisi ile yapıldı. İşlem 22^0C'de, 1.5 saat sürdü.

Tablo 4.20. Ligasyon bileşenleri.

Konsant.(ng/ul)		**Miktar(ul)**
12.1	EcoRI- ZsGreen- BamHI (kesilen)	1ul
28.9	pTRE vektörü (kesilen)	1ul
	10X Thermo Ligaz Tampon	2ul
	T4 DNA Ligaz- Thermo	0.5ul
	Milli Q	15.5ul

Koloni PZR

Tablo 4.21'deki oranlara göre hazırlanan reaksiyon için aşağıdaki aşamalardan geçildi.

1- Her bir petriden 8-12 arası koloni seçildi.

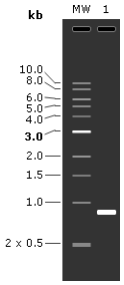
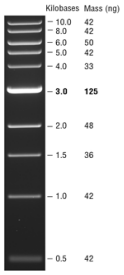
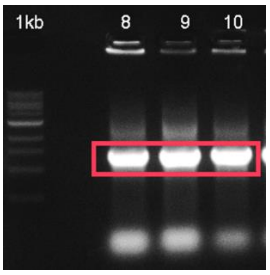
2- Seçilen koloniler Nükleazsız saf su ile karıştırıldı.

3- Örnekler 95^0C'de, 5 dk inkübe edilidi.

Tablo 4.21. Koloni PZR bileşenleri.

Bileşenler	**Miktar (µl)**
PZR Master Karışımı (Thermo Kat no:K0741)	5
CMV ileri primer (5 pmol)	0,5
SV40 PolyA geri primer (5 pmol)	0,5
Nükleazsız saf su	4
Toplam Hacim	10

PZR şartları daha önceki koloni PZR'lar ile aynıdır. Kullanılan primerler için Tm = 60^0C'dir. Koloni PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklendi (Şekil 4.18).

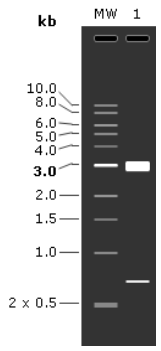
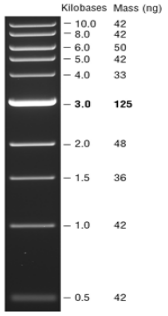
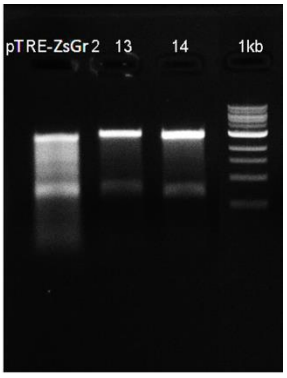
Beklenen	NEB 1kb belirteç (117)	Gözlenen
		

Şekil 4.18. pTRE-ZsGreen vektörünün koloni PZR sonucu.

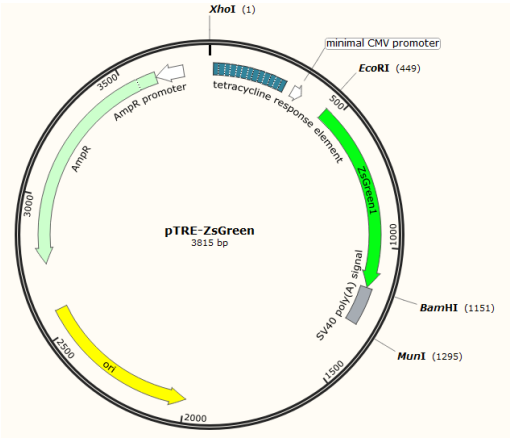
Şekil 4.18'de kare içine alınan bantlar, koloni PZR sonucu pozitif olanlardır. Bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapılıp enzim kesimi ile doğrulandı.

Enzim Kesimi

Plazmit izolasyonu yapılan koloni PZR'ı pozitif olan plazmitlerin klonlamasının doğrulanması için 500 ng DNA BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim sonucunda doğruluğu gösterilen (Şekil 4.19) pTRE-ZsGreen vektörü Şekil 4.20'de görüldüğü şekilde klonlandı.

Beklenen	NEB 1kb belirteç	Gözlenen	Açıklama:
			**1., 2. ve 3.sütun:**pTRE-ZsGreen Vektörünün EcoRI, BamHI ile kesimi (beklenen bant uzunlukları: 3113bç,702bç.) **4. sütun:** NEB 1kb belirteç * 3 örneğin klonlama sonucu koloni PZR ve enzim kesimi ile doğrulandı.

Şekil 4.19. Koloni PZR sonucu pozitif çıkan koloniler enzim kesim sonucu.



Şekil 4.20. Klonlanan pTRE-ZsGreen plazmitinin haritası. Haritalar SnapGene programında hazırlanmıştır.

4.2.3. pTRE-tPA Vektörünün Klonlanması

pUC57-tPA geni satın alındıktan sonra transforme edilip, kültür edildi ve plazmitler klonlama işlemi için izole edildi. pTRE vektörü ve doku plazminojen aktivatörü genini içeren taşıyıcı vektör (pUC57) EcorI;BamHI enzimi ile kesildi.

Enzim Kesimi ve Pürifikasyon

Yaklaşık 5000 ng olacak şekilde pTRE vektörü ve vektörle birleştirilecek hedef gen yaklaşık 1500 ng olacak şekilde EcoRI;BamHI ile 37^0C'de, 2 saat kesildi (Tablo 4.22). Kesim sonrası bantlar agaroz jelden pürifiye edildi (Tablo 4.23).

Tablo 4.22. Enzim kesim bileşenleri.

Konsnt.		**1.tüp(ul)**	**2.tüp(ul)**
1.5 ug	pTRE	3.7ul	-
750 ng	pUC57-tPA		2ul
	EcoRII-NEB	0.5ul	0.5ul
	BamHI-NEB	0.5ul	0.5ul
	EcoRI- NEB		
	10X Cut Smart Tampon	5ul	5ul
	Milli Q	10.3	12

Tablo 4.23. Pürifikasyon sonrası konsantrasyonlar.

Örnek	Konsant.(ng/ul)	260/280nm dalga boyu
pTRE (kesilen)	31.1	1.81
tPA (kesilen)	14.3	1.88

Ligasyon

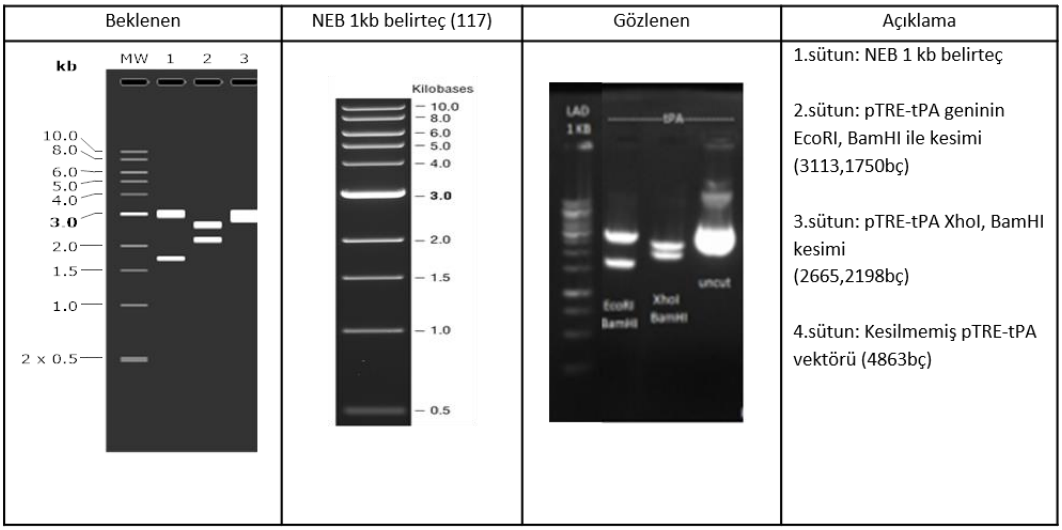
Ligasyon için T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific, Kat no: #EL0016) enzimi kullanıldı. Vektör:gen oranı 1:1 olarak hesaplama yapıldı. (Tablo 4.24) Ligasyon sonrasında transformasyon BL21 kompetent bakterisi ile yapıldı. İşlem 22^0C'de 1.5 saat sürdü.

Tablo 4.24. Ligasyon bileşenleri.

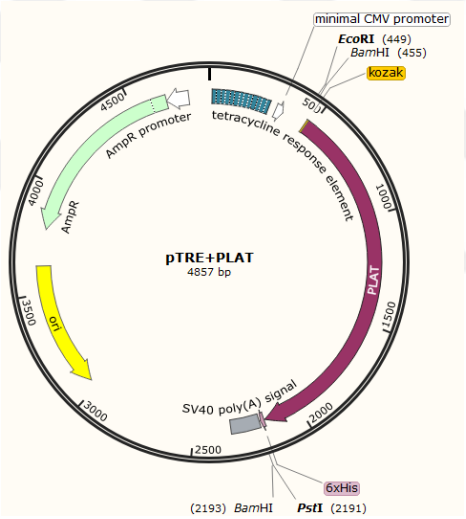
Bileşenler	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp
pTRE (kesilen)	1.5ul	1.5ul	1.5ul	1.5ul
tPA(kesilen)			1ul	
10X Thermo Ligaz Tampon	2ul	2ul	2ul	2ul
Thermo T4 DNA Ligaz	0.5ul	0.5ul	0.5ul	0.5ul
Milli Q	15ul	15ul	15ul	15ul

İnkübasyon sonrası elde edilen ligasyon ürünü yöntemde belirtilen transformasyon protokolüne göre BL21 bakterisi kullanılarak yapıldı. Oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra klonlamanın kontrolü için enzim kesimi yapıldı.

Klonlama sonucu, pTRE + tPA geninin EcoRI;BamHI ve XhoI;BamHI enzimleri ile kesiminden beklenen ve gözlenen sonuçlar Şekil 4.21'deki gibidir.



Şekil 4.21. Klonlanan pTRE-tPA vektörünün enzim kesimi ile kontrolü.



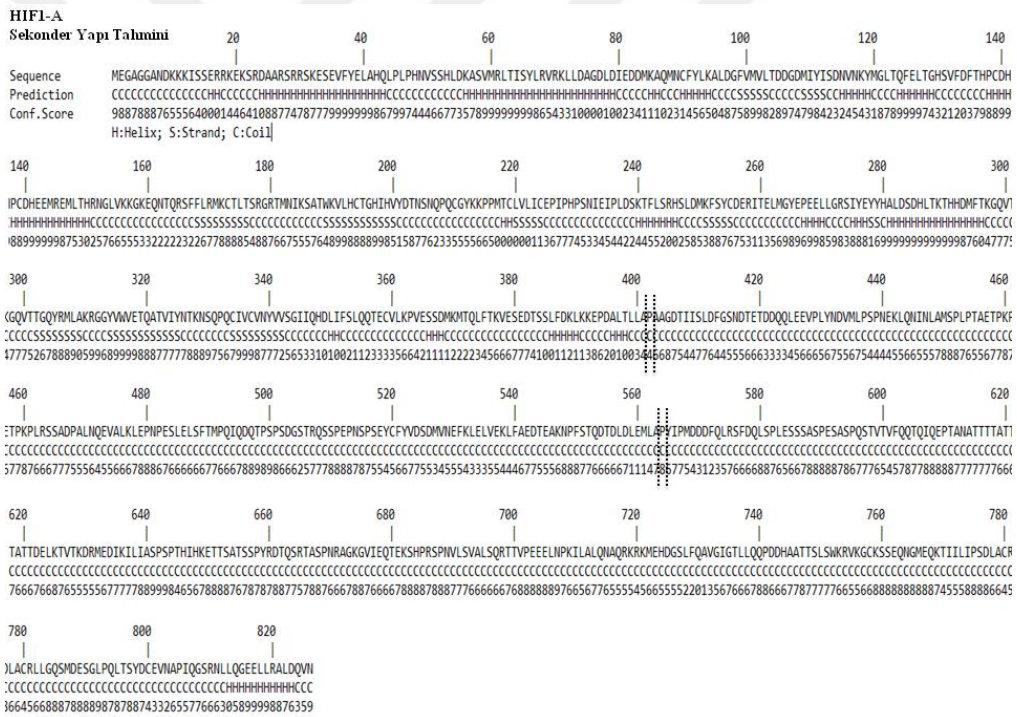
Şekil 4.22. Klonlanan pTRE-tPA plazmitinin haritası. Vektörün haritası SnapGene programında hazırlanmıştır.

4.3. I-TASSER Sunucusundan Gelen Protein Yapı Tahmini Sonuçları

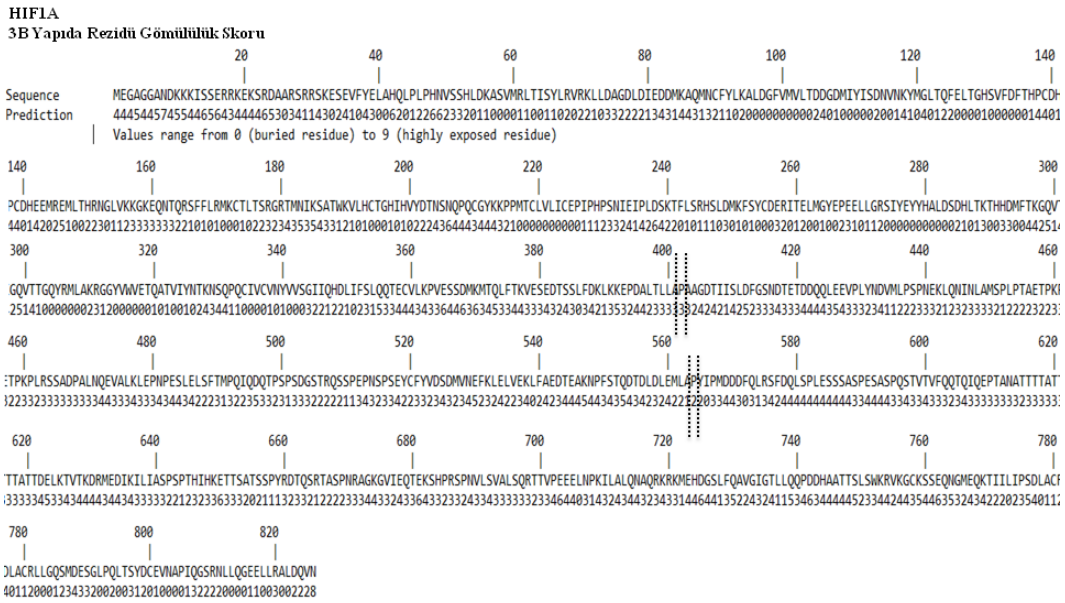
ODD bölgesi, 4082 bç uzunluğundaki HIF1A geni üzerinde 1065..2213 bazları arasına denk gelir. Ayrıca, prolil hidroksilaz enziminin hidroksillediği aminoasitler HIF1A üzerindeki 402 ve 564. prolin rezidüleridir (11, 21). Daha önce yapılan çalışmalarda, bu iki prolin rezidüsünün çıkarıldığı mutant HIF1A dizilerinde hidroksillenmenin 564. proline bağlı olarak seyrettiği görülmüştür. 564. aminoasit çıkarıldığında hidroksillenmenin durduğu, 402. aminoasit çıkarıldığında ise sadece

reaksiyonun yavaşladığı bulunmuştur (21). Bu durumdan dolayı, ODD bölgesi üzerinde 185. proline denk gelen (HIF1A üzerinde 564.prolin) bu aminoasidin yeni bir proteinle hibrit hale getirdiğimizde 3 boyutlu yapı içerisinde benzer lokasyonda bulunması tasarımımıza aynı hidroksillenme kabiliyetini kazandırabileceğini düşündürdü. Bu kıyasın yapılabilmesi için HIF1A, ODD-TETR-VP16, TETR-ODD-VP16 ve literatürde ODD ile oluşturulan başka bir hibrit protein olan GAL4-ODD-p65'in 402. ve 564. prolin rezidülerinin lokasyon ve enzim maruziyet skorları I-TASSER protein yapı modellemesinden elde edildi.

Yapılan modellemeye göre HIF1A'nın 402. ve 564. prolin rezidüleri ilmek yapısı üzerinde bulunmaktadır. Üç boyutlu yapı içerisinde prolinlerin maruziyet değerleri 402.P =3, 564.P=2'dir (Şekil 4.23- 4.24).

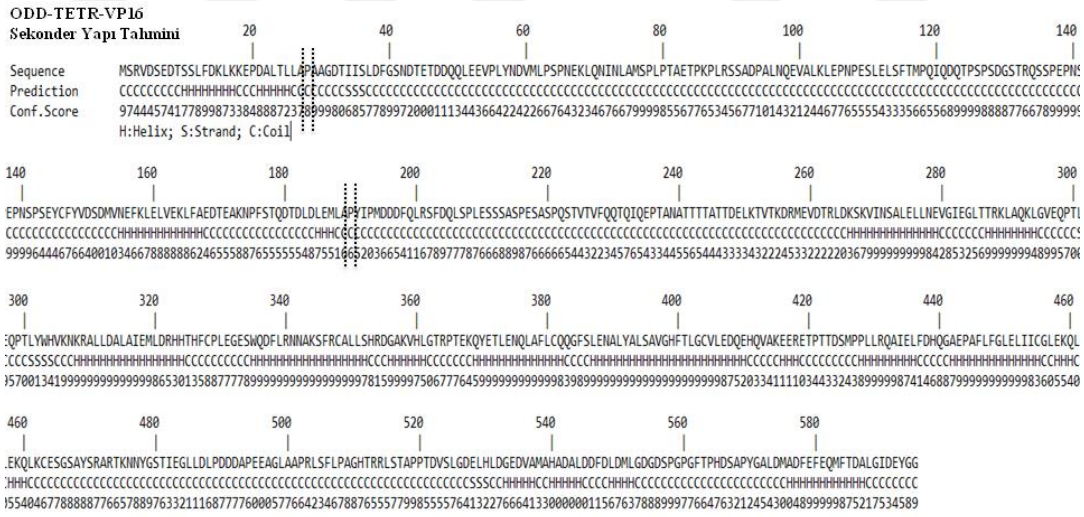


Şekil 4.23. HIF1A'nın sekonder yapı tahmin sonucu.

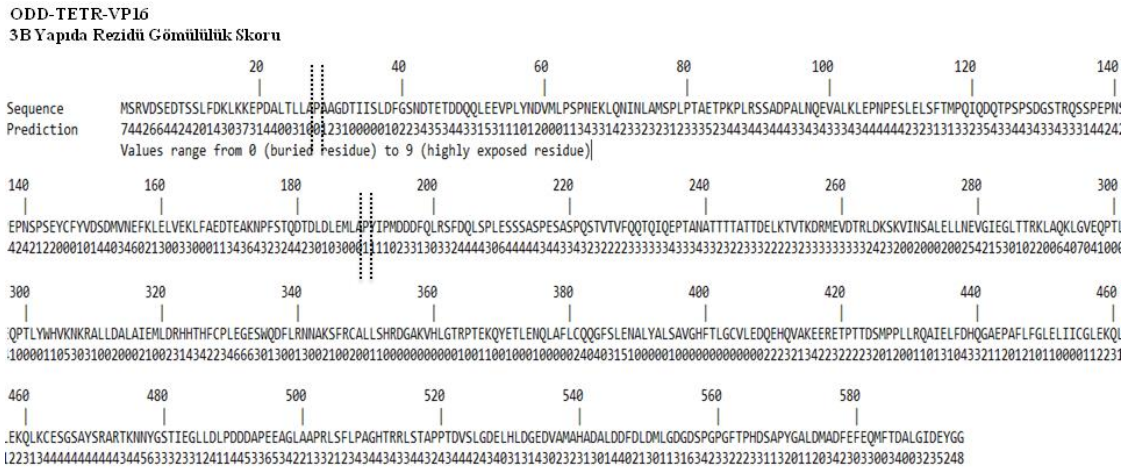


Şekil 4.24. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri.

Yapılan modellemeye göre ODD-TETR-VP16'nın 28. ve 190. prolin rezidüleri ilmek yapısı üzerinde bulunmaktadır. Üç boyutlu yapı içerisinde prolinlerin maruziyet değerleri 28.P =0, 190.P=1'dir (Şekil 4.25- 4.26).

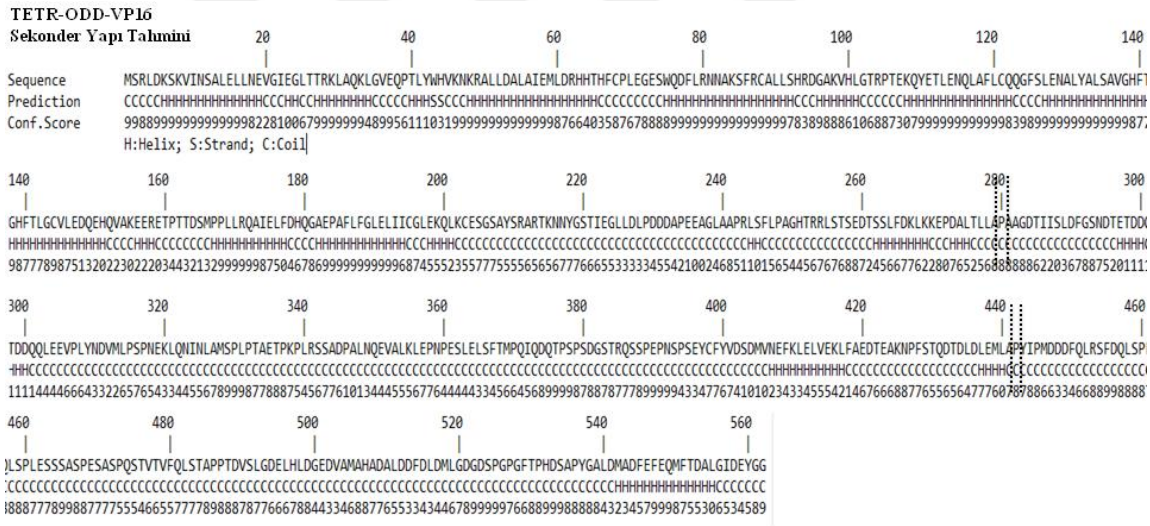


Şekil 4.25. ODD-TETR-VP16'nın sekonder yapı tahmin sonucu.



Şekil 4.26. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri.

Yapılan modellemeye göre TETR- ODD-VP16'nın 280. ve 442. prolin rezidüleri ilmek yapısı üzerinde bulunmaktadır. Üç boyutlu yapı içerisinde prolinlerin maruziyet değerleri 280.P =2, 442.P=0'dır (Şekil 4.27-4.28).

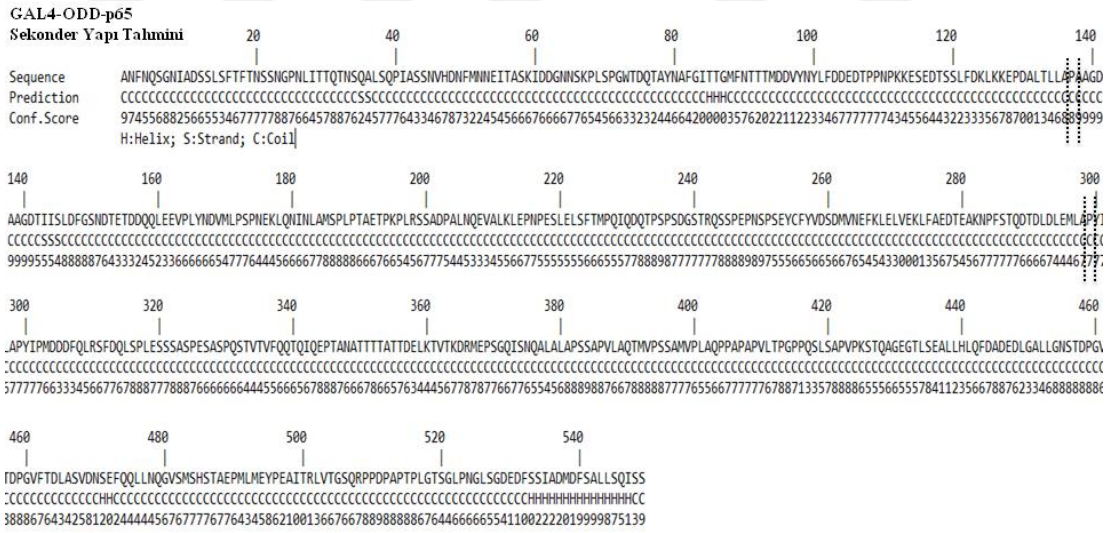


Şekil 4.27. TETR-ODD-VP16'nın sekonder yapı tahmin sonucu.

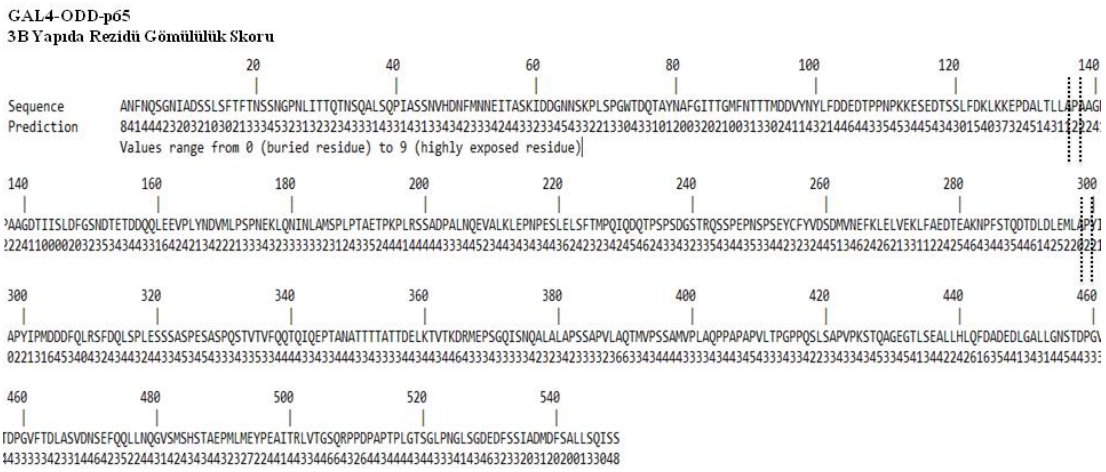


Şekil 4.28. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri.

Yapılan modellemeye göre, daha önce Michigan Üniversitesi, Tıp fakültesinde üzerinde çalışılmış olan GAL4-ODD-p65 TF"ü HIF1A'nın doğal haline daha yakın sonuçlar vermiştir. Alınan sonuçlara göre, 137. ve 299. prolin rezidüleri ilmek yapısı üzerinde bulunmaktadır. Üç boyutlu yapı içerisinde prolinlerin maruziyet değerleri 137.P =2, 299.P=2'dir (Şekil 4.29- 4.30).



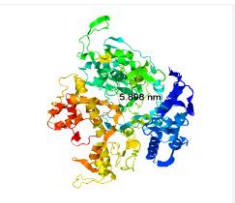
Şekil 4.29. GAL4-ODD-p65'in sekonder yapı tahmin sonucu.



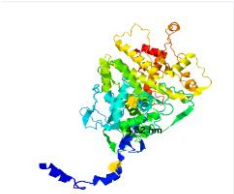
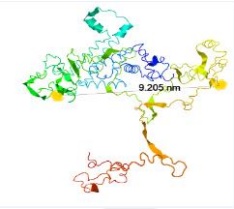
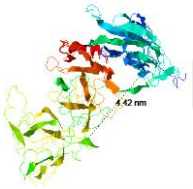
Şekil 4.30. Üç boyutlu yapı içerisinde aminoasitlerin maruziyet değerleri.

I-TASSER'den alınan bilgilere göre, ODD bölgesi üzerindeki hidroksillenen iki prolin rezidüsü, tüm hesaplanan sekanslarda lokasyon olarak alfa sarmalı üzerinde olduğu görüldü. Hidroksillenmenin 564.prolin üzerinden seyrettiği göz önünde bulundurulduğunda, tasarımların hipoksiyi algılama sıralaması HIF1α > ODD-TETR-VP16 > TETR-ODD-VP16 şeklinde oldu (Tablo 4.25). Alınan bu sonucun yapılan moleküler deneylerle de korelasyon göstermesi beklenmektedir. Korelasyon gösterdiği takdirde ODD bölgesi kullanılarak hipoksiye duyarlılık kazandırılmak istenen herhangi bir hibrit proteinin hidroksillenmesi hakkında deney yapmadan önce nasıl tahmini veriler elde edilebileceği ile ilgili yapılan ön modelleme sonucu doğru olacaktır.

Tablo 4.25. I-TASSER'den elde edilen sonuçlar. Rezidünün yapı içerisinde gömülülük değer aralığı 0: gömülü rezidü, 9: enzim-çözücü maruziyetin maksimum olduğunu gösterir.

Örnekler	Rezidü No	Lokasyon yeri ve Skoru	Rezidünün Yapı İçerisinde Gömülülük Skoru
HIF1A 	**402.Prolin**	**İlmek (coil or loop) - 4**	**3**
	564. Prolin	**İlmek (coil or loop) - 8**	**2**

Tablo 4.25. I-TASSER'den elde edilen sonuçlar (devam).

Örnekler	Rezidü No	Lokasyon yeri ve Skoru	Rezidünün Yapı İçerisinde Gömülülük Skoru
ODD-TETR-VP16 	**28. Prolin**	**İlmek (coil or loop) - 8**	**0**
	190.Prolin	**İlmek (coil or loop) - 6**	**1**
TETR-ODD-VP16 	**280.Prolin**	**İlmek (coil or loop) - 8**	**2**
	442.Prolin	**İlmek (coil or loop) - 8**	**0**
GAL4-ODD-P65 	**-**	**-**	**-**
	185.Prolin	**İlmek (coil or loop) - 8**	**3**

I-TASSER en sık kullanılan ve güvenirliliği yüksek bir sunucu olsa da skorları kıyaslamak için Danimarka Teknik Üniversitesine ait olan başka bir protein yapı tahmini sunucusunda (81) tüm sekanslar tekrar hesaplatılıp karşılaştırıldı. Tablo 4.26'da görüldüğü üzere I TASSER sonuçları ile benzer sonuçlar elde edildi. Verilere göre tasarımların hidroksillenme sırası HIF1α>ODD-TETR-VP16>TETR-ODD-VP16'dır ve aralarında yaklaşık 2 kat fark vardır.

Tablo 4.26. NetSurfP sunucusundan alınan sonuçlar.

NetSurfP	Amino Asit No:	Relatif Yüzeye Ulaşma skoru:	Mutlak Yüzeye Ulaşma Skoru:	Alfa Sarmalda Bulunma İhtimali
HIF1A	402 - P	0.422	59.924	0.649
	564 - P	0.333	47.224	0.935
ODD-TETR- VP16	28 - P	0.281	39.931	0.803
	190 - P	0.155	22.065	0.864
TETR-ODD-VP16	280 - P	0.261	37.093	0.925
	442 - P	0.139	19.667	0.864

4.4. Florometrik Ölçüm Sonuçları

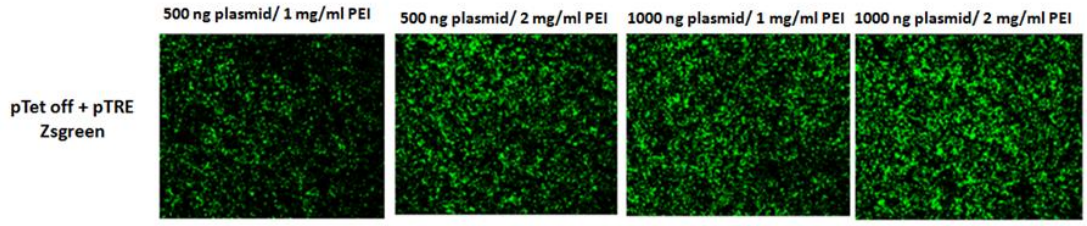
Tasarlanan genler içerisinde pTRE-ZsGreen vektörü, gen sisteminin 2. plazmitidir. pTet off geninden üretilen ve 2 formda tasarlanan ODD bağımlı transkripsiyon faktörünün hipoksiye cevabı üretilen ZsGreen proteini (floresan protein) ile belirlenmiştir.

4.4.1. Transfeksiyon Optimizasyonu

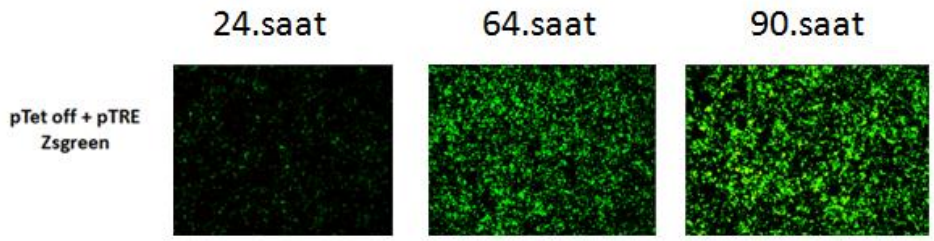
Hedef genlerin transfeksiyonundan önce, transfeksiyon ajanı olarak kullanılan polietilenaminin (PEI) optimizasyonu yapıldı. Bu aşamanın varlığının nedeni, başarılı bir transfeksiyon veriminin elde edilebilmesidir. Kullanılan plazmit DNA'nın moleküler ağırlığına göre içerisindeki fosfat (P) molekülü miktarı değişir. PEI içerisindeki azot molekülü (N) fosfat ile birleşir ve plazmit DNA'yı sararak hücre içine transferini sağlar (109). Bu yüzden deneme yaparak genlerin transferi için gerekli optimum PEI miktarı bulundu (Şekil 4.31) (Tablo 4.27). Transfeksiyon protokolü ve PEI hesaplama yolu yöntemde (Bkz. Bölüm 3.3.1.7) anlatıldığı şekilde yapıldı. Yapılan optimizasyonda kuyu başına 6'lık tabakta (well plate) 0.5 pmol DNA ve 72 saat inkübe süresi belirlendi (Şekil 4.32).

Tablo 4.27. Transfeksiyon bileşen oranları.

Vektör	DNA uzunluğu	DNA konsant.	Optimem	PEI
ptet off	7400bp	1141 ng/ul --> 2ul	300 ul	6.2 ul
pTRE-ZsGreen	3815bp	573.7 ng/ul -->2ul	300 ul	3.2ul



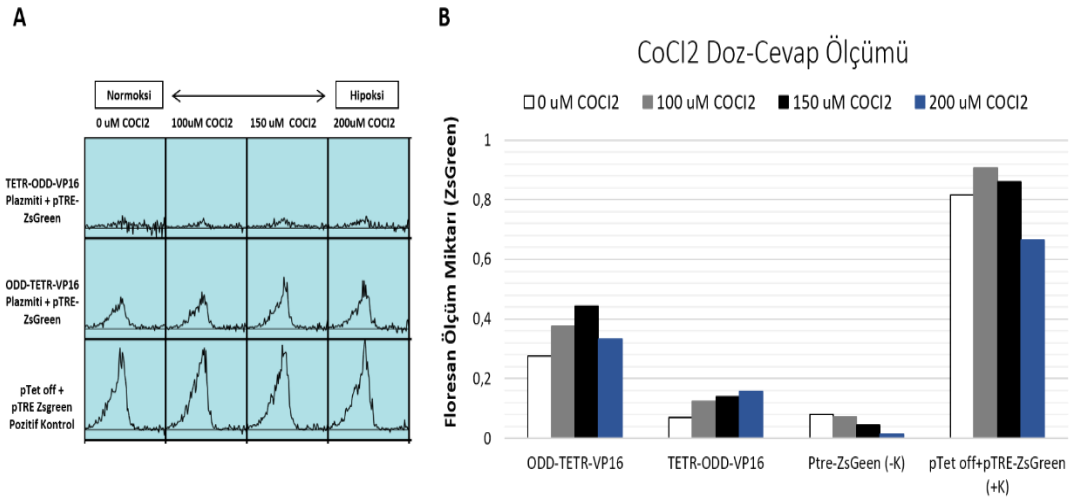
Şekil 4.31. Optimum transfeksiyon için DNA / PEI miktarı optimizasyonu. Her bir oran için transfeksiyon sonrasındaki 1.,2. ve 3. günlerde floresan görüntüler incelenmiştir. Görüntüler yaklaşık 72.saate aittir.



Şekil 4.32. Transfeksiyonda süre optimizasyonu. Transfeksiyon sonrası optimum protein ekspresyonu elde etmek için gerekli kültür süresi belirlenmiştir.

4.4.2. Hipoksi Mimik Ortam Karakterizasyonu

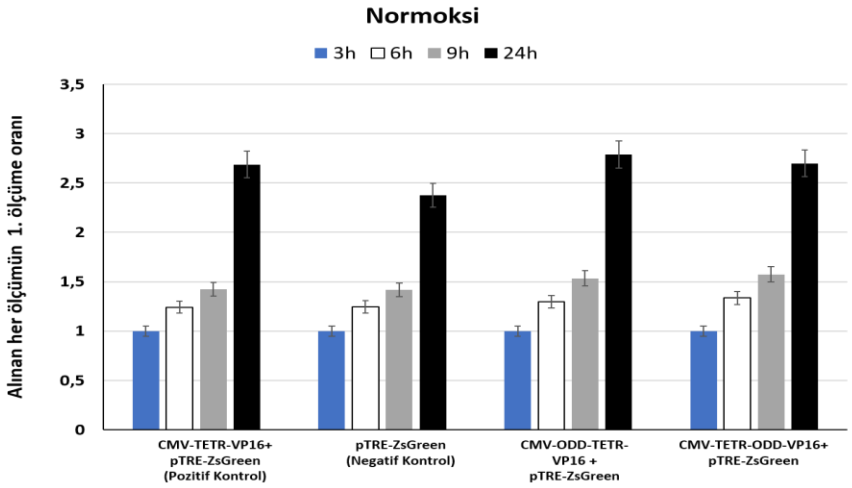
Hücrelerin kültür edildiği medyuma son konsantrasyon 100 uM olacak şekilde $CoCI_2.5H_2O$ eklenerek hipoksi oluşturulabileceği literatürde mevcuttur (113). Çalışmada kullanılacak olan HEK293T hücre hattının optimizasyon için 100, 150 ve 200 uM kobalt klorür konsantrasyonları denendi. 6 saatlik hipoksi maruziyeti sonrası üretilen floresan protein miktarı ölçülerek, optimum kobalt klorür konsantrasyonu 150 uM olarak belirlendi. (Şekil 4.33)



Şekil 4.33. Hipoksi doz-cevap analizi sonuçları. **A)** Temsili 12'lik tabak (well plate) görüntüsüdür. Her kare bir kuyuyu, yukardan aşağı her üçlü sütun bir kobalt klorür konsantrasyonunu, her 4'lü satır sol yanda yazılı olan genlerin transfekte edildiği deney grubudur. **B)** 496 nm dalga boyunda her bir kuyudan alınan florometrik ölçüme göre çizilen doz cevap ölçüm grafiğidir.

4.4.3. Zamana Bağlı Floresan Protein Ekspresyonu Ölçümü

Bu deneyin yapılma amacı hipoksi olmadığı durumda sistemden olan kaçak miktarının zamana bağlı olarak artışını izleyerek, yalancı pozitif sonuç olma ihtimalini kontrol etmektir. Bu yüzden, transfeksiyon yapıldıktan sonra 24 saat boyunca, aralıklı yapılan ölçümler ile sistem kaçağı ölçüldü. Her deney grubunun başlangıç ve bitiş saatleri arasındaki artış yaklaşık 2,5 kat olarak belirlendi (Şekil 4.34). Bu sayede, sistemin kaçağının hipoksi testleri esnasında yalancı pozitif sonuca neden olmayacağı anlaşıldı.



Şekil 4.34. Zamana bağımlı floresan protein ekspresyon ölçüm grafiği. Ölçümler, transfeksiyon sonrası 72 saatlik kültür süresinin ardından başlatılmıştır.

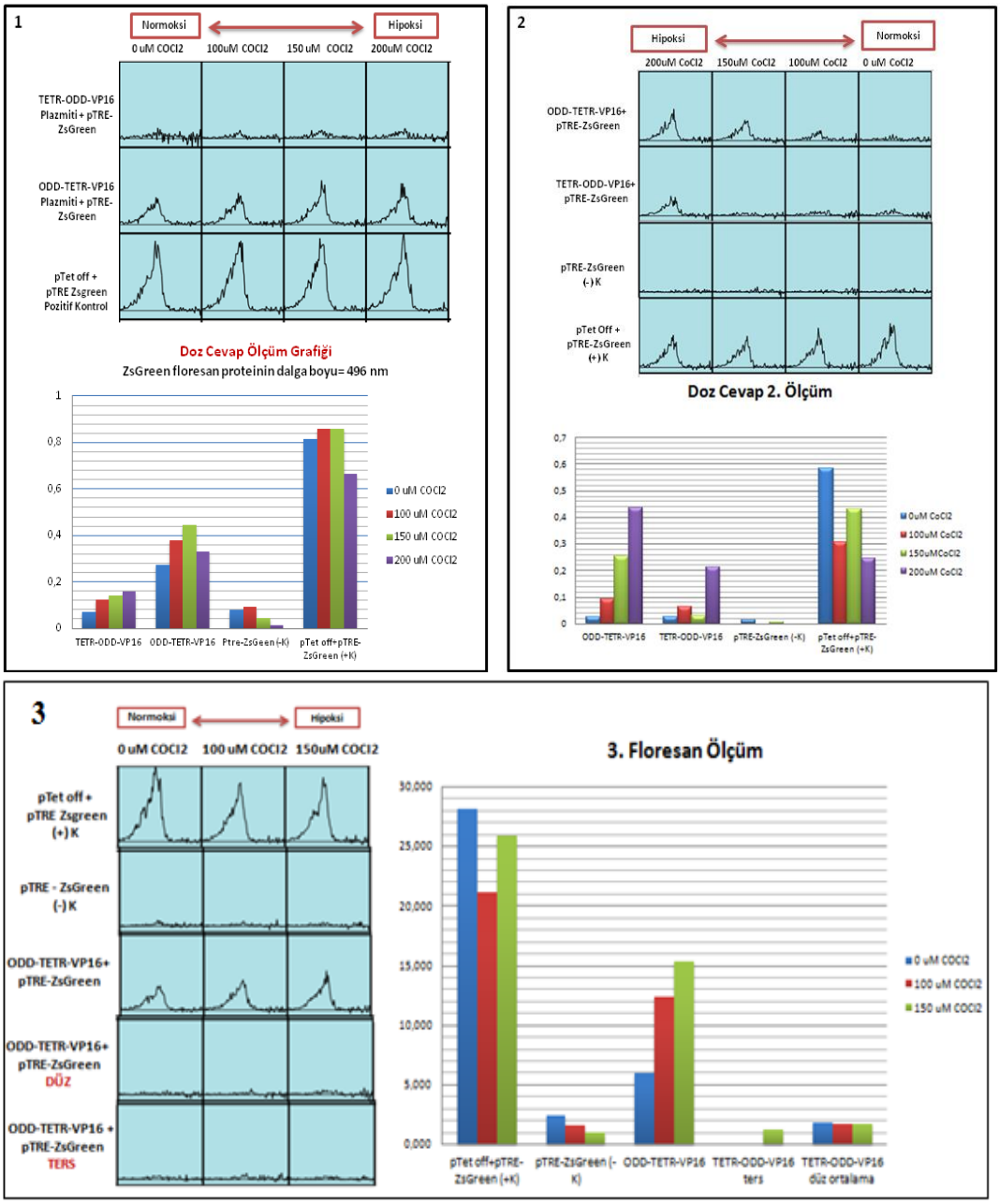
4.4.4. Sistemin Güvenirliliğinin Belirlenmesi için Yapılan Tekrar Deneyleri

Transfeksiyon ve hipoksi maruziyeti deneyleri tekrarlanarak alınan 3 ayrı ölçüm sonucu Şekil 4.4.5'deki gibidir**.** Tasarlanan gen sisteminin hipoksiye verdiği cevap ZsGreen floresan proteini ile belirlendi. ZsGreen proteini floresan bir protein olduğundan reportör analiz için uygun dalga boylarında spektrofotometrik tarama yapıldı. Hücrelerin ekili olduğu kuyu içinde tek bir noktanın ölçümü değil tarama (scanning) protokolü uygulandı, bu sayede tüm kuyu taranarak ve ortalaması alınarak sistem ile ilgili daha kesin ölçümler elde edildi.

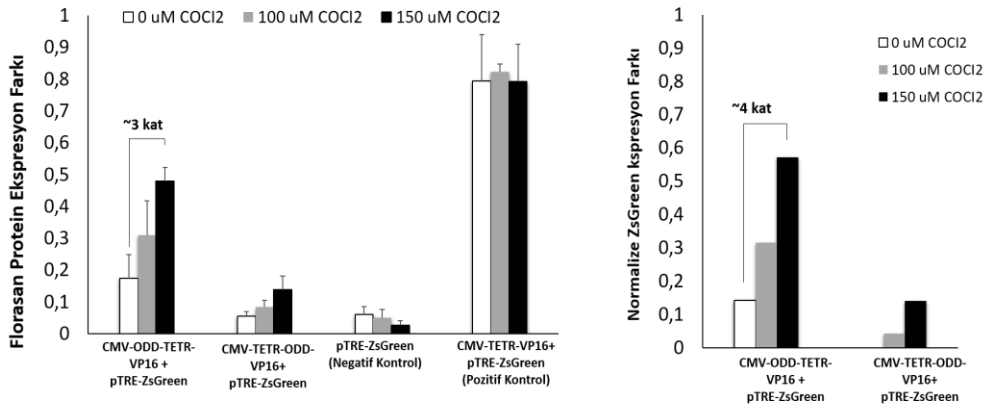
Sistemimizden alınan her ölçümde ODD-TETR-VP16 vektör sisteminde kontrol grubuna göre 2 ila 8 kat arası artış izlendi. Yapılan 3 ölçümün ortalama grafiğinde pozitif ve negatif kontrol gruplarında hipokside dikkate alınır bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.35). TETR-ODD-VP16 sisteminden hipokside cevap alınamazken, ODD-TETR-VP16 sisteminden 3 kat farkla normoksiden fazla protein eksprese ettiği izlendi (Şekil 4.36).

Yapılan ölçümleri normalize etmek için (-) kontrolden alınan ölçüm, tüm değerlerden çıkarılıp, (+) kontrol değerine bölündü. Bu şekilde sistem kaçağı ölçüm değerlerinden çıkarılmış oldu. Normalize grafikte, hipokside ODD-TETR-VP16 sisteminden kontrole göre 4 kat fazla ekspresyonu olduğu gözlendi (Şekil 4.36).

Florometrik ölçümde proteinin varlığı yokluğu şeklinde bir kontrol vardır. Lusiferaz analizi gibi enzimatik testlerde ise alınan cevap çok daha hızlı ve pozitif/negatif kontrol arasındaki fark daha da açıktır. Bunun nedeni, hedef olarak üretilen proteinin enzim olmasıdır. Bir enzim birden fazla substrat ile reaksiyona girebilirken, hedef protein floresan protein ise sadece bir ışıma sonucu verir. Literatürde protein seviyesinde 2-4 katlık farklar, enzimatik testler sonucunda 1000 kata kadar çıkar (13). Bu bilgiler ışığında yapılan deneylerle TET-ODD sisteminin kayda değer miktarda hipoksiye cevap verdiği görüldü.



Şekil 4.35. Yapılan 3 farklı floresan ölçüm sonucu.



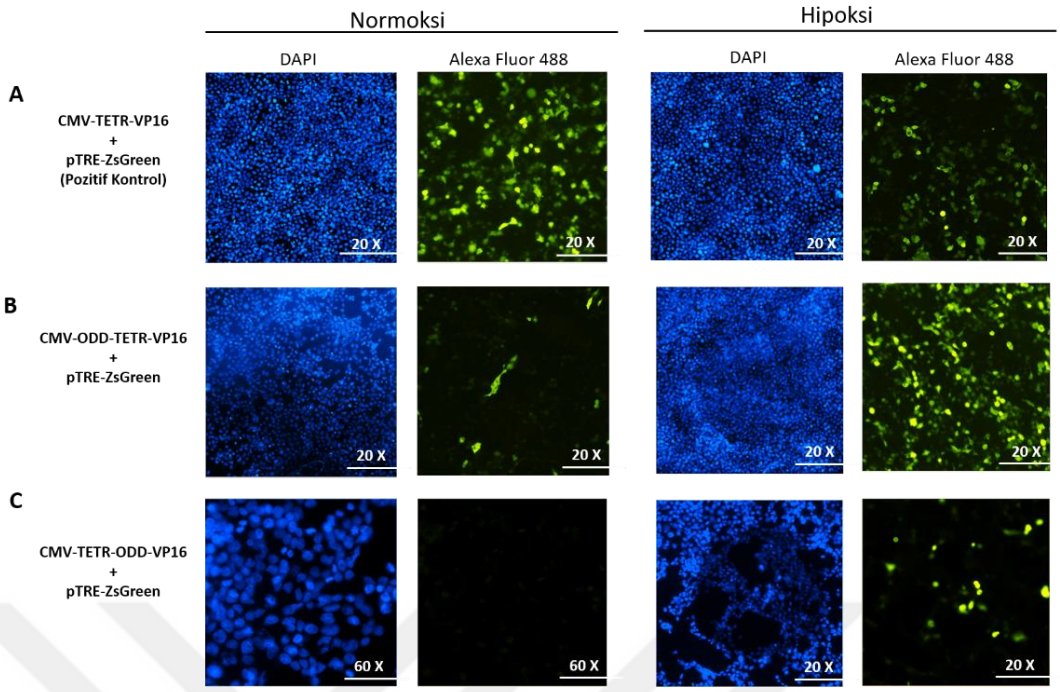
Şekil 4.36. Yapılan floresan ölçümlerin ortalama ve normalize halleri. Grafikler ortalama değerlere göre çizilmiştir (n=3). Error barlar standart sapmalara göre yerleştirilmiştir. Her bir kobalt klorür dozundaki üçlü tekrarın p değeri 0.05'den küçüktür

4.5. İmmünfloresan Antikor Testi (IF) Sonuçları

Oksijen yıkım bölgesini içeren HIF1A proteini, nüleositoplazmik bir proteindir (120). Bu sebeple hem çekirdekte hem de sitoplazmada lokalize olabilir. Yapılan IF antikor testinde, çekirdek boyaması ve anti-VP16 antikoru ile tasarlanan TET-ODD proteininin sitoplazmada lokalize olduğu belirlendi.

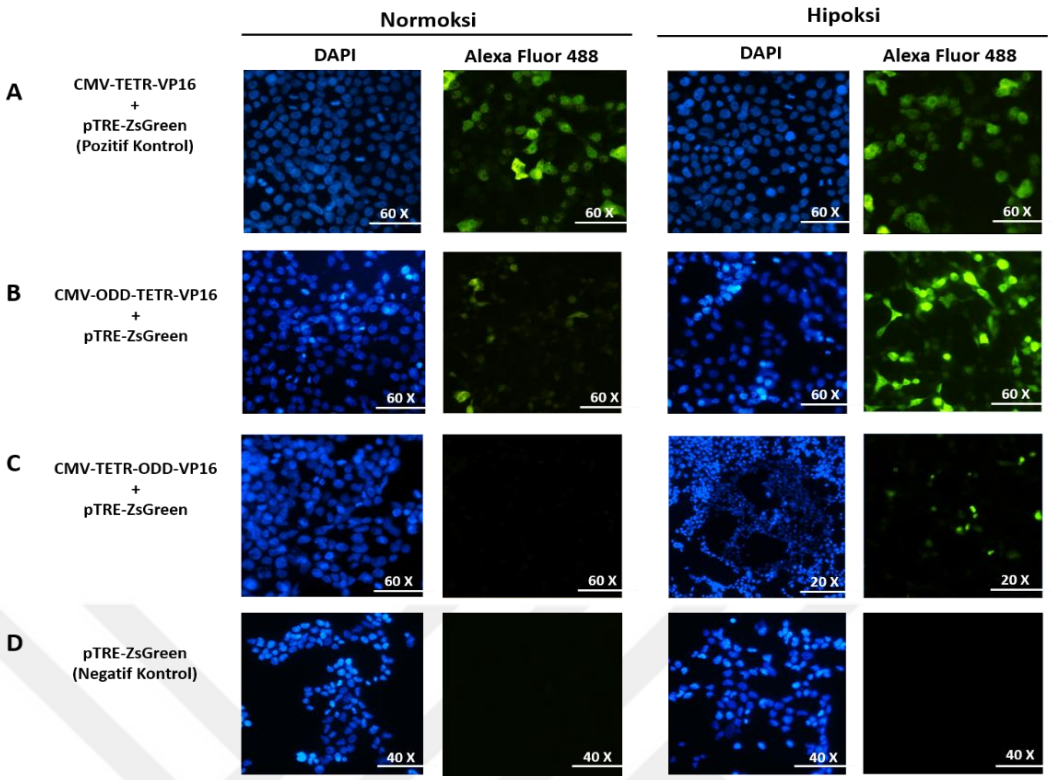
TETR-VP16 (pozitif kontrol) vektöründen alınan floresan mikroskop görüntülerinde, hedef floresan protein ekspresyonu hipokside normoksiye göre azaldığı görüldü (Şekil 4.37).

ODD-TETR-VP16 vektöründen alınan IF sonuçlarında, floresan protein ekspresyonu normokside pozitif kontrolden daha az miktarda gözlendi. Hipoksik durumda ise hedef floresan protein belirgin artış gösterildi (Şekil 4.38). Artışın daha net anlaşılabilmesi için 60X'de alınan görüntülerde artışın bazal ekspresyon seviyesinin çok üstünde olduğu gözlendi (Şekil 4.38).



Şekil 4.37. Floresan anti-VP16 antikoru ile işaretli tTA proteinlerinin IF antikor testi sonucu.

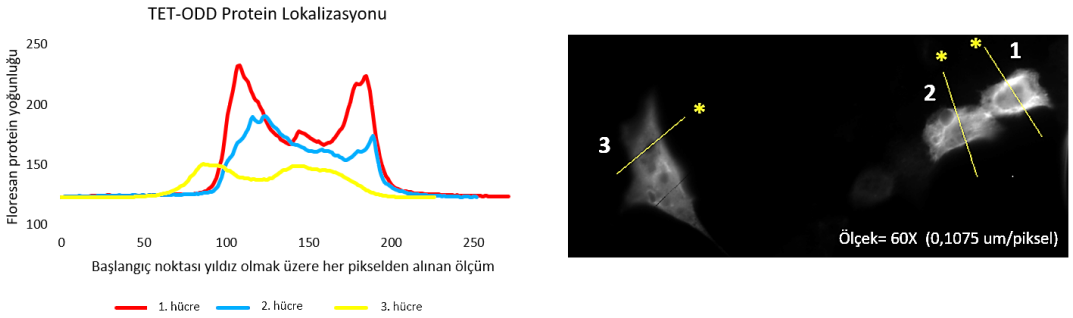
Şekil 4.37, pCMV-TETR-VP16, pCMV-ODD-TETR-VP16, pCMV-TETR-ODD-VP16 ve pTRE-ZsGreen plazmitlerinin transfekte edildiği HEK293T hücre hattının, hipoksi ve normoksiye ait 20X ölçekle çekilen floresan mikroskop (Nikon Eclipse Ti-E) görüntüleridir. Floresan anti-VP16 antikoru, VP16 transaktivasyon bölgesi ile hibrit halde olan tTA (TETR-VP16) transkripsiyon faktörünün hücre içi lokalizasyonunu ve miktarını belirlemek için kullanıldı. **(A)** Pozitif kontrol grubu vektörlerinin transfekte edildiği hücreler, düzenli DAPI (çekirdek boyaması) görüntüsü vermiştir. Yüksek hücre yoğunluğu ile 20X'de alınan görüntüde, hipoksi durumunda TETR-VP16 miktarının normoksiye göre azaldığı görülmektedir. **(B)** Normokside floresan protein görülmemesi, oksijen yıkım bölgesi bağımlı ODD-TETR-VP16'nın hidroksillenip yıkıldığını göstermektedir. Hipokside tasarlanan gen sistemi aktive olup, hidroksillenme azaldığı için hücre içinde stabil kalan TET-ODD transkripsiyon faktörü reportör plazmiti aktive eder ve floresan protein üretilir. Sistem hipoksiye belirgin yanıt vermiştir. **(C)** TETR-ODD-VP16'nın hipoksiye yanıt vermiştir. Ancak ODD-TETR-VP16'ya göre stabilitesi daha azdır.



Şekil 4.38. Floresan anti-VP16 antikoru ile işaretli tTA proteinlerinin IF antikor testi sonucu (20- 40- 60X).

Şelik 4.38, pCMV-TETR-VP16, pCMV-ODD-TETR-VP16, pCMV-TETR-ODD-VP16 ve pTRE-ZsGreen plazmitlerinin transfekte edildiği HEK293T hücre hattının, hipoksi ve normoksiye ait 60X ölçekle çekilen floresan mikroskop (Nikon Eclipse Ti-E) görüntüleridir. 60X görüntüleri, 20X'de hücre yoğunluğundan kaynaklanan yalancı floresan protein ekspresyon artışı olmadığını göstermektedir. **(A, B, C, D)** Düzenli çekirdek boyaması (DAPI) görülmektedir. **(B)** ODD-TETR-VP16'dan 60X'de alınan hipoksi yanıtı Şekil 4.5.1'i doğrular niteliktedir. **(D)** Negatif kontrol grubunun transfekte edildiği hücrelerde hipoksi ve normokside ekspresyon görülememesi sistemden kaçağın düşük olduğunu gösterir.

Şekil 4.39' daki görüntünün ImageJ programında yapılan analizinde çekirdek ve sitoplazmadaki floresan protein miktarları belirlendi ve sonuç sitoplazma ağırlıklı lokalizasyon olduğunu gösterdi. Kullandığımız mikroskop konfokal mikroskop olmuş olsaydı çekirdek kısmına gelindiğinde fotoğraf kesitinden alınan florasan ışıma sıfırlanacaktı. Faz kontrast flurosan mikroskop kullanıldığı için kesitlerin görüntüsü ayrı alınmadı. Çekirdekte ışıma varmış gibi görünmesinin sebebi budur.

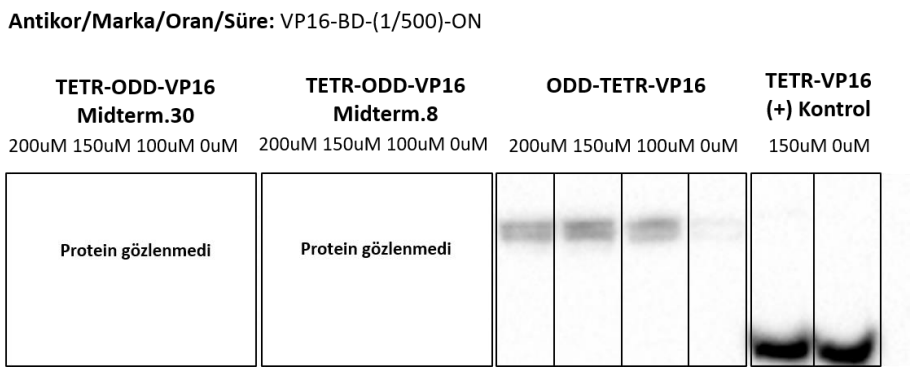


Şekil 4.39. ImageJ programında yapılan protein lokalizasyon analizi. Analize uygun boyutlara ve 16 bit'e getirilen floresan görüntüsünden, çekirdek ve sitoplazmik bölgedeki ekspresyon miktarı ölçüldü.

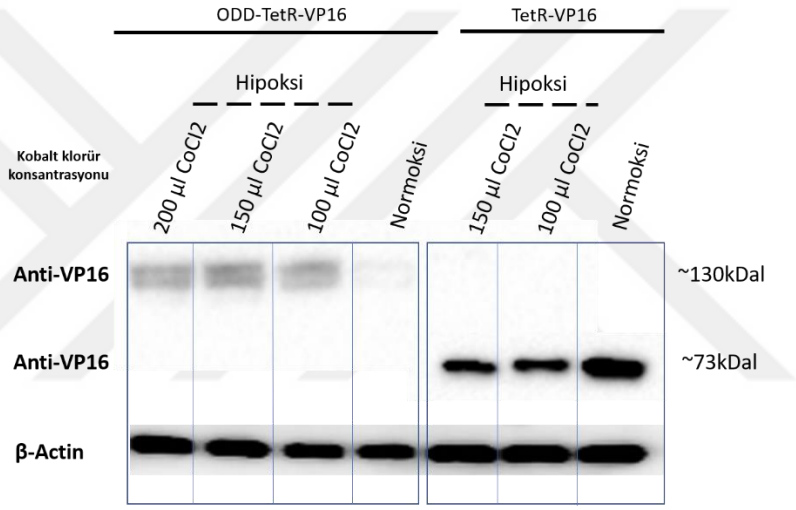
4.6. Western Blot Analizi Sonuçları

Tasarlanan genlerin klonlama, transfeksiyon ve hipoksi maruziyeti sonrası protein seviyesinde sistemden alınan yanıt takip edildi. Bunun için, hücrelerden 6 saatlik hipoksi inkübasyonu sonrasında protein izole edildi. Deney grupları şu şekildedir: TETR-VP16 proteini içeren kuyuların normoksi ve hipoksi dozları; ODD-TETR-VP16 proteini içeren kuyuların normoksi ve hipoksi dozları; TETR-ODD-VP16 proteini içeren kuyuların normoksi ve hipoksi dozları.

Proteinlerin hipoksi sonrası değişen miktarları, Anti-VP16 antikoru ile belirlendi. IF testinde de görüldüğü üzere tTA ortasına klonlanan ODD için alınan cevap hücre düzeyinde çok düşük idi. Western analizi sonrasında da protein bandı gözlenemedi (Şekil 4.40). TetR dimerize olan bir proteindir bu sebeple tTA 73,4kDal iken ODD-tTA'nın moleküler ağırlığı 131 kDal'dur (121, 122). Bu analiz esnasında eşit protein miktarları ile western blot yapıyor olmak mühimdir (115). Hipoksi esnasında oluşan miktar değişiminin doğruluğunun anlaşılması buna bağlıdır (12). Bu hususta da eşit protein konsantrasyonları kullanıldığı, beta aktin ile yapılan kontrolde gösterildi (Şekil 4.41). Aynı zamanda, izole edilen toplam proteinler Bradford Analizi yöntemi ile kuyu başı 20 mg/ml olacak şekilde eşit konsantrasyonda hazırlandı (Bkz. Bölüm 4.6.1).

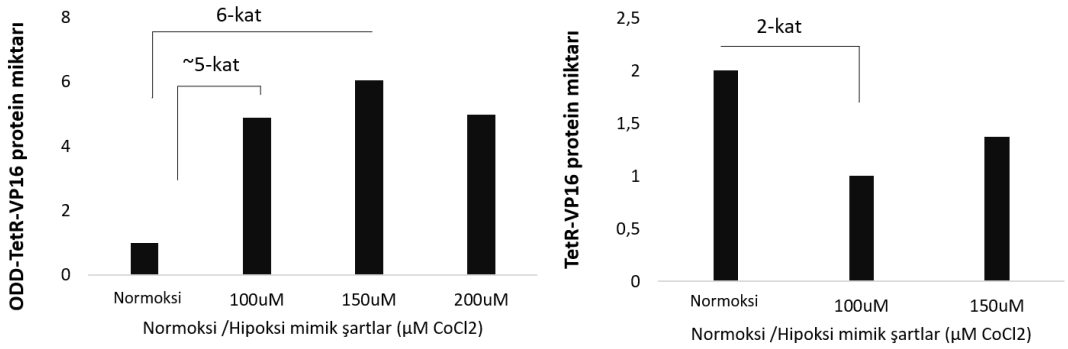


Şekil 4.40. Hipoksi sonrası izole edilen WB sonuçları. Hipoksi mimik ortam kobalt klorür ile oluşturuldu. Uygulanan dozlar normoksi için 0uM kobalt klorür, hipoksi için 100uM-150uM-200uM kobalt kolorürdür.



Şekil 4.41. Hipoksi sonrası WB sonuçları. Hipoksi mimik ortam kobalt klorür ile oluşturuldu. Uygulanan dozlar normoksi için 0uM kobalt klorür, hipoksi için 100 uM- 150 uM – 200 uM kobalt klorürdür.

Western sonucu elde edilen protein bandı görüntülerinin, görüntüleme cihazının kendi programı olan BioRad Image Lab programı kullanılarak yoğunlukları belirlendi. Bu grafiğe göre, ODD-TETR-VP16 proteininin hipoksi normoksi miktarları arasında yaklaşık 6 katlık fark gözlendi (Şekil 4.42). Bu sonuç, pozitif kontrol olan TETR-VP16 proteinindeki düşüşle birleştirilirse hipoksi esnasında toplamda 12 kata yakın değişim gerçekleştiği tespit edildi.



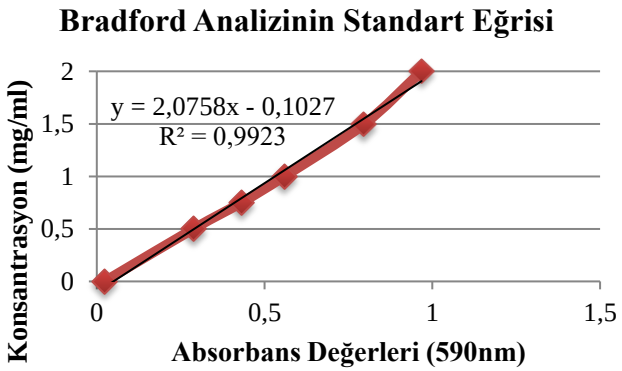
Şekil 4.42. BioRad Imafe Lab programında yapılan WB yoğunluk analizi sonucu. Şekil 4.6.2' deki WB sonucunun analizidir.

4.6.1. Bradford Analizi ile Belirlenen Protein Konsantrasyonları

Yöntemde bölüm 3.2.3.11'de belirtildiği şeklide hazırlanan standartlardan alınan ölçüm sonuçları Tablo 4.28 'deki gibidir. Elde edilen sonuçlara göre elde edilen standart doğru denklemi y = 2,0758x-0,1027'dir (Şekil 4.43). Bu denkleme göre hesaplanan proteinlerin konsantrasyonları Tablo 4.29 'daki gibi hesaplandı.

Tablo 4.28. Bradford analizi için hazırlanan standartların absorbans ölçüm sonuçları.

	Absorbans (595nm)	**BSA Konsantrasyonu (mg/ml)**
Standart 1	0,023	0
Standart 2	0,288	0,5
Standart 3	0,432	0,75
Standart 4	0,559	1
Standart 5	0,796	1,5
Standart 6	0,968	2



Şekil 4.43. Standart ölçümleri ile oluşturulan standart eğri denklemi ve grafiği.

Tablo 4.29. Bradford analizi için hazırlanan örneklerin absorbans ölçüm sonuçları.

		X (seyreltme)	y=2,0758x -0,1027	
	ABS	**2,5X**	**mg/ml**	**20 mg**
Nterm-Normoksi	1,17	2,93	5,97	3,4 ul
Nterm-100ul COCI2	1,11	2,76	5,63	3,6 ul
Nterm-150ul COCI2	1,06	2,65	5,39	3,7 ul
Nterm-200ul COCI2	1,15	2,88	5,87	3,4 ul
(+)K-100ul COCI2	1,02	2,54	5,17	3,9 ul
(+)K-150ul COCI2	1,07	2,68	5,47	3,7 ul
(+)K-200ul COCI2	1,06	2,64	5,37	3,7 ul
(+)K-Normoksi	1,14	2,86	5,83	3,4 ul
Midterm-Normoksi	1,02	2,54	5,16	3,9 ul
Midterm-100ul COCI2	1,13	2,82	5,75	3,5 ul
Midterm-150ul COCI3	1,17	2,93	5,97	3,4 ul
Midterm-200ul COCI4	1,10	2,75	5,61	3,6 ul

5. TARTIŞMA

İskemik kalp rahatsızlıkları erişkinlerde ortaya çıkan önemli multifaktöriyel hastalıklardan biridir. Konvansiyonel ve koruyucu tedavilerin semptomları tam olarak ortadan kaldıramaması kardiyovaküler hastalıklarda gen terapisi çalışmalarını artırmıştır (18, 19).

Gen terapilerinde izopropil β-D-1-tiogalaktopiranosit (IPTG) bağımlı, progesteron reseptörü düzenleme sistemi temelli ya da tetrasiklin bağımlı farklı hedef gen ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır (26). Bu sistemlerin varlık nedeni, gen terapilerinin güvenli bir hale getirilmesi için endo-ekzojen varlığı/yokluğu ile kontrol edilebilmesidir (28, 122). Hipoksi patofizyoljik bir endojen sinyal olarak, HIF-1α gibi birden fazla gen ekspresyonunu (VEGF (23, 123), Epo (23), GAPDH (22), PGK-1 (124)) kontrol etmektedir. HIF-1α geni ve özellikleri merkeze alınarak iskemik kalp rahatsızlıkları, omurilik zedelenmeleri, kanser, adacık hücresi transplantasyonu gibi durumlarda ortaya çıkan hipoksinin kontrol edilebilmesi için gen terapileri tasarlanmaktadır (125). Terapiler, transkripsiyonel aktivasyon (126) (hipoksi ile terapötik protein üretiminin aktivasyonu) veya post-translasyonel aktivasyon (127) (hipoksi sırasında hedef protein stabilizasyonu/normokside proteinin yıkımı) üzerinden tasarlanmaktadır (69, 126).

Çalışmamızda, iskemik kalp hastalıklarında gen terapisi yoluyla yapılan müdahaleler için hipoksi ile aktive olup hedef terapötik protein üretiminin kontrol edilebildiği bir gen sistemi tasarlayıp, karakterize etmeye çalışıldı. Bunun için hipoksik durumda post-translasyonel protein stabilizasyonu yolu ile tasarlanan gen sistemimiz için tetrasiklin bağımlı regülatör protein (DNA bağlanma bölgesi: TETR) ve VP16 transaktivatör proteinini (Aktivasyon bölgesi: VP16) HIF-1α'nın oksijen yıkım bölgesi (ODD) ile hibrit hale getirildi. ODD bölgesi, HIF-1α proteininde hipoksi stabilizasyonunu sağlayan bölgedir (20). ODD bölgesi içinde bulunan 402. ve 564. prolin rezidüleri normoksik şartlarda hücre içinde prolil hidroksilaz enzimleri (PHD 1-3) aracılığı ile hidroksillenir ve proteozomal yıkıma uğrar (128, 129). Hipoksik durumda bu prolinler hidroksillenemez (130). Çekirdeğe giren ve stabil kalan transkripsiyon faktörü (HIF-1α), hedef genlerinin transkripsiyonunu böylece başlatır (131). Kurmuş olduğumuz sistemde sürekli çalışan bir promotor ardından

üretilen ODD-TETR-VP16 hibrit transkripsiyon faktörünün hipoksideki post-translasyonel stabilizasyonunda ve hedeflediği genin üretiminde başarılı sonuç aldık ve sistemi karakterize edildi.

Çalışmamızda, sistem optimizasyonu için gen sisteminin tasarımı ile birlikte, transkripsiyon faktörünün 3 boyutlu yapısı ve hidroksillenme özelliğinin üzerinde de duruldu. Bu sebeple tasarlanan proteinimizin 3 boyutlu yapısı modellenerek, oksijen bağımlı yıkım bölgesinin (ODD), hidroksillenme ve yıkım için uygun lokasyonda olduğu hali seçmeye çalışıldı.

Bu amaç doğrultusunda, transkipsiyon faktörü seçiminde gen terapisi için uygun bir aday olan TETR-VP16 kompleksi seçildi. Kompleksin seçim nedeni, tetrasiklin duyarlı olan kompleks ile kurulan sistemin in vitro ya da in vivo uygulamalarda basit bir antibiyotik kullanılarak inhibe edilebilmesi özelliğidir (122). Önceden çalışılan sistemler hipoksi haricinde bir parametre ile kontrol edilememektedir. Bu durum, hipoksi olduğu müddetçe sistemin aktive olmasına ve sürekli hedef protein ekspresyonuna neden olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı, tedavi için hedeflenen hücre ya da doku dışına kaçak olduğu takdirde sistemin kontrolden çıkması problemi ortaya çıkmaktadır (13). Bu çalışmada, antibiyotik ile inhibisyonu sağlanan bir sistem kullanılarak bu problem çözülmeye çalışıldı. Alternatif olarak gen sistemini sürekli çalışan güçlü bir promotor olan CMV ardından üretmek yerine, sadece hedef dokuda çalışabilen doku spesifik bir promotordan de üretilebilirdi

Başka bir çalışmada (132), benzer bir gen sisteminde kontrolü sağlayabilmek için, hedef transkripsiyon faktörü, mutant hale getirilmiş progesteron reseptörü ile hibrit hale getirilmiştir. Sistemi aktive edilmek için, mifepristone ilacı (progesteron reseptörünün invers agonisti) gen terapisi ile birlikte verilmek zorundadır. Menopoz döneminde, östrojen replasman terapisinde kullanılan dozda ilaç, regülatör sistemi aktivasyonu için gerekmektedir (30). Hedef transgen aktivasyonu sağlamak için sürekli verilmesi gereken bu ilaç mevcut steroit hormon reseptörlerini de etkileyeceği için bu sistemin in vivo kullanımı yüksek yan etkiler doğurabilmektedir (26). Sistemimizin aktivasyonu yerine inhibisyonu için antibiyotik bağımlı bir sistem seçmemiz, gen terapisi ile birlikte verilmesi gereken ilaç dozunu elimine etmiştir. Bu durum, eksprese edilmesi gereken hedef protein seviyesine ulaşılması için alınacak ilaç dozundan sistemimizi bağımsız hale getirmiştir.

Hipoksi stabilizasyonunun, 402 ve 564. prolin rezidüleri üzerinden kazanıldığı önceden yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (21, 89, 133). Bu iki prolin rezidüsünün çıkarıldığı mutant HIF1A dizileri ile yapılan çalışmalarda hidroksillenmenin 564.proline bağlı olarak seyrettiği, 564. prolin çıkarıldığında hidroksillenmenin durduğu, 402. amino asit çıkarıldığında ise sadece reaksiyonun yavaşladığı bulunmuştur (21). Bu durumdan dolayı, ODD bölgesi üzerinde 185. prolinine denk gelen (HIF1A üzerinde 564.prolin) aminoasidin yeni bir proteinle hibrit hale getirildiğinde 3 boyutlu yapı içerisinde benzer lokasyonda bulunmasının tasarıma benzer hidroksillenme kabiliyetini vereceği düşünüldü. Bu kıyasın yapılabilmesi içinde HIF1A, ODD-TETR-VP16, TETR-ODD-VP16, ODD-GAL4-p65 hibrit proteinlerinin 402. ve 564. prolin rezidülerinin lokasyon ve çözücü maruziyet skorları I-TASSER veritabanından gelen bilgilerden elde edildi.

I-TASSER'den alınan bilgilere göre, ODD bölgesi üzerindeki hidroksillenen iki prolin rezidüsü, tüm hesaplanan sekanslarda lokasyon olarak alfa sarmalı üzerinde olduğu görüldü. Hidroksillenmenin 564.prolin üzerinden seyrettiği göz önünde bulundurulduğunda, tasarımların hipoksiyi algılama sıralaması HIF1α > ODD-TETR-VP16 > TETR-ODD-VP16 şeklinde oldu (Tablo 4.25). Alınan bu sonuç, yapılan moleküler deneylerle de korelasyon göstermektedir. Bu sayede, ODD bölgesi kullanılarak hipoksiye duyarlılık kazandırılmak istenen herhangi bir hibrit proteinin hidroksillenmesi hakkında deney yapmadan önce nasıl tahmini veriler elde edilebileceği bu çalışmada gösterilmiş oldu.

Ek olarak, hücre içinde hipoksi durumunda stabil kalan protein miktarının anlaşılması için bilgisayar ortamında yapılan enzim kinetiği modellemesinde kurulan hipotez şu şekildedir. ODD bağımlı üretilen kompleks normalde hücre içinde belli bir üretim yıkım dengesinde bulunmaktadır. Normoksi durumunda prolil hidroksilaz ile hidroksillenme reaksiyonu üretim-yıkım kaskadına eklenecek, son olarak hidroksillenen tüm kompleks übikitinlenerek yıkıma gidecektir. Bu reaksiyon zinciri içinde, tasarlanan TET-ODD kompleksinin hidroksillenmesi, HIF1A hidroksillenmesi ile kıyaslanabilir. Çünkü, en başından sistemin çalışma prensibinin 402 ve 564. prolin rezidülerinin hidroksillenmesi üzerinden seyrettiği hipotezi çalışmada savunuldu ve moleküler deneylerle de ispatlandı. Bu mantık ile daha önce literatürde HIF1A'nın hipoksik ve normoksik şartlardaki üretim yıkım döngüsü için

yapılmış olan modelleme verileri (131, 134) ile I-TASSER'den elde edilen datalar (prolin rezidüleri ile tahmini prolil hidroksilaz etkileşimi skorları) birleştirildi. Yapılan modellemeden elde edilen verilerde, HIF1A normokside tamamen hidroksillenirken, hipoksik durumda %60'ı hücre içinde stabil kaldı. ODD-TETR-VP16 proteini hipokside ortamda %80 stabil kalırken sistem %50 kaçak verdiği için net olarak protein %30'luk bir hipoksi normoksi farkı oluşturdu. TETR-ODD-VP16 proteininde ise sistemin normoksi hipoksi arasında hidroksillenme farkı oluşmadığı için sistem hipokside belirgin bir yanıt oluşturamadı. Sonuç olarak, MATLAB kullanılarak yapılan modellemeden elde edilen veriler, deney sonuçları ile uyumlu sonuçlar verdi.

Hipoksiyi algılamaya yönelik gen sistemleri ile ilgili daha önce de yapılmış çalışmalar mevcuttur. 2008 yılında yapılan bir gen terapisi çalışmasında (13), GAL4-p65 kompleksi ile ODD bölgesi birleştirilmiştir. Farklı promotor, regülatör ve reportör kombinasyonları ile sistem hipoksik şartlarda karakterize edilmiştir. Sistemin en büyük açığı, CMV promotor ardından üretilen GAL4-ODD-p65 kompleksinden alınan yanıtın normoksi hipoksi arasında çok farklı olmamasıdır (13). Bahsedilen çalışmada hipokside yaklaşık 1,5 kat farkla çalışan CMV--GAL4-ODD-p65 gen sistemi, çalışmamızda CMV--ODD-TETR-VP16 gen sistemi olarak tasarlanıp hipokside 6 kat fark elde edilmiştir.

Bu çalışmada yapılan florometrik ölçümde, ZsGreen floresan protein düzeyinde normal ve düşük oksijen seviyelerinde 4 katlık bir fark gözlendi (Şekil 4.36). Kimyasal bağımlı hipoksi ortamı oluşturulduğu için doz cevap analizi ile hücre canlılığına zarar vermeyen $CoCl_2.5H_2O$ seviyesi belirlendi. Kobalt klorür kullanılarak yapılan ortamda ise kobalt iyonu hücre medyumundan askorbatın hücre içine girmesini engeller, bu durumda da prolil hidroksilazın hidroksilleme reaksiyonu yine baskılanmış olur (135). Çalışmada bu yöntemin seçilme nedeni, florometrik ölçümlerin mikroplate okuma cihazında yaklaşık 20 dk sürmesidir. Bu süre zarfında, hücreler tekrar O_2'ye maruz kalacağı için protein ekspresyonu etkilenir, bu yüzden kobalt klorür ile hipoksik şartların oluşturulması daha kontrollüdür.

Sistemin karakterizasyon deneyleri, transfeksiyon sonrasında deney gruplarından üretilen floresan proteini takibi ile yapıldı. Bu durum, sistemden olan kaçak miktarının zamana bağlı olarak artışının, yalancı pozitif sonuç alma ihtimalini

ortaya çıkardı. Bunu elimine etmek için zamana bağlı floresan ölçüm takibi yapıldı. Transfeksiyon yapıldıktan sonra 24 saat boyunca aralıklı yapılan ölçümler ile sistem kaçağı ölçüldü. Tüm deney grupları arasındaki ekspresyon farkı her ölçümde sabit kaldı (Şekil 4.35). Bu, sistemin kaçağının hipoksi testleri için yalancı pozitif sonuca neden olmayacağını gösterdi. Ayrıca, yapılan ölçümleri normalize etmek için (-) kontrolden alınan ölçüm tüm değerlerden çıkarılıp, (+) kontrol değerine bölündü. Bu şekilde sistem kaçağı, ölçüm değerlerinden çıkarılmış oldu (Şekil 4.36).

Yapılan western blot sonucunun analizi ile de normoksi, hipoksi arasında eksprese olan protein seviyeleri arasında yaklaşık 6 katlık bir fark gözlendi. Bu sonuç, pozitif kontrol olan TETR-VP16 proteininin hipoksi ile birlikte gösterdiği düşüşle birleştirilirse hipoksi esnasında toplamda 12 kata yakın değişim gerçekleştiği gözlendi (Şekil 4.42). TETR'ın dimerize olarak tetO bölgesine bağlanıp floresan protein transkripsiyonunu başlattığı alınan ekspresyon sonuçları ile de korelasyon göstermiştir.

Sonuç olarak hücre içi oksijen seviyesini algılamaya yönelik tasarlanan TET-ODD sisteminden iskemik şartlarda olumlu cevap alınmıştır. Sistem 6 saatlik hipoksi durumunda normoksiye göre 6 katlık farkla hedef proteini üretebilir kapasitededir. Yapılan 3 boyutlu protein tasarımları ile de oksijen yıkım bölgesi üzerindeki prolin rezidülerinin (402, 564) lokasyonunun önemi gösterilmiştir. Moleküler deneylerle bu hipotez doğrulanmıştır. Bu sebeple, tasarlanan sistem gen terapileri için kullanılabilir ve üzerinde çalışılmaya devam edilebilir niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sistemin hipoksiye cevap verdiği farklı moleküler metodlar ile gösterildi. Aynı zamanda hipoksi stabilitesi kazandırılan TETR-VP16 kompleksinin hidroksillenme şekli hakkında ortaya konan, proteinin 3 boyutlu yapısı içinde hidroksillemeyi sağlayan 402 ve 564. prolin rezidülerinin lokasyonları ile prolil hidroksilaz etkileşimi arasındaki ilişki gösterildi.

Sistemin hipoksiye verdiği yanıtın artırılması için TET-ODD kompleksi doku spesifik promotorlar ile birleştirilebilir. Böylece proteinin üretilmesi istenen hedef dokuya spesifikliği sağlanmış olur. Ayrıca, hipoksi cevap elementi olarak bilinen (HRE) operonun promotor ile birleştirilmesi ile hipoksiye duyarlılık transkripsiyon düzeyinde de artırılabilir. Bu sayede, HIF1A ekspresyonu yüksek olan dokularda sistemden alınacak cevap hem HRE üzerinden hem transkripsiyonel düzeyde hem de TET-ODD sistemi üzerinden post-translasyonel düzeyde olacağı için hipoksi hassasiyeti yükseltilebilir. Bu şekilde, hayvan modeli üzerinde iskemik kalp hasarlı farelerde fibröz doku miktarı takibi hedef VEGF geni üzerinden yapılabilir. Ayrıca miyokardiyal enfarktüse neden olan pıhtının parçalanması için tPA üretilerek reperfüzyon hasarı ve iskemiye bağlı nekrozdan kurtulabilir.

Ayrıca, I-TASSER sunucusu kullanılarak farklı DNA bağlanma bölgesi ve transaktivasyon bölgeleri ile yapılan ODD kompleksi ile farklı transkprisiyon komplekslerinin hipoksi duyarlılığı skalası belirlenebilir. Bu sayede moleküler deneyler yapılmadan önce tasarlanan hipoksi duyarlı proteinlerin in vitro ve in vivo'da ne kadar çalışabileceğine dair ön bilgi edinilerek, bu konuda yapılacak çalışmalarda zaman ve bütçe kazancı sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Merck C. Occlusive Peripheral artery disease. in *Merck Manual Home Health Handbook.* https://www.merckmanuals.com/professional/cardiovascular-disorders/peripheral-arterial-disorders/peripheral-arterial-disease. 10 Aralık 2015.

2. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options, *International Journal of Cardiology,* 1995, 58(2):1995-117.

3. Collard MD, Charles D, Gelman MDPDS. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury, *Anesthesiology,* 2001, 94(6):1133-1138.

4. Go AS. Heart disease and stroke statistics-2013 update, *Circulation,* 2013, 127(1):e6.

5. Heidenreich PA. Forecasting the future of cardiovascular disease in the USA, *Circulation,*2011, 123(8):933.

6. Trempe JF. Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation, *Science,* 2013, 340(6139):1451.

7. Purnick PEM, Weiss R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems, *Nat Rev Mol Cell Biol.,* 2009, 10(6):410-422.

8. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1, *Journal of Biological Chemistry,*1994, 269(38):23757-23763.

9. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *Journal of applied physiology,* 2000, Bethesda, Md: *1985,* 88(4):1474-1480.

10. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-inducible factors (HIFs) and phosphorylation: impact on stability, localization, and transactivity, *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* 2016, 4:11.

11. Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins, *Cell Death Differ.,*2008, 15(4):635-641.

12. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A,*1998, 95(14):7987-7992.

13. Fomicheva EV. Double oxygen-sensing vector system for robust hypoxia/ischemia-regulated gene induction in cardiac muscle in vitro and in

vivo, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy,* 2008, 16(9):1594-1601.

14. International union of biochemistry and molecular biology. Enzyme Nomenclature Handbook. “t-Plasminogen Activator", https://iubmb.org/. 17 Kasım 2016.

15. Pennica D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli, *Nature,* 1993, 301(5897):214-221.

16. Van de Werf F. Coronary thrombolysis with intravenously administered human tissue-type plasminogen activator produced by recombinant DNA technology, *Circulation,*1984, 69(3):605.

17. Benner SA, Sismour AM. Synthetic biology, *Nat Rev,* 2005, *Genet* 6.

18. Pleger ST. Heart failure gene therapy, *Circulation Research,* 2013 113(6):792.

19. Tilemann L, Ishikawa K, Weber T, Hajjar RJ. Gene therapy for heart failure, *Circulation research,* 2012, 110(5):777-793.

20. Rhim T, Lee DY, Lee M. Hypoxia as a target for tissue specific gene therapy, *Journal of Controlled Release,* 2013, 172(2):484-494.

21. Chan DA, Sutphin PD, Yen SE, Giaccia AJ. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha, *Molecular and cellular biology,* 2005, 25(15):6415-6426.

22. Lu S, Gu X, Hoestje S, Epner DE. Identification of an additional hypoxia responsive element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter, *Biochimica et biophysica acta,* 2002, 1574(2):152-156.

23. Gupta M, Mungai PT, Goldwasser E. A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene, *Blood,* 2000, 96(2):491-497.

24. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage, *Nature,* 2015, 526(7573):351-360.

25. Stewart MP. In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery, *Nature,* 2016, 538(7624):183-192.

26. Goverdhana S. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy,* 2005, 12(2):189-211.

27. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Molecular Therapy,* 2016, 24(3):430-446.

28. Fussenegger M. The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol Prog.,* 2001, 17(1):1-51.

29. Asokan A, Schaffer DV, Jude SR. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads, *Molecular Therapy,* 2012, 20(4):699-708.

30. Wang Y, O'Malley BW, Tsai SY. A regulatory system for use in gene transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A,* 1994, 91(17):8180-8184.

31. Kim JS. Genome editing comes of age, *Nature Protocols,* 2016, 11:1573.

32. Jain A, Wang G, Vasquez KM. DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential, *Biochimie,* 2008, 90(8):1117-1130.

33. Bolukbasi MF, Gupta A, Wolfe SA. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery, *Nature Methods,* 2015, 13:41.

34. Pai SI. Prospects of RNA interference therapy for cancer, *Gene Ther.,* 2005, 13(6):464-477.

35. Lewin AS, Hauswirth WW. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine, *Trends in Molecular Medicine,* 2015, 7(5):221-228.

36. Hughes A. Gene therapy to improve pancreatic islet transplantation for Type 1 diabetes mellitus, *Current diabetes reviews,* 2010, 6(5):274-284.

37. Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis, *American heart journal,* 1999, 138(2 Pt 2):S132-141.

38. Lompre AM. Ca2+ cycling and new therapeutic approaches for heart failure, *Circulation,* 2010, 121(6):822-830.

39. Kim H, Kim HA, Bae YM, Choi JS, Lee M. Dexamethasone-conjugated polyethylenimine as an efficient gene carrier with an anti-apoptotic effect to cardiomyocytes, *The journal of gene medicine,* 2009, 11(6):515-522.

40. Cohen ED, Miller MF, Wang Z, Moon RT, Morrisey EE. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development, *Development,* 2012, 139(11):1931.

41. Hajjar RJ. Potential of gene therapy as a treatment for heart failure. *The Journal of Clinical Invest.,* 2013, 123(1):53-61.

42. Bonci D. Advanced generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo, *Gene Ther,* 2000, 10(8):630-636.

43. Vetrini F, Ng P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives, *Viruses,* 2010, 2(9):1886-1917.

44. America Type Culture Collection. HEK293T (ATCC® CRL3216™), https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3216. 13.03.2017.

45. Parret AHA, Besir H, Meijers R. Critical reflections on synthetic gene design for recombinant protein expression, *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 38:155-162.

46. Fakruddin M, Mohammad MR, Bin Mannan KS, Chowdhury A, Hossain MN. Critical factors affecting the success of cloning, expression, and mass production of enzymes by recombinant E. coli, *ISRN Biotechnology*, 2013, 2013:7.

47. Bostrom P. A PGC1-[agr]-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis, *Nature*, 2012, 481(7382):463-468.

48. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression, *Trends in Biotechnology*, 2010, 22(7):346-353.

49. Grote A. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host, *Nucleic Acids Res*, 2005, 1.

50. Moura G. Comparative context analysis of codon pairs on an ORFeome scale, *Genome Biol*, 2005, 6.

51. Carrier MJ, Buckingham RH. An effect of codon context on the mistranslation of UGU codons in vitro, *J Mol Biol*, 1984, 175.

52. Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1):292-292.

53. Hilterbrand A, Saelens J, Putonti C. CBDB: The codon bias database, *BMC Bioinformatics*, 2012, 13(1):62.

54. Hoover DM, Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(10):e43-e43.

55. Gaspar P, Oliveira JL, Frommlet J, Santos MAS, Moura G. EuGene: maximizing synthetic gene design for heterologous expression, *Bioinformatics*, 2012, 28(20):2683-2684.

56. Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S. Gene designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments, *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(1):285.

57. Jung SK, McDonald K. Visual gene developer: a fully programmable bioinformatics software for synthetic gene optimization, *BMC Bioinformatics,* 2011, 12(1):340.

58. Newman ZR, Young JM, Ingolia NT, Barton GM. Differences in codon bias and GC content contribute to the balanced expression of TLR7 and TLR9, *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2016, 113(10):E1362-E1371.

59. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression, *Trends Biotechnol.,* 2004, 22.

60. Proudfoot NJ. Ending the message: poly(A) signals then and now, *Genes & Development,* 2011, 25(17):1770-1782.

61. Stewart L, Burgin AB. Whole gene synthesis: A Gene-O-Matic future. *Frontiers in Drug Design & Discovery,* 2005, 1.

62. Presnyak V. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell,* 2011, 160(6):1111-1124.

63. Boël G. Codon influence on protein expression in E. coli correlates with mRNA levels, *Nature,* 2016, 529(7586):358-363.

64. Widmann M, Clairo M, Dippon J, Pleiss J. Analysis of the distribution of functionally relevant rare codons, *BMC Genomics,* 2008, 9.

65. Del Campo C, Bartholomäus A, Fedyunin I, Ignatova Z. Secondary structure across the bacterial transcriptome reveals versatile roles in mRNA regulation and function, *PLOS Genetics,* 2015, 11(10):e1005613.

66. Gonzalez de Valdivia E, Isaksson LA. Abortive translation caused by peptidyl-tRNA drop-off at NGG codons in the early coding region of mRNA, *FEBS J.*, 2005, 272.

67. Clarke TF, Clark PL. Rare codons cluster, *PLoS One,* 2008, 3.

68. Clarke TF, Clark PL. Increased incidence of rare codon clusters at 5' and 3' gene termini: implications for function, *BMC Genomics,* 2010, 11(1):118.

69. Tang Y, Schmitt-Ott K, Qian K, Kagiyama S, Phillips MI. Vigilant vectors: adeno-associated virus with a biosensor to switch on amplified therapeutic genes in specific tissues in life-threatening diseases, *Methods (San Diego, Calif.),* 2002, 28(2):259-266.

70. Tirabassi R. Foundations of molecular cloning - past, present and future, 2000.

71. Hayes CS, Bose B, Sauer RT. Stop codons preceded by rare arginine codons are efficient determinants of SsrA tagging in Escherichia coli, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99.

72. Green R, Noller H. Ribosomes and translation, *Annu Rev Biochem.*, 1997, 66.

73. Thanaraj TA., Argos P. Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization, *Protein Sci*, 1996, 5.

74. Salem TZ. The influence of SV40 polyA on gene expression of baculovirus expression vector systems, *PLOS ONE*, 2015, 10(12):e0145019.

75. Arnau J, Lauritzen C, Pedersen J. Cloning strategy, production and purification of proteins with exopeptidase-cleavable His-tags, *Nat. Protocols*, 2006, 1(5):2326-2333.

76. Jäger V, Büssow K, Schirrmann T. Transient recombinant protein expression in mammalian cells, *Animal Cell Culture*, ed Al-Rubeai M (Springer International Publishing, Cham), 2015, pp 27-64.

77. Wu ST, Skolnick J, Zhang Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations, *BMC Biology*, 2007, 5.

78. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nature protocols*, 2010, 5(4):725-738.

79. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1):40.

80. Yang J. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, *Nat Meth*, 2015, 12(1):7-8.

81. Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. A protocol for computer-based protein structure and function prediction, *J Vis Exp.*, 2011, (57):e3259.

82. Zhang Y. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7, *Proteins*, 2007, 69.

83. Wilkins SE, Abboud MI, Hancock RL, Schofield CJ. Targeting protein–protein interactions in the HIF system, *ChemMedChem.*, 2016, 11(8):773-786.

84. Illingworth CJR, Loenarz C, Schofield CJ, Domene C. Chemical basis for the selectivity of the von hippel lindau tumor suppressor pVHL for prolyl-hydroxylated HIF-1α, *Biochemistry*, 2010, 49(32):6936-6944.

85. Chowdhury R. Structural basis for binding of hypoxia-inducible factor to the oxygen-sensing prolyl hydroxylases, *Structure*, 2009, 17(7):981-989.

86. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995, 92(12):5510-5514.

87. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical, *Molecules and cells*, 2010, 29(5):435-442.

88. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension, *J Biol Chem*, 1997, 272(31):19253-19260.

89. Chowdhury R. Structural basis for binding of hypoxia-inducible factor to the oxygen-sensing prolyl hydroxylases, *Structure*, 2016, 17(7):981-989.

90. McDonough MA. Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(26):9814-9819.

91. Kageyama Y. Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2004, 18(9):1028-1030.

92. Luo W. Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but not HIF-2alpha, *J Biol Chem*, 2010, 285(6):3651-3663.

93. Clontech Laboratories. Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual, www.clontech.com. 20 Ekim 2016.

94. Clontech Laboratories. RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen1 Vector Information, *PT3777-5* Cat. No. 632455, www.clontech.com. 20 Ocak 2015.

95. Rio DC, Clark SG, Tjian R. A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction, *Science*, 1985, 227(4682):23.

96. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 1976, 72:248-254.

97. Christine E, Seidman KS, Jen S, Timm J. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, 1.8.1-1.8.10.

98. Voytas D. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2000, 2.5A.1-2.5A.9.

99. Sambrook J, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 1989.

100. KG M-NGC. NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) protocols. pp 16-20. www.mn-net.com. 17 Eylül 2014.

101. NewEngland Biolab, Optimizing Restriction Endonuclease Reactions Manual, www.neb.com. 21 Ekim 2016.

102. KG M-NGC. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit Manual, www.mn-net.com, 1 Temmuz 2015.

103. Scientfic T. DNA Insert Ligation (sticky-end and blunt-end) into vector DNA protocol, www.thermo.com. 19.04. 2014.

104. Fischer T, Taq Polymerase (recombinant) Manual, #EP0402, www.thermo.com. 3 Eylül 2017.

105. Fischer T, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit USER GUIDE. https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/cms_081527.pdf., 14 Nisan 2016.

106. Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture, *Nature*, 1975, 258:487.

107. Stacey GN, Masters JR. Cryopreservation and banking of mammalian cell lines, *Nature Protocols*, 2008, 3:1981.

108. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 2001, Appendix 3:Appendix 3B.

109. Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI), *Methods in enzymology*, 2013, 529:227-240.

110. Tom R, Bisson L, Durocher Y. Transfection of adherent HEK293-EBNA1 cells in a six-well plate with branched PEI for production of recombinant proteins, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(3):pdb.prot4978.

111. Hsu CYM., Uludağ H. A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue–derived cells using polyethylenimine, *Nature Protocols*, 2012, 7:935.

112. Emerling BM, Weinberg F, Liu J-L, Mak TW, Chandel NS. PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(7):2622-2627.

113. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture, 2011, (54):e2899.

114. Numajiri Haruki A, Naito T, Nishie T, Saito S, Nagata K. Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic

reticulum stress, *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*,2011, 31(11):847-856.

115. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting, *North American Journal of Medical Sciences*, 2012, 4(9):429-434.

116. Wu Y, Li Q, Chen XZ. Detecting protein–protein interactions by far western blotting, *Nature Protocols*, 2007, 2:3278.

117. New England Biolab, NEB 1kb ladder manuscript, https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/n3232datasheet-lot1041202.pdf. 7 Ocak 2016.

118. New England Biolab, NEB - Q5® High-Fidelity 2X Master Mix Manuscript., https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/m0492datasheet-lot0061406.pdf. 8 Ocak 2016.

119. Inc NE. NEB 100 bp DNA ladder datasheet, https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/n3231datasheet-lot0941207.pdf. 7 Ocak 2016.

120. Groulx I, Lee S. Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von hippel-lindau tumor suppressor protein, *Molecular and cellular biology*, 2002, 22(15):5319-5336.

121. Gossen M., Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12):5547-5551.

122. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy, 2016*, 16(3):156-167.

123. Dibbens JA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements, *Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10(4):907-919.

124. Dachs GU. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells, *Nature Medicine*, 1997, 3:515.

125. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(9):4304-4308.

126. Tang YL. A hypoxia-inducible vigilant vector system for activating therapeutic genes in ischemia, *Gene Ther*, 2005, 12(15):1163-1170.

127. Tang Y, Jackson M, Qian K, Phillips MI. Hypoxia inducible double plasmid system for myocardial ischemia gene therapy, *Hypertension,* 2002, 39(2 Pt 2):695-698.

128. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(42):39792-39800.

129. Erbel PJ, Card PB, Karakuzu O, Bruick RK, Gardner KH. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix--loop--helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor, *Proc Natl Acad Sci U S A,* 2003, 100(26):15504-15509.

130. Krek W. VHL takes HIF's breath away, *Nature cell biology*, 2000, 2(7):E121-123.

131. Nguyen LK. A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) network, *Journal of cell science,* 2013, 126(Pt 6):1454-1463.

132. Wang Y, DeMayo FJ, Tsai SY, O'Malley BW. Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice, *Nat Biotech.,* 1997, 15(3):239-243.

133. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications, *Cellular signalling*, 2005, 17(1):1-9.

134. Qutub AA, Popel AS. A computational model of intracellular oxygen sensing by hypoxia-inducible factor HIF1 alpha, *Journal of cell science*, 2006, 119(Pt 16):3467-3480.

135. Triantafyllou A. Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism, *Free Radical Research,* 2006, 40(8):847-856.

136. National Center for Biotechnology Information. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/. 20.02.2017.

137. Cost JG. Enzymatic ligation assisted by nucleases: simultaneous ligation and digestion promote the ordered assembly of DNA, *Nature Protocols*, 2007, Vol.2,No.9, 10.1038/nprot.2007.325.

8. EKLER

EK-1. Sipariş Verilen Genlerin Dökümanları

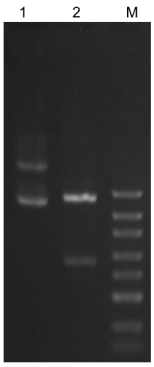
GenScript — Make Research Easy
CONFIDENTIAL

Certificate of Analysis

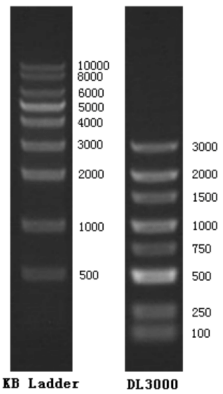
Project ID: 484691-5
Construct Information:
Gene Name: ODD(708 bp) **Gene Length:** 798 bp
Cloning Vector: pUC57 **Cloning Strategy:** EcoRV **Clone ID:** B65509

QC Items	Specifications	Results
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	☒ Pass ☐ Fail
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	☒ Pass ☐ Fail
Reading Frame	☒ Not requested ☐ Frame is correct and consistent with client's requirement.	☒ Pass ☐ Fail
Restriction Digests	The size of inserted fragment is right and free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
PCR Amplification	Amplification is correct and construct is free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
DNA Quality	☒ Miniprep: 4 μg, OD260/280=1.7~2.0 ☐ Maxiprep: 100 μg, OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination.	☒ Pass ☐ Fail
Appearance	Clear and free of foreign particles.	☒ Pass ☐ Fail
Additional Test		

QC Results:



Lane M: DL3000
Lane 1: 484691-5 plasmid
Lane 2: 484691-5 plasmid digested by SacI and HindIII



Certified by: David **Date:** 09/20/2014

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by **1,000 EZcoupon**™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com.

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: order@genscript.com Web: www.genscript.com

Page1 of 1

EK-1. Sipariş Verilen Genlerin Dökümanları

GenScript — Make Research Easy
CONFIDENTIAL

Certificate of Analysis

Project ID: 484691-6

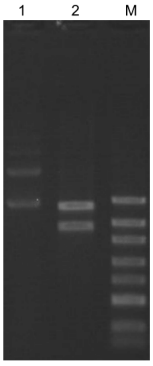
Construct Information:

Gene Name: PLAT(1762) **Gene Length:** 1762 bp

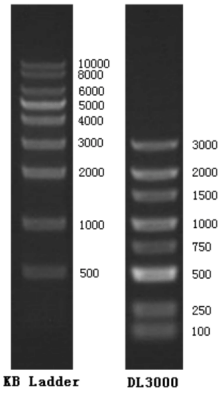
Cloning Vector: pUC57 **Cloning Strategy:** EcoRV **Clone ID:** B66638

QC Items	Specifications	Results
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	☒ Pass ☐ Fail
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	☒ Pass ☐ Fail
Reading Frame	☒ Not requested ☐ Frame is correct and consistent with client's requirement.	☒ Pass ☐ Fail
Restriction Digests	The size of inserted fragment is right and free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
PCR Amplification	Amplification is correct and construct is free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
DNA Quality	☒ Miniprep: 4 μg, OD260/280=1.7~2.0 ☐ Maxiprep: 100 μg, OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination.	☒ Pass ☐ Fail
Appearance	Clear and free of foreign particles.	☒ Pass ☐ Fail
Additional Test		

QC Results:



Lane M:DL 3000
Lane 1: 484691-6 plasmid
Lane 2: 484691-6 plasmid digested by KpnI and HindIII



Certified by: David **Date:** 09/24/2014

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by **1,000 EZcoupon**™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com.

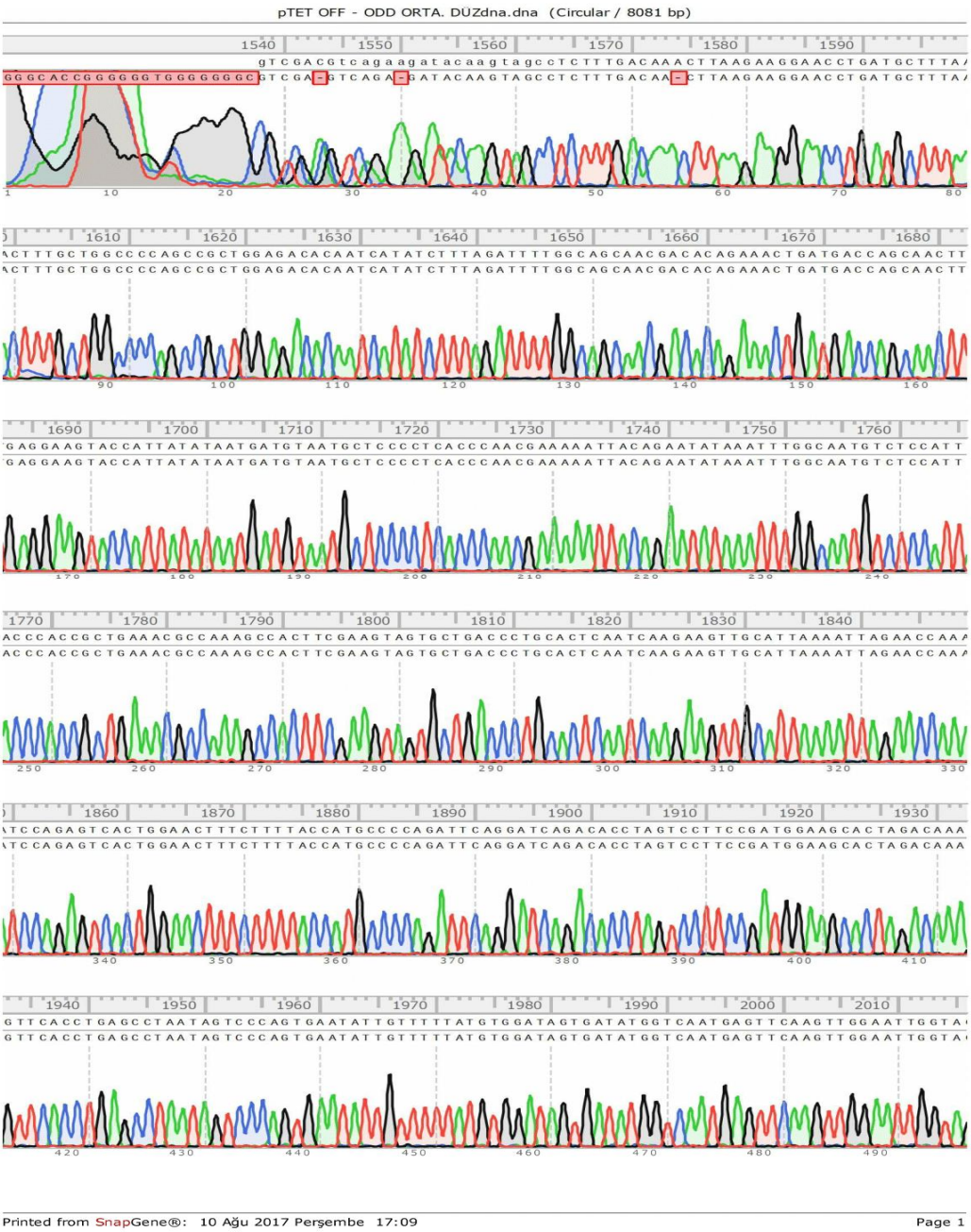
For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

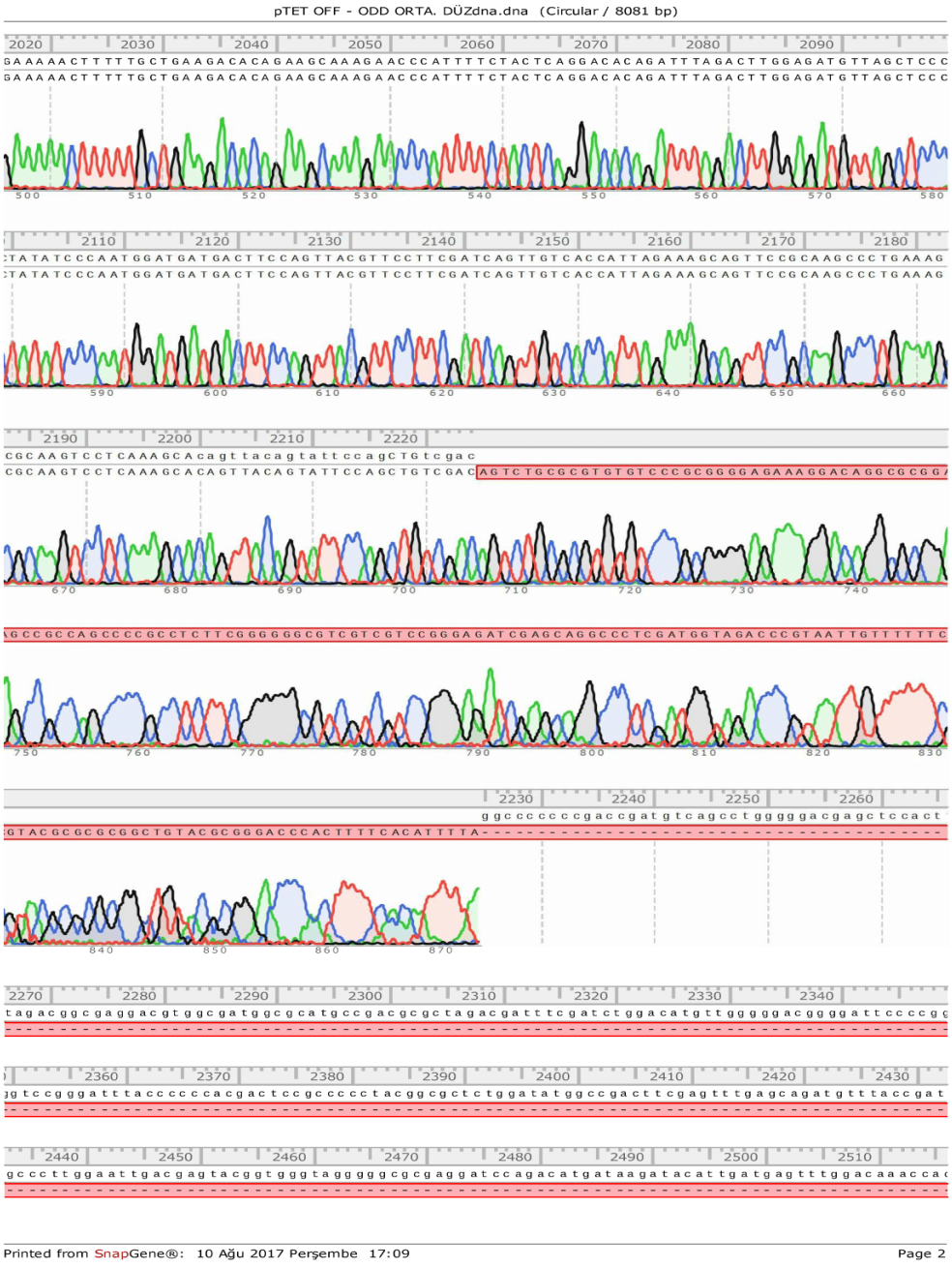
Toll-Free: 1-877-436-7274 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: order@genscript.com Web: www.genscript.com

Page1 of 1

EK-2. Sekans PZR Sonucu



EK-2. Sekans PZR Sonucu



EK-3. Etik Kurul Belgesi Bilgi Notu

TÜBİTAK

ETİK KURUL ONAY BELGESİ BİLGİ NOTU

Temmuz - 2014

Kurumumuza sunulan proje önerileri, insandan anket, mülakat, odak grup çalışması, deney vb. yollarla veri toplan-masını ve/ veya İnsan ve hayvanların (materyal/veriler dahil) deneysel ya da diğer bilimsel amaçlarla kullanılmasını öngörüyor ise başvuru öncesinde ilgili kurumun İnsan Araştırmaları Etik Kurulu/Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Çalışmaları Etik Kurulları/Klinik Araştırmalar Etik Kurulu/Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) Etik Kurul Onay Belgesi alınması zorunlu olup, belgenin son başvuru tarihine kadar Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na (ARDEB) iletilmesi gerekmektedir.

Etik Kurul Onay Belgesinin aşağıda belirtilen nitelikleri taşıması gerekmektedir:

- Proje yürütücüsünün adına olmalı,
- Belgede yer alan proje başlığı ile proje önerisinde belirtilen proje başlığı aynı olmalı,
- Belgenin aslı veya aslı gibidir onaylı kopyası olmalı,
- Ön koşulsuz olmalı (hayvan temini ile ilgili koşullar bu kapsam dışındadır),
- İlgili etik kurulu üye sayısının salt çoğunluğunu ve üyelerin imzalarını içeriyor olmalı,
- Proje ekibinde, ilgili etik kurul üyesi/üyelerinin bulunması durumunda, bu tür üye/üyelerin toplantı sırasında projenin tartışmalarına katılmamış olmaları (belgede söz konusu üye/üyelerin bu projenin tartışılmasına katılma-dığını belirten bir ibare olmalı ve imzası bulunmamalı),
- Onay tarihi proje son başvuru tarihi itibarıyla 2 (iki) yılı aşmamış olmalı,
- Hayvan araştırmaları etik kurul onay belgesi ilgili mevzuat kapsamında onaylanmış Yerel Etik Kurul'dan alınmış olmalı,
- Hayvan deneyleri çalışmalarında, belgenin deneylerin yapılacağı kurumdan alınmış olmalı.

Etik Kurul Onay Belgesinin yukarıda belirtilen nitelikleri taşımaması, gerekli olduğu halde başvuruya eklenmemiş ol-ması veya başvuru formunda gerekli olmadığı belirtildiği halde ilgili grup tarafından yapılan incelemede gerekli oldu-ğunun anlaşılması durumunda proje önerisi bilimsel değerlendirmeye alınmayarak başvuru sahibine iade edilecektir.

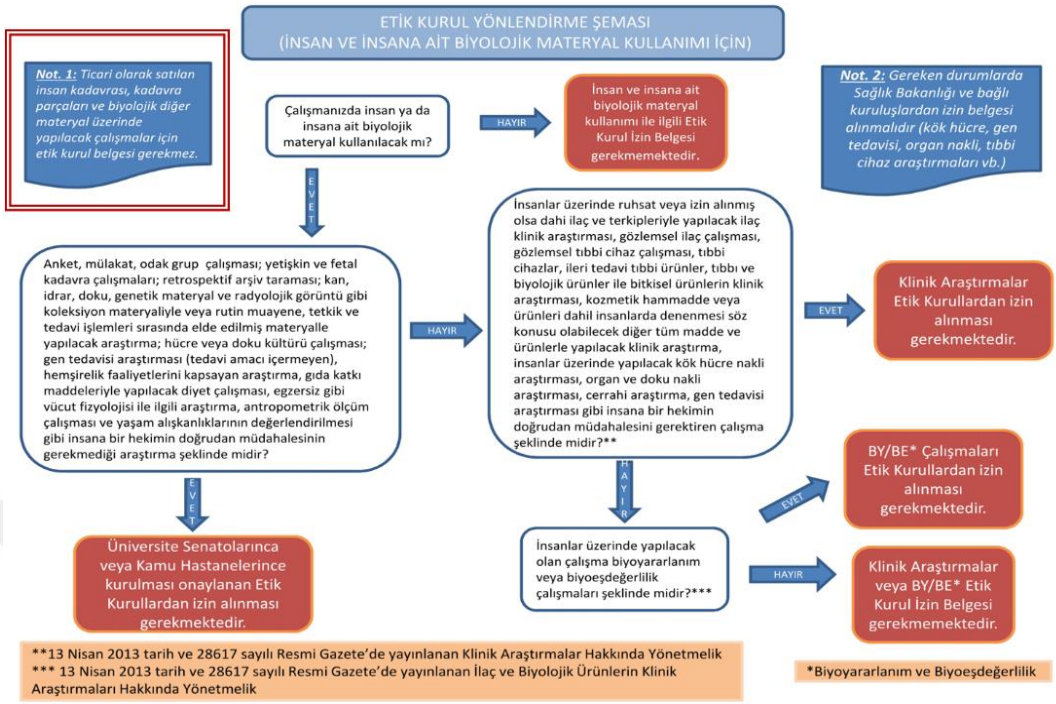
Kurumumuz yukarıda açıklanan gerekçelerle, değerlendirmeye alacağı tüm proje önerilerinde, ilgili mevzuat kapsa-mında işlem yapmakla yükümlüdür. Bu nedenle, Kurumumuza proje önerisi sunacak araştırmacıların, projelendir-dikleri çalışmalarının Etik Kurul Onayı gerekliliği ve/veya Etik Kurullarına başvuru koşulları hususunda soruları olması durumunda, öncelikle bulundukları kurum/kuruluşun Etik Kurulu'na başvurmaları gerekmektedir.

Araştırmacılarımıza yardımcı olmak amacıyla Kurumumuza başvurusu yapılan proje önerilerinde en sık rastlanan Etik Kurul Onay Belgesi gerektiren durumlar; bu durumlarda hangi kurum/kuruluştan ne tür etik kurul onay belgesi alınaca-ğına yönelik olarak hazırlanan "Etik Kurul Yönlendirme Şeması" aşağıda verilmiştir. Etik Kurul Onay Belgesi gerektiren hususlar bu örneklerle sınırlı değildir; aşağıdaki şemada bulunmayan, ancak onay belgesi gerektirebilecek diğer husus-lar mevcut olabilir. Bu gibi hususların önceden belirlenerek Etik Kurul Onay Belgesinin temin edilip başvuruya eklen-mesi proje yürütücüsünün sorumluluğundadır. Araştırmacılarımız, Etik Kurul Onay Belgeleri ile ilgili olarak aşağıda yer alan iletişim bilgileri aracılığıyla ARDEB personelinden bilgi alabilirler.

İletişim Bilgileri:Tel: 0-312-4685300/3322

Sorular ve öneriler için: http://forum.tubitak.gov.tr

EK-3. Etik Kurul Belgesi Bilgi Notu



Hücre kültürü çalışmalarında, ticari olarak satın alınmış olan HEK293T hücre hattı kullanılmıştır. Bu sebeple etik kurul belgesi, 13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan yönetmeliklere göre gerekmemektedir.

EK-4. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Ayşe Çelik
Doğum tarihi	: 5.12.1988
Doğum yeri	: Kastamonu
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: Türk Vatandaşı
Adres	: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 0 555 722 51 13
E-mail	: celik.ayse@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans	: 2008- 2013 Fatih Üniversitesi- Fen Edebiyat Fakültesi (Moleküler Biyoloji)
Lisans	: 2010- 2013 Fatih Üniversitesi- Mühendislik Fakültesi (Genetik & Biyomühendislik)
Doktora	: 2013- 2018 Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi – Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Tıbbi Genetik A.B.D.
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 86,25 (2017- Temmuz- Yökdil)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	