

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PARAOKSONAZ ENZİMİ KULLANILARAK
TRANSKRİPSİYONEL AKTİVİTE BELİRLENMESİNDE
YARARLANILACAK BİR ADAY HABERCİ SİSTEMİNİN
OLUŞTURULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEYLAN TOPRAK

BALIKESİR, ARALIK – 2013

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**PARAOKSONAZ ENZİMİ KULLANILARAK
TRANSKRİPSİYONEL AKTİVİTE BELİRLENMESİNDE
YARARLANILACAK BİR ADAY HABERCİ SİSTEMİNİN
OLUŞTURULMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEYLAN TOPRAK

BALIKESİR, ARALIK – 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ceylan TOPRAK tarafından hazırlanan “ **PARAOKSONAZ ENZİMİ KULLANILARAK TRANSKRİPSİYONEL AKTİVİTE BELİRLENMESİNDE YARARLANILACAK BİR ADAY HABERCİ SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 05.12.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Üye
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

ÖZET

**PARAKSONAZ ENZİMİ KULLANILARAK TRANSKRİPSİYONEL
AKTİVİTE BELİRLENMESİNDE YARARLANILACAK BİR ADAY
HABERCİ SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
CEYLAN TOPRAK
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI:YRD. DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, ARALIK - 2013

Paraoksonaz (PON) hem arilesteraz, hem de paraoksonaz (arildialkil fosfataz; E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, karaciğerde sentezlenen bir serum estereazdır. Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. İnsan serum paraoksonazı (PON1), 43 kDA molekül ağırlığında 354 amino asitlik bir proteindir ve ailede en popüler olan üyedir.

Tezimizde amaçlanan transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesinde kullanılacak alternatif bir salınan haberci sisteminin oluşturulmasıdır. Salınan haberci sistemlerin çalışma prensibinde temel olarak salınan haberci bir vektör bulunur. Bu vektör salınan lusiferaz geni ve onun üst kısmına promotor elementlerinin eklenmesine izin veren çoklu klonlama bölgesini (MCS) içerir. Salınan lusiferazın ekspresyonunu, ilgili promotor elementinin etkinliğini gösterir ve bu etkinlik tranfekte edilmiş hücrelerden alınan medyum örneğinden belirlenir. Çalışmamızda hedeflenen var olan sistemde kullanılan lusiferaz enzimi yerine paraoksonaz enziminin kullanımınıdır. İlk olarak haberci vektörde bulunan lusiferaz geni kesilerek çıkartılmış ve yerine PON1 geni klonlanmıştır. Vektördeki promotor klonlamaları için uygun olan MCS bölgesine CAIX promotor bölgesi klonlanarak haberci vektör rekombinant hale getirilmiştir. Hepatoma hücre hattı olan Hep3B hücrelerine transfeksiyonlar yapılarak yeni oluşturulan sistemin aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca PON1 geninin protein analizleri SDS page ve western blot çalışmalarıyla tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER:paraoksonaz(PON), lusiferaz, promotor, spektrofotometre, luminometre

ABSTRACT

GENERATING A CANDIDATE REPORTER SYSTEM USING PARAOXONASE ENZYME FOR DETERMINATION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY

**MSC THESIS
CEYLAN TOPRAK
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BİOLOGY**

(SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, DECEMBER 2013

Paraoxonase (PON) has both arylesterase and paraoxonase activity that is synthesized in liver. The paraoxonase (PON) gene family contains three members PON1, PON2 and PON3. Human serum paraoxonase(PON1) is a protein of 354 amino acids with a molecular mass of 43 kDa and most popular member of the family.

Aim of the our thesis is to generate a candidate secreted reporter system using paraoxonase enzyme for determination of transcriptional activity. There is a secreted reporter vector in the these secreted systems as a principle. These vectors contain a secreted lusiferace gene followed the multiple cloning site (MCS) used for the cloning of the promoter elements. Expression of the secreted lusiferace indicates the activation of the promoter elements and can be determined from the samples collected from the culture mediums.

The purpose of the this study is to use paraoxonase enzyme instead of lusiferace enzyme. First of all, the luciferace gene is removed from the vector by restriction digestion and PON1 gene was cloned. The vector has recombined by cloning of the CAIX promoter to the MCS site of the vector, activation of the novel system is tested by transfections to the hepatoma cell line, Hep3B. Protein analysis of the PON1 was also done by SDS PAGE and western blot analysis.

KEYWORDS:paraoxonase(PON), luciferase, promoter, spectrophotometer, luminometer

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
SEMBOL LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Paraksonaz (PON 1)	1
1.1.1 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi.....	1
1.1.2 Adlandırılması	1
1.1.3 Paraoksonaz Enzimi.....	2
1.1.4 Paraoksonaz Gen Ailesi	4
1.1.5 PON1'in Fonksiyonları.....	4
1.1.6 PON 1'in Subsratları.....	5
1.1.7 Serum PON 1 Aktivitesinin Ölçümü	6
1.2 Transkripsiyonel Regülasyon	7
1.3 Transfeksiyon	9
1.3.1 Transfeksiyon Metotları.....	11
1.3.1.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Yöntemi.....	11
1.3.1.2 Elektroporasyon Yöntemi	11
1.3.1.3 DEAE-Dekstran Yöntemi	12
1.3.1.4 Lipozom Yöntemi	12
1.4 Salınan Haberci Sistemler	13
1.4.1 Salınan Haberci Lusiferaz Sistemleri ve Avantajları.....	13
1.4.2 İki Yönlü Salınan Haberci Deneyi.....	14
1.5 Amaç	15
2. MATERYAL VE METOT	17
2.1 Materyal.....	17
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	17
2.1.2 Çalışmada kullanılan vektörler	19
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri soyları	22
2.1.4 Bakteriyel Kültür Ortamı	22
2.1.5 Antibiyotikler.....	22
2.1.6 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi.....	22
2.1.7 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	23
2.1.8 Transfeksiyon Çözeltileri.....	24
2.1.9 Lusiferaz ve SEAP (Secreted Alkaline Fosfatase-Salınan Alkalın Fosfataz) Çözeltileri.....	24
2.1.10 Spektrofotometrik aktivite tayininde kullanılan çözeltiler	25
2.1.11 Rekombinant protein ekspresyonunda kullanılan çözeltiler.....	26
2.1.12 Western Blot Çözeltileri	27
2.1.13 SDS PAGE Çözeltileri.....	27

2.2	Metotlar	28
2.2.1	Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	28
2.2.2	DNA İzolasyonu ve Klonlama.....	28
2.2.2.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR).....	28
2.2.2.2	Primer Tasarımı.....	28
2.2.2.3	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	29
2.2.2.4	Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	29
2.2.2.5	PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması.....	29
2.2.2.6	Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep).....	30
2.2.2.7	Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep).....	30
2.2.2.8	Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA nın kesilmesi	30
2.2.2.9	Kompetent Hücre Hazırlanması.....	31
2.2.2.10	Transformasyon.....	31
2.2.3	Hücre Kültürü Teknikleri.....	32
2.2.3.1	Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması.....	32
2.2.3.2	FCS Hazırlanması	32
2.2.3.3	BSA Hazırlanması.....	32
2.2.3.4	PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması.....	32
2.2.3.5	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu	33
2.2.3.6	Hücre Soyunun Başlatılması	33
2.2.3.7	Hücrelerin Büyütülmesi	33
2.2.3.8	Hücrelerin Pasajlanması.....	34
2.2.3.9	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı.....	34
2.2.3.10	Hücrelerin -80 °C de saklanması	35
2.2.3.11	Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon	35
2.2.3.12	Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	35
2.2.3.13	Paraksonaz Aktivitesinin Spektrofotometrik olarak ölçülmesi....	36
2.2.3.14	Rekombinant proteinin ekspresyonu ve analizi	36
2.2.3.15	SDS PAGE	37
2.2.3.16	Western Blot.....	37
2.2.3.17	Proteinlerin Belirlenmesi	38
3.	BULGULAR	39
3.1	Çalışma Planı.....	39
3.2	PON1 geninin alt klonlanması ve analizi	40
3.2.1	Primer tasarımı.....	40
3.2.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)	41
3.2.3	İnsan PON1 geninin pGEM-T Easy Vektörüne Alt Klonlanması....	42
3.2.4	İnsan PON1 Geninin Lusiferaz Haberci Vektörüne Alt Klonlama Yapılması.....	45
3.3	Transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesinde PON1'in kullanımı	49
3.4	Protein analizleri.....	56
3.4.1	İnsan <i>PON1</i> geninin ekspresyon vektörüne Alt Klonlama Yapılması ve <i>E.Coli</i> 'ye Transformasyonu	56
3.4.2	pET-30a vektörü ve içine klonlanan PON1 geninin BL21DE3 kompetent hücrelere transformasyonu.....	57
3.4.3	Rekombinant proteinin ekspresyonu ve analizi	57
3.4.3.1	Ekspresyonun IPTG ile indüklenmesi.....	57

3.4.3.2	Hücrelerin Yıkanması	58
3.4.3.3	Liziz Aşaması.....	58
3.4.3.4	SDS PAGE.....	58
3.4.3.5	Western Blot.....	59
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	61
5.	KAYNAKÇA	66
6.	EKLER.....	75

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) [12,16].2	
Şekil 1.2: Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi [17,20].....3	
Şekil 1.3: Paraoksonun PON1 tarafından p-nitrofenol ve dietil fosfata hidroliz reaksiyonu [9,31].....6	
Şekil 1.4: PON kataliziyle gerçekleşen tepkime [43].6	
Şekil 1.5: PON1 kataliziyle gerçekleşen Arilesteraz tepkimesi [8,44].....7	
Şekil 1.6: Gen ifadesinin kontrolü [49].8	
Şekil 1.7: Hücre kültüründeki transfeksiyon aşamaları [65].10	
Şekil 1.8: Kalsiyum fosfat transfeksiyonu [69]11	
Şekil 1.9: Lipozom ve plazmit yapısı [72-80]12	
Şekil 1.10: Salınan lusiferaz haberci deneyinin akış diyagramı [81].13	
Şekil 2.1: pMetLuc Kontrol vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi19	
Şekil 2.2: pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi ..20	
Şekil 2.3: pMetLuc haberci vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi20	
Şekil 2.4: pET-30a vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.....21	
Şekil 2.5: SEAP Kontrol vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi...21	
Şekil 2.6: Hep3B hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi33	
Şekil 2.7: Hemositometre34	
Şekil 3.1: İnsan PON1 geninin alt klonlaması ve analizinin akış diyagramı.....39	
Şekil 3.2: PON1 primerlerin saç tokası oluşturma potansiyelleri A) Forward primer B) Reverse primer.....41	
Şekil 3.3: PZR jel görüntüsü M: 1 kb Marker ; 1: 1 nolu örnek ; 2: 2 nolu örnek ; 3: 3 nolu örnek ; P.K : Pozitif kontrol ; N.K : Negatif kontrol42	
Şekil 3.4: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan PON1 geninin SalI ve Not I ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü. M : 1 kb marker, 1 :1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi, 3: 3.koloni kesimi, 4: 4. Koloni kesimi, 5: 5.koloni kesimi, 6: 6. Koloni kesimi, 7 :7 .koloni kesimi, 8 :8 .koloni kesimi, 1a: 1.koloninin miniprebi, 2a: 2.koloninin miniprebi, 3a: 3.koloninin miniprebi, 4a: 4.koloninin miniprebi, 5a: 5.koloninin miniprebi, 6a: 6.koloninin miniprebi, 7a: 7.koloninin miniprebi, 8a: 8.koloninin miniprebi.43	
Şekil 3.5: Klonlanan ve dizi analizine gönderilen insan PON1 gen dizisi ile S64615.1 gen bankası erişim numaralı DNA data bankasındaki insan PON1 klonunun karşılaştırılması45	
Şekil 3.6 : Klonlama basamakları46	
Şekil 3.6 'nın devamı47	
Şekil 3.7: pMetLuc vektörüne klonlanan PON1 geninin SalI ve Not I ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M : 1 kb marker ,1 :1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi, 3: 3.koloni kesimi, 4: 4. Koloni kesimi, 5: 5.koloni kesimi, 6: 6. Koloni kesimi, 1a : 1.koloninin miniprebi, 2a : 2.koloninin miniprebi, 3a : 3.koloninin miniprebi, 4a : 4.koloninin miniprebi, 5a : 5.koloninin miniprebi, 6a : 6.koloninin miniprebi.....48	

Şekil 3.8: pMetLuc vektörüne klonlanan CAIX promotorunun Bgl II ve Pst I ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M : 1 kb marker ,1 :1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi, 3: 3.koloni kesimi, 4: 4. Koloni kesimi,1a: 1.koloninin miniprebi, 2a: 2.koloninin miniprebi, 3a: 3.koloninin miniprebi, 4a: 4.koloninin miniprebi.....	49
Şekil 3.9: Transfeksiyonda kullanılan vektörler	50
Şekil 3.10: pMetLuc kontrol vektörünün (1 numaralı konstrakt-şekil 3.9) lusiferaz sonuçları	51
Şekil 3.11: SEAP kontrol vektörünün (5 numaralı konstrakt-şekil 3.9) seap sonuçları	51
Şekil 3.12: 154 bç promotor parçasının (3 numaralı konstrakt-şekil 3.9) lusiferaz sonuçları	52
Şekil 3.13: 154 bç promotor parçasının (3 numaralı konstrakt-şekil 3.9) seap sonuçları	52
Şekil 3.14: pMetLuc vektörü içinde bulunan CAIX promotorunun (3 numaralı konstrakt-şekil 3.9) Lusiferaz/SEAP aktivitesi optimizasyon sonuçları (0,5 µg, 1 µg ve 2 µg)	53
Şekil 3.15: pMetLuc vektöründen lusiferaz geni çıkartılarak yerine PON1 geninin klonlanması ile oluşturulan 2 numaralı konstrakt için (şekil 3.9) seap sonuçları.....	53
Şekil 3.16: PON1 geni ve CAIX promotorunu içeren pMetLuc vektörünün(4 numaralı konstrakt-şekil 3.9)seap sonuçları.....	54
Şekil 3.17: 1 µg ve 0,5 µg PON1 ve PON1+CAIX un 24 saat spektrofotometre aktivite sonuçları	54
Şekil 3.18: 1 µg ve 0,5 µg PON1 ve PON1+CAIX un 48 saat spektrofotometre aktivite sonuçları	55
Şekil 3.19: 1 µg ve 0,5 µg PON1 ve PON1+CAIX un 72 saat spektrofotometre aktivite sonuçları	55
Şekil 3.20: Negatif kontrollerin(N.K) 48 ve 72 saat spektrofotometre aktivite sonuçları	55
Şekil 3.21: pET-30a vektörüne klonlanan PON1 geninin SalI ve Not I ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M: 1 kb marker, 1: 1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi.	57
Şekil 3.22: SDS jel görüntüsü M: Marker, 1: BL_21(DE3) kompetan hücresi, 2: pET-30a vektörü, 3: 0,5 mM IPTG ile indüklenmiş pet30a vektörü içindeki PON1, 4: 1 mM IPTG ile indüklenmiş pET-30a vektörü içindeki PON1	59
Şekil 3.23: İnsan PON1 proteinin işaretlenmesinin film üzerinde gösterimi.1: BL_21(DE3) kompetan hücresi, 2: pET-30a vektörü içindeki PON1, 3: pET-30a vektörü.....	60
Şekil 6.1: Fermentas 1 kb DNA marker	75
Şekil 6.2: Fermentas 50 bp DNA marker	76
Şekil 6.3: Pageruler protein markerları (Thermo)	76

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: İnsan PON1 enziminin substratları [9,31].	5
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar	17
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	18
Tablo 2.3: <i>DH5α</i> kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar	22
Tablo 2.4: <i>BL_21(DE3)</i> kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan tritilasyon tamponu	23
Tablo 2.5: Agaroz jel elektroforezi solüsyonları	23
Tablo 2.6: Transfeksiyon çözeltileri	24
Tablo 2.7: Lusiferaz aktivite ölçüm çözeltileri	24
Tablo 2.8: SEAP aktivite ölçüm çözeltileri	25
Tablo 2.9: Aktivite tamponları	25
Tablo 2.10: Bakteri yıkama tamponu	26
Tablo 2.11: Liziz tamponu	26
Tablo 2.12: PMSF (Fenilmetilsülfonil Florür) stok solüsyonu	26
Tablo 2.13: Lizozim stok solüsyonu	26
Tablo 2.14: Western Blot çözeltileri	27
Tablo 2.15: SDS PAGE çözeltileri	27
Tablo 3.1: Dizayn edilen özel primerin dizisi, Tm değeri ve uzunlukları	40
Tablo 3.2: İnsan PON1 geninin amplifikasyonu için PZR koşulları	42

SEMBOL LİSTESİ

PON1
SDS
PAGE
BSA
FCS
PZR
LB
DNA
RNA
mRNA
IPTG
HDL
LDL
EDTA
DMSO
E.coli
UV
RPM

Paraoksonaz lenzimi
Sodyum dodesil sülfat
Poliakrilamid jel elektroforezi
Sığır serum albümin
Fetal sığır serumu
Polimeraz zincir reaksiyonu
Luria broth
Deaksiribonükleik asit
Ribonükleik asit
Mesajcı ribonükleik asit
İzopropil β -D-tiogalaktopiranozit
High density lipoprotein
Low density lipoprotein
Ethylendiamintetrasedik asit
Dimetil sulfoksit
Escherichia coli
Ultra viyole
Dakikadaki dönüş sayısı

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel aşamaları, Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma laboratuvarlarında yapılmıştır. Tez çalışmalarım Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM danışmanlığında yürütülmüş ve sonuçlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, tecrübe ve deneyimlerini benimle paylaşan sabır, anlayış ve kararlılığını örnek aldığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM'a,

Tezimin yürütülmesi aşamasında, akademik bilgi birikimini ve bilimsel desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Laboratuvar çalışmalarım deneysel ve teorik bilgi birikimiyle bana yol gösteren sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Sümeyye Aydoğan TÜRKÖĞLU'na,

Çalışmalarımın deneysel aşamasında yardımlarıyla yanımda olan sevgili hocalarım Doç. Dr. Selma SİNAN, Yard. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY, Araş. Gör. Dr. Meltem ALPER, Araş. Gör. Dr. Görkem Deniz SÖNMEZ, Dr. Öznur SUAKAR, Dr. Ayla Solmaz AVCIKURT, Esra Solmaz TOKAY, Gülçin ÇETİN'e,

Desteklerini gördüğüm laboratuvardaki grup arkadaşlarım Tuğşen AYDEMİR, Derya OKUYAN, Gizem GÜLER, Serhad ONAT, Kubilay GÜNERHAN ve Ece CEYLAN'a,

Balıkesir'e geldiğim yıldan itibaren sevgisi, arkadaşlığı ve bilimsel bilgi birikimiyle her zaman yanımda olan ve beni sürekli motive eden canım kardeşim Merve KARAMAN'a,

Lisansa başladığım yıldan bu yana destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Güliz AYKOL, Tuğba BOZATLI, Berrin VAROL, İbrahim EMECİ, Latife Merve OKTAY, Merve TÜRKÖZ, Gökhan KIZILYÜCE, Nagihan YILMAZ ve tüm lisans arkadaşlarıma,

Yüksek lisans dönemi boyunca en eğlenceli ve güzel günlerimi geçirdiğim ev arkadaşlarım Nurten GÜNGÖR, Kadriye ZENGİN, Fatma GÜNGÖR ve fahri ev arkadaşım canım Mihrap Yaşar KAYA'ya,

Eğitim hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini benden bir an olsun esirgemeyen, amaçlarım doğrultusunda beni yönlendiren canım annem Medine TOPRAK, babam Hüseyin TOPRAK ve abim Altan TOPRAK'a,

Son olarak sevgi dolu kalpleriyle bana her zaman destek olan canım teyzelerim Güllü CAN ve Cezair CAN'a çok teşekkür ederim...

1. GİRİŞ

1.1 Paraksonaz (PON 1)

1.1.1 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi

Paraoksonaz enzimi ilk olarak organofosfor zehirlenmesine karşı koruyucu bir bariyer olarak tanımlanmıştır. 1946 yılında Abraham Mazur tarafından keşfedilen enzim, sonraki yıllarda insan serum paraoksonazı (PON1) olarak tanımlanmış olup son derece zehirli organofosfat tarım ilacı parationun toksik metaboliti paraoksonu (organofosfat substratı) hidroliz edebilmesinden dolayı bu ismi almıştır [1-5].

1953 yılında Norman Aldridge tavşan ve sıçanların farklı dokularında paraokson hidrolizi ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Aldridge tavşan plazmasında çok yüksek PON1 seviyeleri bulunduğunu ve paraoksonazın saflaştırılmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Esterazlar iki gruba ayrılmıştır, substratları hidrolize ederken katalitik olanlar A-esterazlar ve substratların hidrolize olmasını inhibe edenler B-esterazlar. Paraoksonaz A-esteraz grubunda yer alır. 1961 yılında Uriel paraoksonazı insan serumunda elektroforezden sonra HDL immunopresipitatlarında saptamıştır [1,4,6,7].

Plazmada yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)ye bağlı olarak bulunduğu belirlendikten sonra, PON'un fizyolojik fonksiyonlarına yönelik çalışmalar giderek artmıştır. Günümüzde PON'un kardiyovasküler fizyolojideki yeri, lipid ve lipoprotein metabolizmasıyla ilişkisi, potansiyel antiaterojenik etkisi ve peroksidatif hasara karşı antioksidan özellikleri, yoğun bir şekilde araştırılmakta ve gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır [8].

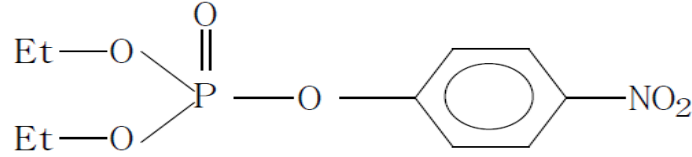
1.1.2 Adlandırılması

PON1 enzimi adını laboratuvarında en sık kullanılan substratı olan paraoksondan almıştır. Aslında PON1 bazı sentetik substratlara karşı çok iyi bir

esteraz olmasına rağmen, paraoksonaz aktivitesi biraz zayıftır. PON1 çok geniş substrat yelpazesi olan bir hidrolazdır [9-11].

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksonaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [12,13].

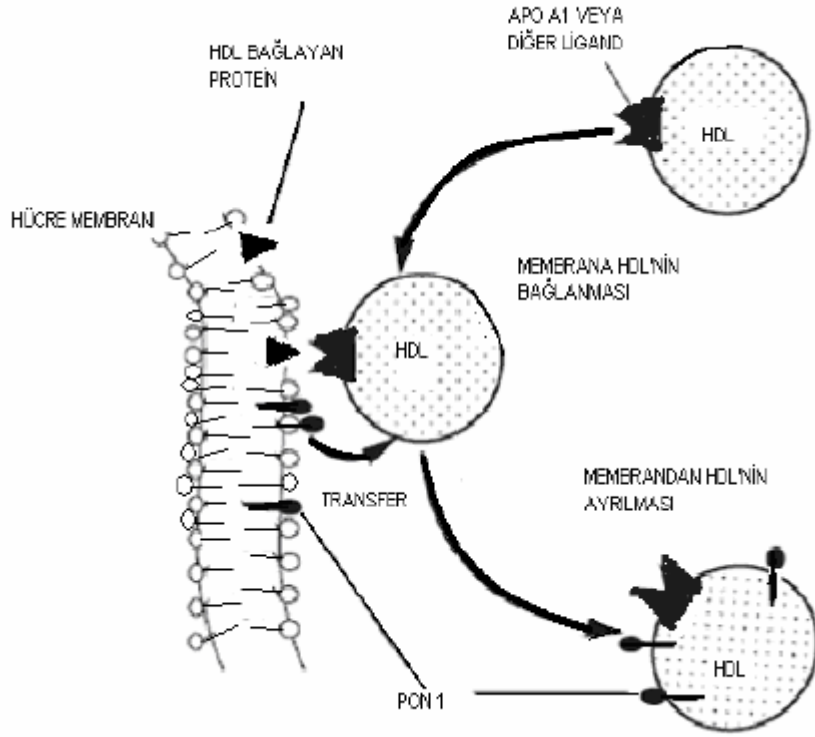
Ancak isimlendirme komitesi bu sınıflandırmayı tekrar düzenleyerek enzimi enzim kodu girişi E.C 3.1.8 olan fosfo triester hidrolazlar veya organofosfat hidrolazlar grubunun 1 numaralı enzimi olarak belirlenmiştir [14,15].



Şekil 1.1: Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) [12,16].

1.1.3 Paraoksonaz Enzimi

Paraoksonaz (PON) hem arilesteraz, hem de paraoksonaz (arildialkil fosfat; E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti olan paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum esterazdır. Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat gibi organik fosforlu insektisitlerle aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının, çeşitli karbamatların, birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir. İnsan serum paraoksonazı (PON1), 43 kDA molekül ağırlığında 354 aminoasitlik bir protein olup, fiziksel olarak HDL ile bağlantılıdır. PON1 hücre membranının dış yüzeyinde bulunur ve lipoproteinler vasıtasıyla HDL'ye geçer [17-21].



Şekil 1.2: Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi [17,20].

Ağırlığının %15'ini oluşturan karbohidrat üniteleri, 4 farklı konumda proteine bağlı olarak bulunur. PON1'in aminoasit bileşimi incelendiğinde, lösin içeriğinin yüksek olmasına karşılık, krigle yapısına sahip olacak kadar sistein içermediği görülür. Bununla beraber, 42. , 284. ve 353. konumlarda yer alan sistein rezidülerinin, PON1'in yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunduğu söylenebilir. Protein yapısında bulunan tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin siklik yapıda olmasına neden olmaktadır [17,20-22]. PON'un başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır: Bir pestisit olan paraokson gibi organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonuna katılmak ve ayrıcalipid peroksitleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan korumak. PON1 lipid peroksitlerin yanı sıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir ve bu nedenle peroksidaz benzeri aktiviteye de sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca lipopolisakkarit inaktivasyonu yoluyla bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlar. Antioksidan ve antiinflamatuvar özellik gösterdiği de gösterilmiştir [17,23-25].

1.1.4 Paraoksonaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır. İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*' ta bulunmuştur.

Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir [13, 16, 22, 26-32].

1.1.5 PON1'in Fonksiyonları

Organofosfatlara Karşı Koruma (Hidrolitik Aktivite): PON1'in en iyi bilinen fonksiyonu, hidroliz yoluyla, organofosfat türevi sinir gazlarını ve insektisitleri zararsız hale getirmesidir. İnsektisit olarak yaygın olarak kullanılan paratiyon ve klorpiroposokson gibi organofosfat bileşikleri ile soman ve sarin gibi sinir gazları, PON1'in başlıca substratlarıdır. Ancak, memelilerde bulunan PON1'in bu substratlara karşı afinitesi düşük olduğundan, tarımsal alanda çalışanlarda organofosfat zehirlenmelerine sık rastlanır. Bununla beraber, kronik olarak düşük dozda organofosfat türevlerine maruz kalanlarda, PON1'in daha etkili olduğu bildirilmektedir [8,33-36].

Bakteriyal Endotoksinlerden Kaynaklanan Toksikiteye Karşı Koruma: Son yıllarda, HDL kompleksinin, gram negatif enfeksiyonlar sırasında gelişen endotoksemiye karşı savunmada rol oynadığı; bakteriyal lipoprotein polisakkarid ile makrofaj özel protein CD14 arasındaki etkileşimin, HDL tarafından henüz bilinmeyen bir mekanizmayla önlediği düşünülmektedir. Böylece, KC ve böbrek yetmezliğine, septik şokun çeşitli semptomlarına ve hatta ölüme yol açabilen TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımı engellenmektedir. PON1'in sitokinlerin salınımının önlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir [8,33].

LDL ve HDL Oksidasyonunun Önlenmesi: Oksidatif stres altında lipid peroksidasyonu sadece LDL'de değil; HDL'deki lipidlerde de meydana gelmektedir. PON1'in hem LDL'yi, hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir. PON1'in HDL vasıtasıyla antioksidan etkiye katkıda bulunduğu ve HDL'nin inhibitör etkisinde, metal iyon seleksiyonu ve/veya peroksidaz benzeri aktivite ile ilişkili olabileceği ileri

sürülmektedir. HDL-PON1, uzun zincirli okside fosfolipidleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine koruyucu etkisinin öncelikle PON'dan kaynaklandığı düşünülmektedir.

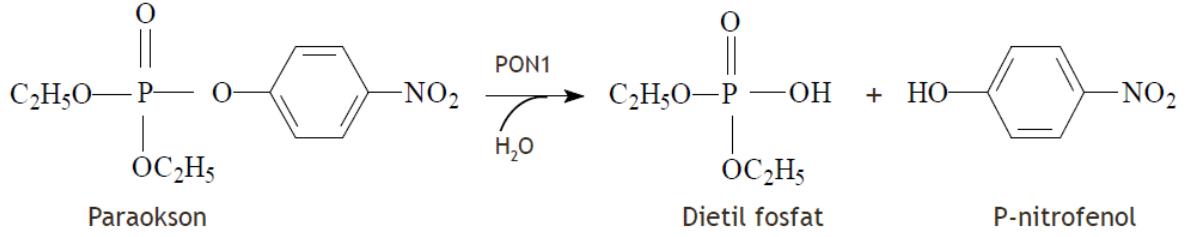
PON1'in, Cu^{+2} 'nin indüklediği lipoprotein oksidasyonunu in vitro olarak inhibe ettiği ve nonkompetitif PON1 inhibitörlerinin serbest radikal oluşumunu ve Cu^{+2} 'nin indüklediği HDL oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir [8,35,37-39].

1.1.6 PON 1'in Substratları

PON1'in hidroliz ettiği substratlar arasında paration, diazinon ve klorprifos gibi organofosfatlı insektisitlerin toksik okson metabolitleri; sarin, soman ve tabun gibi sinir gazları; fenil asetat gibi aromatik esterler; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -butirolakton ve homosistein tiolakton gibi birçok aromatik ve alifatik lakton ile siklik karbonatlar yer almaktadır [9,10,12].

Tablo 1.1: İnsan PON1 enziminin substratları [9,31].

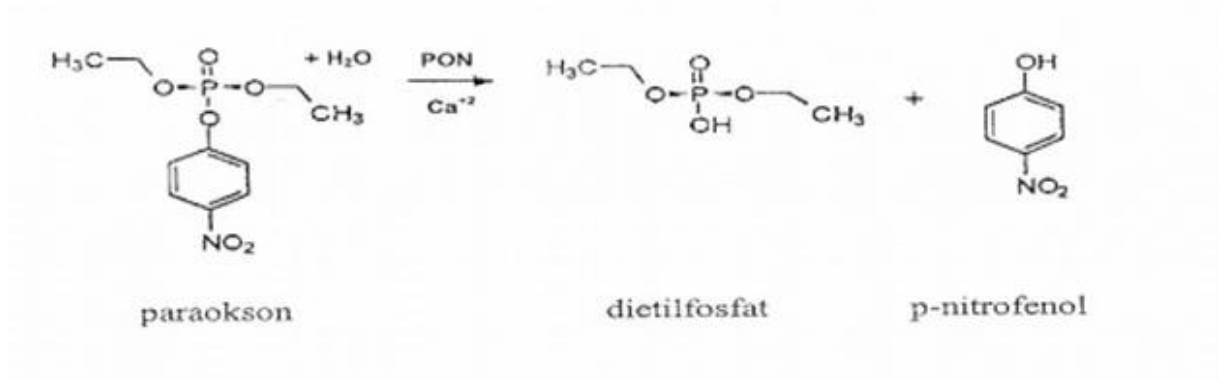
Organofosfatlı Bileşiklerin Okson Metabolitleri	
Paraokson Metil paraokson Pirimifos-metil paraokson Klorpirifos okson Diazokson Klortion okson EPN okson Fenitrokson	
Sinir Gazları	Siklik Karbonatlar
Soman Sarin Tabun Armin	Prulifloksasin
Alifatik Laktonlar	Aril(aromatik) Esterler
Dihidrokarumarin γ -butirolakton homosistein tiolakton	Fenil asetat Tiofenilasetat 2-naftilasetat
Aromatik Laktonlar	Fosfolipit Hidroperoksitler



Şekil 1.3: Paraoksonun PON1 tarafından p-nitrofenol ve dietil fosfata hidroliz reaksiyonu [9,31].

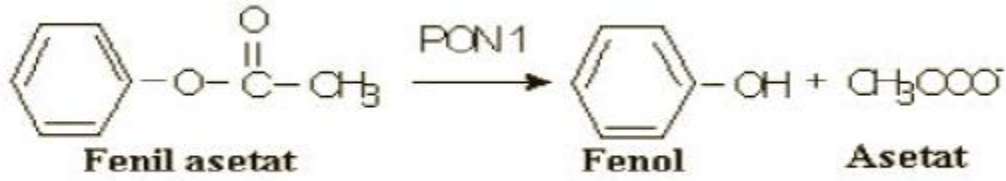
1.1.7 Serum PON 1 Aktivitesinin Ölçümü

Paraksonaz aktivitesi: Eckerson [40] tarafından geliştirilen yöntemde Paraokson'un, PON1 tarafından hidrolizi ile oluşan sarı renkli paranitrofenolün neden olduğu absorbans artışı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Örnekteki enzim (PON1) reaksiyon ortamındaki paraokson substratını hidroliz eder ve açığa çıkan ürünün absorbans artışı 412 nm'de kinetik olarak izlenir. Son yıllarda PON1 ölçüm yöntemi otoanalizörlere de uyarlanmış olup, ölçümler serum veya heparinli plazmada yapılmakta, kalsiyum bağlayan EDTA'lı örnek kullanılmamaktadır [1,41,42].



Şekil 1.4: PON kataliziyle gerçekleşen tepkime [43].

Ariesteraz aktivitesi: Aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetat, enziminin ariesteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır [8,44].

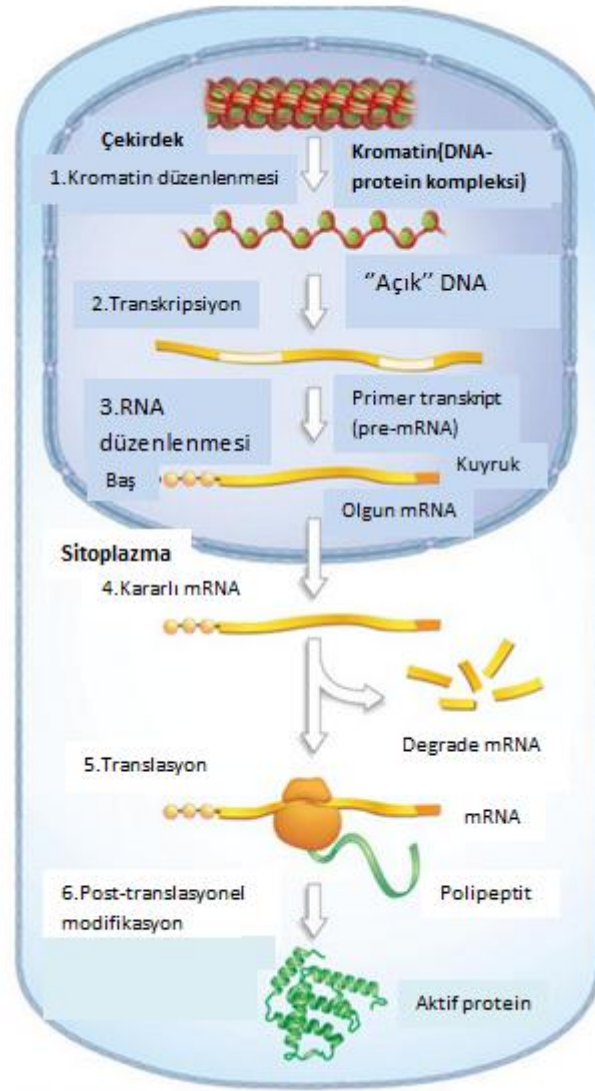


Şekil 1.5: PON1 kataliziyle gerçekleşen Arilesteraz tepkimesi [8,44].

1.2 Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, hücresel farklılaşmanın ve her türlü hücresel işlevin odak noktasını oluşturmaktadır. Çok hücreli bir organizmanın tüm hücreleri aynı genetik materyale sahip olmasına rağmen, hücre tipleri farklı fonksiyonlara sahiptir ve çevreden gelen sinyallere farklı cevaplar verir. Hücreler aynı genetik bilgiye sahip olmalarına rağmen, bu bilgi her hücre tipi için farklı şekillerde işlenmektedir. Organizma gen regülasyonu sayesinde, belirli bir hücre tipinde belirli bir gen takımını, farklı hücre tiplerinde ise diğer farklı gen takımını çalıştırabilme yeteneğine sahip olmaktadır. Çok hücreli organizmalarda gen regülasyonu, genomun özgün kısımlarını etkin hale geçiren, diğer genleri baskılayan kontrol mekanizmaları ile açıklanmaktadır [45,46].

Gen ekspresyonu sürecinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi, hücrelerin çevresel uyarıcılara ve metabolik ihtiyaçlarına cevap verilmesi yani gelişiminin ve farklılaşmasının da kontrolü anlamına gelmektedir. DNA'da şifrelenmiş olarak bulunan genetik bilginin protein şekline dönüşmesi süreci, DNA'nın RNA'ya transkripte olması, RNA'nın işlenmesi, protein sentezi (translasyon) ve post-translasyonel değişikliklerin yapıldığı basamaklardan oluşmaktadır. Bu basamakların her birinde gen ekspresyonunun kontrolü mümkün olsa da, hücrelerde mutlak gerekli olan ve maksimum enerji tasarrufu açısından da önem teşkil eden transkripsiyon basamağındaki kontrol en yaygın olanıdır ve genlerin çoğunluğunda bu basamakta regülasyon yapılmaktadır. Transkripsiyon basamağındaki kontrol genin ifade olup olmayacağına dair karar verilen kontrol aşaması olarak açıklanabilir [45,47,48].



Şekil 1.6: Gen ifadesinin kontrolü [49].

Ökaryotlarda gen ifadesinin başlangıç aşaması, genin düzenleyici dizisi olan promotor bölgesine özel proteinlerin ve ardından RNA polimeraz II enziminin bağlanması ve transkripsiyonun başlaması şeklinde gerçekleşmektedir. RNA polimeraz II ökaryotlarda bulunan üç RNA polimerazdan bir tanesidir ve hücrede mRNA ve diğer birçok küçük RNA'ların transkripsiyonundan sorumlu olan enzimdir. RNA polimerazII'nin aktivitesi genellikle transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarı kısmında bulunan düzenleyici DNA dizileri (cis-acting elements) ile bağ yapabilen birtakım özel proteinler (trans-acting) arasındaki etkileşime bağlıdır [45,47,50-53].

Bu diziler genellikle transkripsiyonun başlangıç noktasının üst kısmında 5' bölgede bulunurlar. Transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumlu olan düzenleyici DNA dizileri temel olarak;

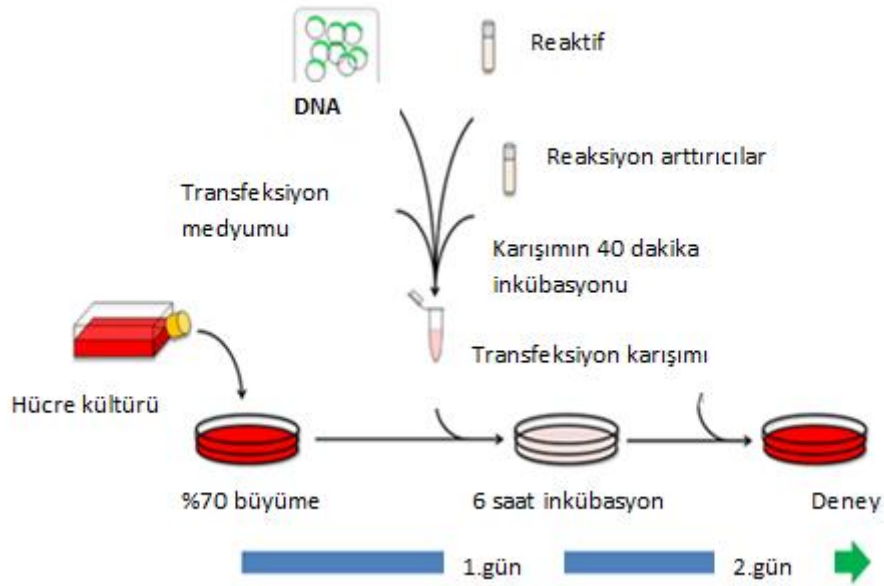
- 1- **Bazal promotor elementleri;** başlangıç noktasının tanımlanmasında ve transkripsiyonun bazal seviyede minimum oranda devam etmesinde önemli rol oynarlar.
- 2- **Yukarı bölge düzenleyici elementler**
- 3- **Enhansırlar;** promotor aktivitesini arttırıcı dizilerdir.
- 4- **Silensırlar;** enhansırlara benzeyen şekilde görev alırlar fakat transkripsiyonu baskılayan dizilerdir.
- 5- **Lokus kontrol bölgeleri;** birçok geni içeren lokusun ekspresyonunu düzenleyici dizilerdir [45,47,54-58].

Trans-acting faktörler veya transkripsiyon faktörleri özel DNA dizilerine bağlanıp RNA polimeraz II ile etkileşerek transkripsiyonu etkiler. Genel transkripsiyon faktörleri II. sınıf genlerin çekirdek promotor dizilerine bağlanarak transkripsiyonun başlangıç aşamasında RNA polimeraz II ile etkileşirler. Düzenleyici transkripsiyon faktörleri ise fonksiyonlarını çekirdek promotorun alt ya da üst kısmında bulunan dizilere bağlanarak ve genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek gerçekleştirirler. [45, 52, 59-61].

1.3 Transfeksiyon

Transfeksiyon analizleri özellikle gen ekspresyonunun regülasyonu çalışmasında kullanılan en önemli tekniktir. Genel olarak ökaryotik bir hücreye DNA gibi yabancı bir genetik materyalin aktarılmasına transfeksiyon denir [62].

Elektroporasyon transfeksiyon için kullanılan en yaygın fiziksel gen aktarım yöntemidir. Kalsiyum fosfat yöntemi, DEAE-Dekstran yöntemi ve lipozom benzeri transfeksiyon ajanlarının kullanılması ile gen aktarımı ise kimyasal gen aktarım yöntemlerine örnektir. Viral vektörler kullanıldığında ise, çıplak DNA transferi yapılmaz, bunun yerine ilgilenilen gen bir virüs ile birlikte hücrelere transfer edilir. Transfeksiyon için hangi yöntemin en doğru ve en etkili olduğu, kullanılan hücre tipine ve amaçlanan deney sistemine bağlıdır [62,63,64].



Şekil 1.7: Hücre kültüründeki transfeşiyon aşamaları [65].

Transfeşiyon genel olarak geçici ve kalıcı transfeşiyon olmak üzere iki alt başlığa ayrılır [62,66].

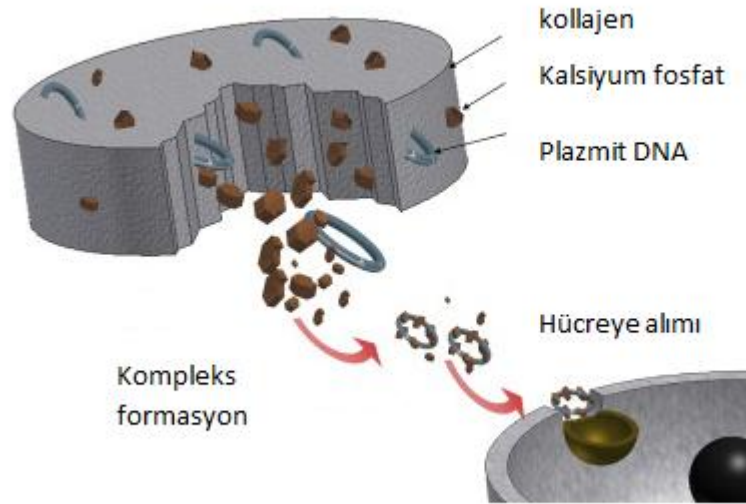
Geçici transfeşiyonda hücre içine alınan DNA nükleer genoma katılmadığından, transfeşiyonun gerçekleştiğı hücre bölünme sürecine girdikçe plazmidleri kaybeder. Aktarılan genin hücre genomuna katılması ve yavru hücrelere de bu genin aktarılması için kalıcı transfeşiyon yöntemi kullanılmalıdır. Kalıcı transfeşiyon tekniğinde ise transfekte edilen DNA kromozomal DNA'ya entegre olur. Doğrusal plazmit kullanılması kararlı transfeşiyonun etkisinin maksimum olmasını sağlar. Markerlar kullanılarak transfeşiyon sonuçları analiz edilir. Aminoglikozid fosfotransferaz (APH; *neoR* gene) ya da higromisin B fosfotransferaz (HPH) genlerini kodlayan markerler sıklıkla kullanılmaktadır [50,67].

Seçilim süreci sonunda bölünen hücrelerin genoma katılmamış plazmidi dışarı atmaları sonucu sadece bu direnç genini kendi genomuna katmış olan hücreler yaşayıp çoğalabilecek, diğerleri ise eleneceklerdir. Seçilim baskısı bu şekilde devam ettirildiğinde ilaç direnç genlerini genomlarına katmış "kalıcı transfeşiyonun sağlandığı hücre hatları" elde edilir [62,66].

1.3.1 Transfeksiyon Metotları

1.3.1.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Yöntemi

Günümüzde transfeksiyon deneylerinde sıkça kullanılan kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi Graham ve Van der Eb tarafından 1973 yılında bulunmuştur. Bu yöntemin ilk aşamasında kalsiyum iyonları DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanır. İkinci aşamada ise içeriği fosfat olan karışım eklenerek kalsiyum iyonlarına iyonik bağlanır. Bu olaydan sonra kristal bir kompleks oluşur ve belli bir süre geçtikten sonra gözle görülür bir şekilde presipitasyon meydana gelir. Presipitasyon sonunda meydana gelen kristal kompleksler hücre yüzeyine doğru gelir ve bunun sonucunda endositoz ile hücre içine doğru çekilir [50,68].



Şekil 1.8: Kalsiyum fosfat transfeksiyonu [69]

1.3.1.2 Elektroporasyon Yöntemi

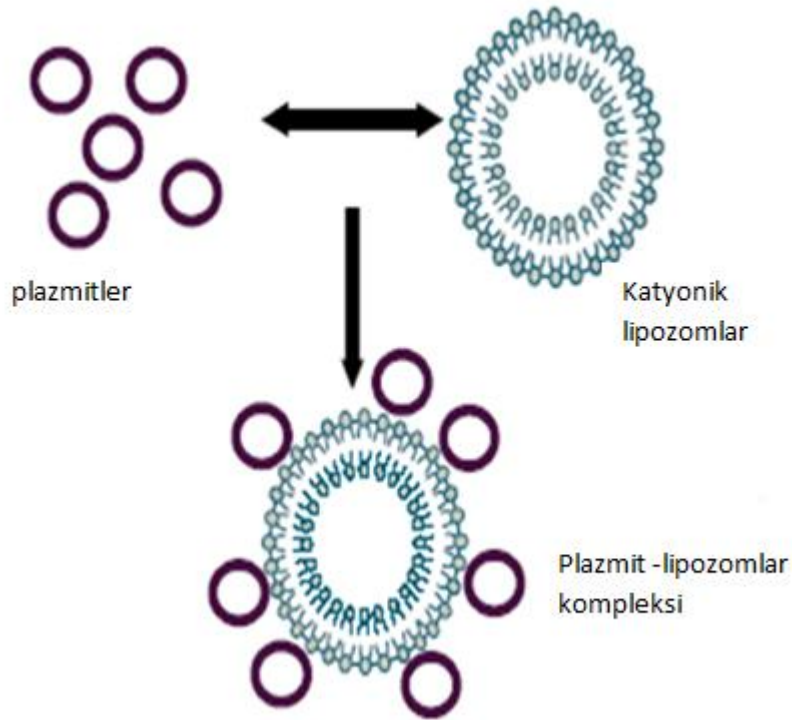
Gen aktarımı çalışmalarında kullanılan elektroporasyon yöntemin temelinde, hücre kültüründeki hücreler elektrik akımı ile muamele edilir. Gerçekleşen bu akım sayesinde DNA hücre içine geçer. DNA'nın hücre içine geçmesi sırasında hücre zarında bir takım değişiklikler meydana gelir. Kullanılan bu metot geçici olarak ifade sağlar [50,68].

1.3.1.3 DEAE-Dekstran Yöntemi

Polikasyon olan dietilaminoetil dekstran DNA'ya elektrostatik olarak bağlanır. DNA'nın hücre içine alınımı ise elektrik akımı ile hücre membranında meydana gelen değişmelerle gerçekleşir. Yöntem kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemine bu bakımdan benzemektedir, fakat değişik bir formudur [50,70].

1.3.1.4 Lipozom Yöntemi

Lipitlerden meydana gelen lipozomlar temelde DNA'yı içlerine alma durumlarına göre katyonik ve pH duyarlı lipozomlar olarak ikiye ayrılır. Artı yüklü olan katyonik lipozomlar eksi yüklü olan DNA ile kompleks oluştururlar. Bunun tersi olarak pH duyarlı lipozomlar eksi yüklü oldukları için DNA ile kompleks oluşturamazlar ancak içlerine alabilirler [71].

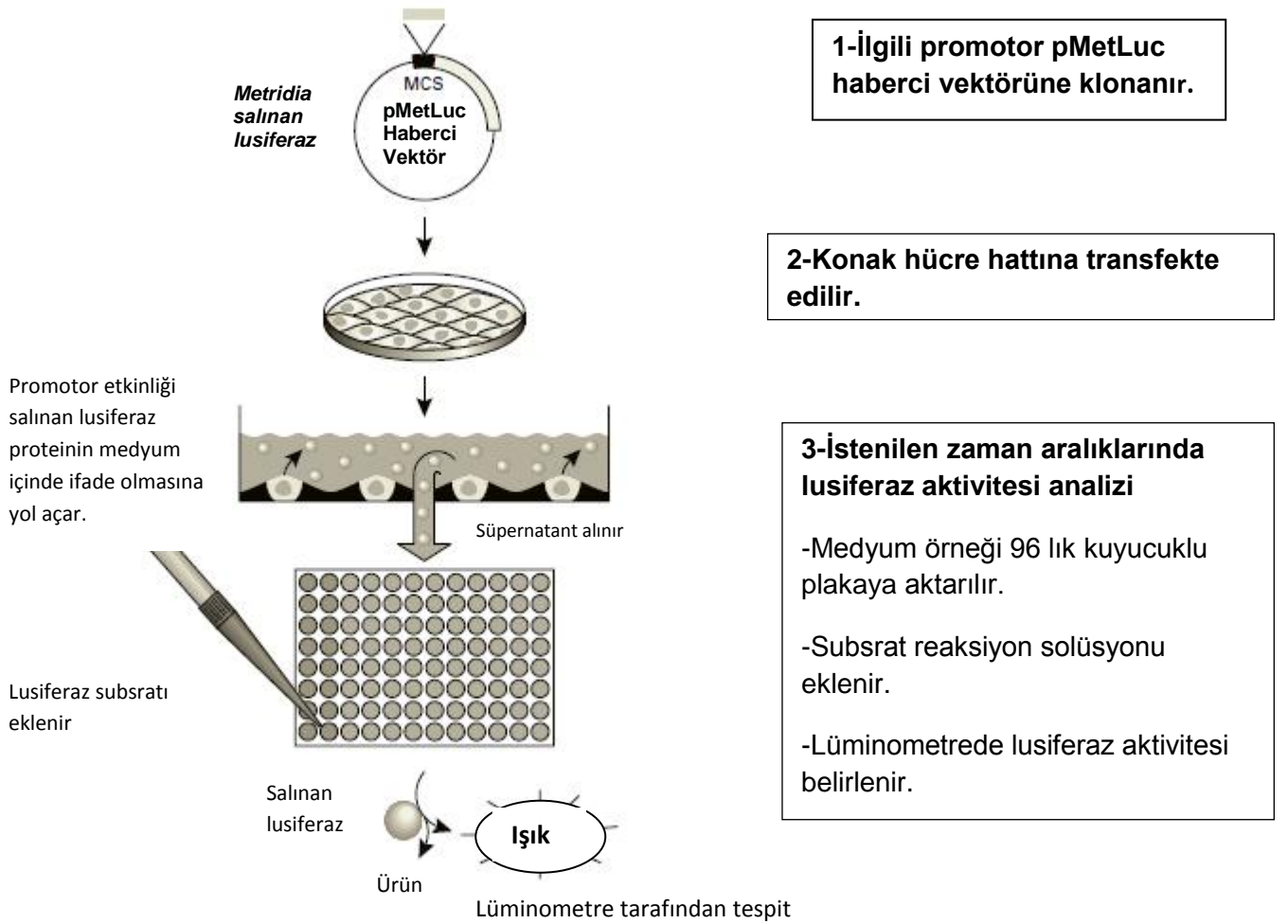


Şekil 1.9: Lipozom ve plazmit yapısı [72-80]

1.4 Salınan Haberci Sistemler

1.4.1 Salınan Haberci Lusiferaz Sistemleri ve Avantajları

Ökaryotik promotorların ve enhansörlerin sistematik analizleri için salınan lusiferaz haberci sistemi çok yönlü bir araçtır. Clontech Laboratories, Inc. tarafından geliştirilen sistem, medyumdaki hücreleri liziz etmeden, promotor ve enhansörlerin aktivitesini gösteren haberci bir molekül olan salınan *Metridia* lusiferazı kullanır. Hücreler ilgili haberci vektör ile transfekte edilir ve deneye hazır hale gelene kadar kültüre alınır. Lusiferaz substratı medyum süpernatantına eklenir ve salınan lusiferaz aktivitesi için hücre liziz basamağına ihtiyaç duyulmadan, basit, duyarlı ve radyoaktif olmayan bu sistem kullanılarak pMetLuc haberci gen ifadesi belirlenir. Deney direkt olarak kültür içinde ya da süpernatant paylaşılırıp diğer kuyucuklu plakaya transfer edilerek yapılabilir [81].



Şekil 1.10: Salınan lusiferaz haberci deneyinin akış diyagramı [81].

Salınan *Metridia* lusiferaz, transkripsiyon habercisi kullanımı diğer vektörlerle karşılaştırıldığında birçok avantaj sağlar.

Transkripsiyonel aktivite hücre medyumundan alınan örneklerde analiz edildiği için hücrelerin lizis edilmesi gerekmez. Böylece gen ifadesinin kinetikleri aynı medyumundan tekrar tekrar alınıp kolayca çalışılır. Kültürlerin aynı setleri, hem salınan lusiferaz deneyleri hem de DNA/RNA, protein ya da hücresel analizler için kullanılabilir. Çünkü transfekte olan hücreler medyum içindeki lusiferaz aktivitesi ölçümünden etkilenmez. Bu deney sistemi, floresan bazlı haberci deneylere ya da diğer sitozolik lusiferaz habercilere göre daha duyarlıdır [81].

Salınan *Metridia* lusiferaz, *Renilla* lusiferaz ve Firefly lusiferaz gibi salınmayan habercilerle karşılaştırıldığında, yüksek miktarda sinyal gönderir ve substrat eklenmesinden sonra da sabit olarak devam eder. Bu durum aynı anda birden fazla örnek için mümkündür. Substrat eklendikten sonra 20 ve 45 dakika arasında sinyal sabittir. Ayrıca, medyum süpernatantında bulunan %10 FBS sinyal miktarını değiştirmez [81].

Metridia Lusiferazın hassasiyeti %10 FBS içeren standart memeli hücre kültüründe belirlenir [81].

1.4.2 İki Yönlü Salınan Haberci Deneyi

Farklı iki biyoluminesan salınan haberci kullanımı özellikle normalizasyon uygulamaları için transfeksiyonun internal kontrolü olarak kullanılmaktadır.

İki yönlü salınan haberci sistemlerinde iki tane salınan haberci vektörü kullanılır; *Metridia* lusiferaz ve Salınan Alkalın Fosfat (SEAP). Bu iki haberci özel haberci substratlar vasıtasıyla birbirlerinden ayırt edilir [81]. Potansiyel uygulamalarda iki yönlü salınan haberci sistemi şunları içerir:

- Normalizasyon uygulamaları için, transfeksiyon kontrolü gibi bir haberci kullanılır.
- Salgı yolağının fonksiyonunu göstermek için, pozitif ve temel kontrol haberci gibi bir haberci kullanılır.
- İki farklı sinyal transdüksiyon yolağı aynı anda gösterilir. Bu intrasellüler sinyal, transdüksiyon yolları arasındaki çapraz iletişimin görülmesini sağlar. Örneğin, salınan *Metridia* lusiferaz ve salınan alkalın fosfat (SEAP) kullanıldığında birbiriyle ilişkili hem cAMP hem de NF- κ B sinyal transdüksiyon yolağı belirlenebilir [81].

1.5 Amaç

Transkripsiyonel aktivitenin regülasyonunun çalışılmasında kullanılan en güvenilir metot olan transfeksiyon için alternatif vektör sistemlerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bunun en güzel örneği son yıllarda Clontech Laboratories, Inc. tarafından geliştirilen Salınan haberci lusiferaz sistemidir. Sistem, hücre medyumunu kullanarak hücreleri lizis etmeden, promotor ve enhansörlerin aktivitesini gösteren haberci bir molekül olan salınan *Metridia* lusiferazı kullanır. Deney gruplarından alınan hücre medyumlarına lusiferaz substratı eklenerek ve hücre lizis basamağına ihtiyaç duyulmadan, kolaylıkla ve güvenilir şekilde gen ifadesi belirlenmektedir. Salınan lusiferaz yöntemi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında birçok avantaj sağlamaktadır. Özellikle transkripsiyonel aktivite hücre medyumundan alınan örneklerde analiz edildiği için hücrelerin lizis edilmesi gerekmez. Böylece gen ifadesinin kinetikleri farklı zamanlarda aynı medyumundan tekrar tekrar alınıp kolayca çalışılabilir. Kültürlerin aynı setleri, hem salınan lusiferaz deneyleri hem de DNA/RNA, protein ya da hücresel analizler için kullanılabilir. Sistemin dezavantajları ise özellikle çalışmaların kit bağımlı olması ve kitlerin fiyatlarının çok yüksek olması nedeniyle kullanımının sınırlı olmasıdır. Ölçümlerin luminometrik olarak yapılması yüksek oranda duyarlılık sağlamasına karşın luminometre her laboratuarda olmadığından alternatif bir ölçüm sistemine de ihtiyaç duyulmaktadır [81].

Tezimiz kapsamında salınan lusiferaz sistemine alternatif bir aday haberci sisteminin oluşturulması amaçlanmıştır. Hazırlanan alternatif sistemde kullanılacak enzim seçilirken substratının ucuz olması ve enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak belirlenebilmesi gibi kriterlere dikkat edilmiştir.

Bu amaçla kullanılan paraoksonaz (arildialkil fosfataz; E.C.3.1.8.1) hem arilesteraz, hem de paraoksonaz aktivitesine sahip, karaciğerde sentezlenen bir serum esterazdır. Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. İnsan serum paraoksonazı (PON1), 43 kDA molekül ağırlığında 354 amino asitlik bir proteindir. Serum PON1 enzim aktivitesinin belirlenmesi oldukça kolay bir metotla yapılmaktadır. Substrat olarak paraokson (0.0-diethyl-0-p-nitrophenylphosphate) kullanılarak, paraoksonun 37°C' de 412 nm dalga boyunda enzimatik hidrolizi sonucu oluşan serbest p-nitrofenolun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tespit edilir [40].

Salınan lusiferaz haberci vektör sisteminin modifiye edilerek, lusiferaz geni yerine paraoksonaz geninin klonlanması ve enzim aktivitesinin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmamız kapsamında sırasıyla aşağıdaki deneylerin yapılması amaçlanmıştır.

1. İnsan PON1 geninin sırasıyla pGEMTeasy ve pMetLuc vektörlerine alt klonlamasının yapılması.
2. İnsan PON1 geni klonlanmış pMetLuc haberci vektörünün MCS bölgesine CAIX promotörünün klonlanması.
3. İnsan PON1 geninin pET30a vektörüne klonlanması ve proteinin ifadesinin SDS PAGE ve western blot teknikleriyle valide edilmesi.
4. Karaciğer kanser hücre hattı (Hep3B) kullanılarak, hedeflenen aday haberci vektör sisteminin analiz edilmesi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tümü moleküler biyoloji için uygun saflıktadır. Moleküler biyoloji materyalleri, klonlamada kullanılan vektörler ve PZR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler Promega, New England Biolabs ve Fermentas firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar

Tris Base	Sigma
NaCl	Sigma
EDTA	Fisher Scientific
Na_2HPO_4	Sigma
NaH ₂ PO ₄	Sigma
MgCl ₂	Merck
LB	Sigma
LB agar	Sigma
Ampicillin	Sigma
Kanamisin	Sigma
Gliserol	Merck
DMSO	Merck
Hepes	Sigma
Lusiferaz Substrat	Clontech
DMEM	Sigma
FCS	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
PBS	Sigma
Agaroz	Prona

Tablo 2.1'in devamı

Seap substrat	Clontech
Aseton	Sigma
Paraokson	Sigma
EGTA	Sigma
PMSF	Sigma
BSA	Sigma
Beta-mercaptoetanol	Sigma
Protamin sülfat	Sigma
IPTG	Thermo, ABD
X-GAL	Thermo, ABD
APS	Fisher Scientific
SDS	Appllichem
His Tag Antikor (pET30a'ya spesifik)	Qiagen

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

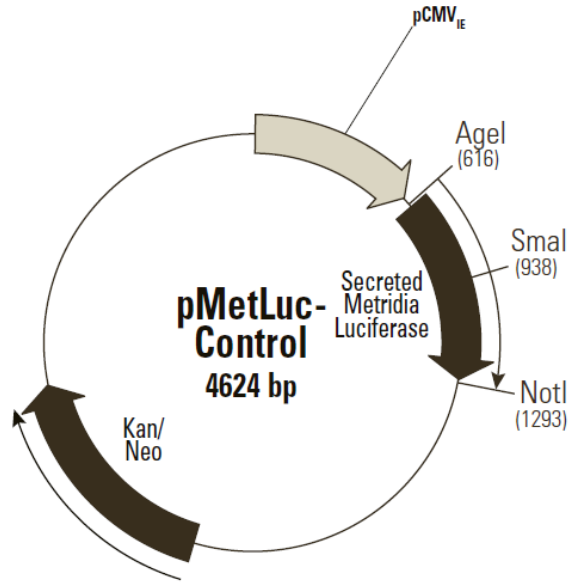
Kullanılan Gereç	Modeli
CO2 'li inkübatör	Nuair, ABD
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
-80 °C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
PH Metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1(Comecta Sa)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Almanya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
UV visible spektrofotometre	Thermo
Vorteks	Elektromag, Türkiye

Tablo 2.2'nin devamı

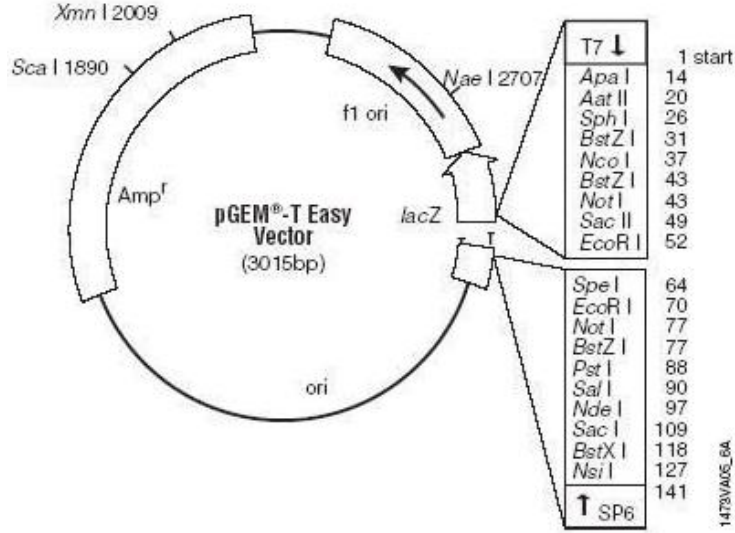
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
Luminometre	Thermo, ABD
DNA elektroforezi	Minicell Primo
Jel Görüntüleme	UVP, İngiltere
Mikro santrifüj	Thermo, ABD
PZR cihazı	Biolab
Qübit	İnvitrogen
Otomatik pipetler	Finnpipette

2.1.2 Çalışmada kullanılan vektörler

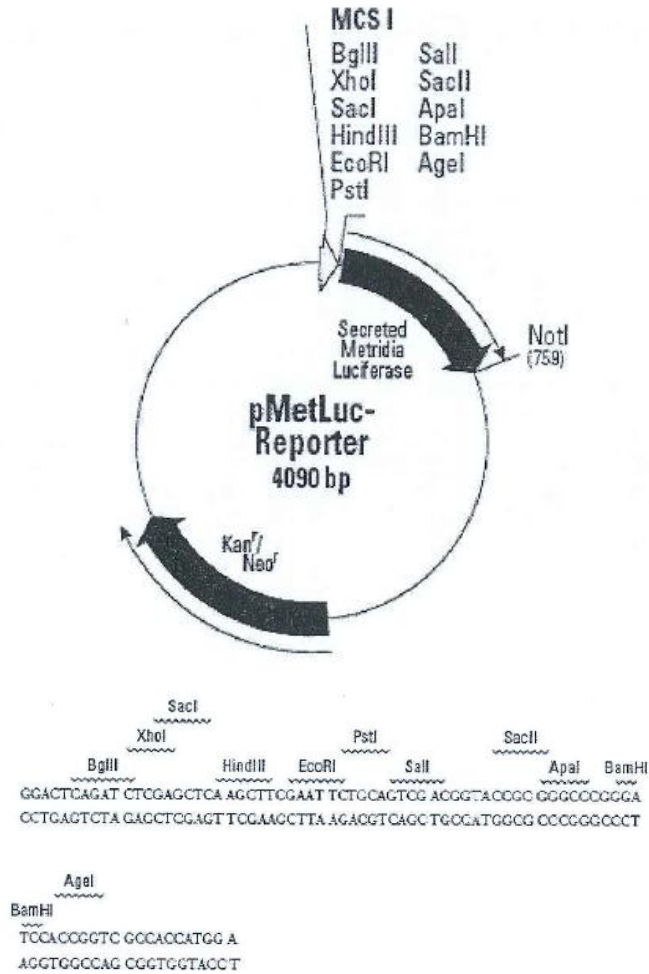
Çalışmada pGEM-T Easy (Promega), pMet-Luc (Clontec), SEAP kontrol, pMetLuc kontrol, pcDNA3.1(İnvitrogen) ve pET30a vektörleri kullanılmıştır.



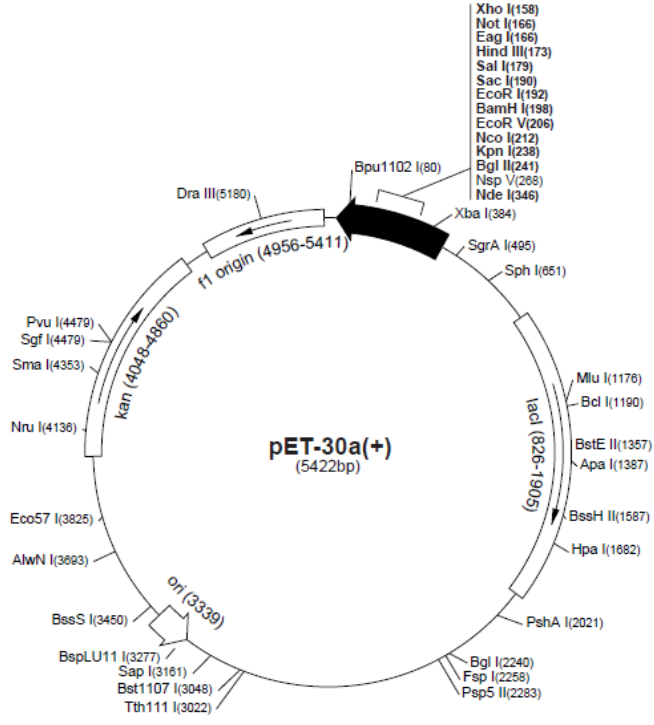
Şekil 2.1: pMetLuc Kontrol vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi



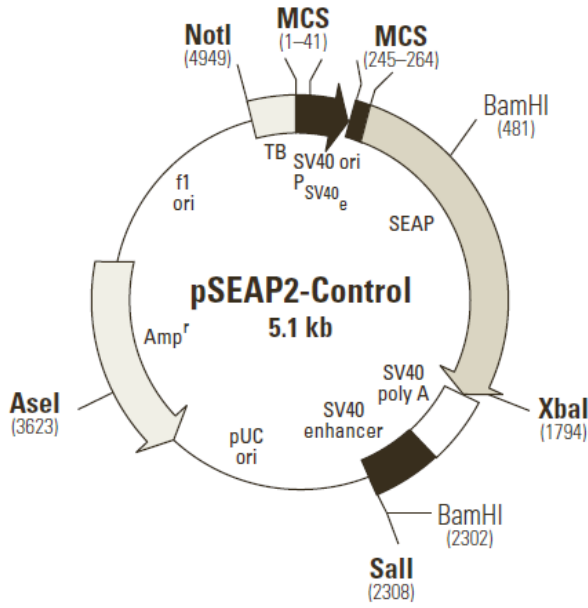
Şekil 2.2: pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi



Şekil 2.3: pMetLuc haberci vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi



Şekil 2.4: pET-30a vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi



Şekil 2.5: SEAP Kontrol vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri soyları

Çalışma sırasında klonlama için *E.coli XL1-blue* (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)) , *E.coli DH5α* (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1), *E.coli DH10B* ve *BL_21(DE3) Codon plus* kompetent hücreleri kullanıldı.

2.1.4 Bakteriyel Kültür Ortamı

E.coli için kültür ortamı olarak LB ve LB agar kullanıldı. Toz halinde alınan bakteriyel medyumlar firmanın önerdiği miktarda dH₂O ile hazırlanarak otoklavda steril edildi.

2.1.5 Antibiyotikler

Ampisilin 100 mg/ml, kanamisin ise 50 mg/ml stok solüsyon olacak şekilde hazırlanarak 0,22 µm filtre ile steril edilerek -20°C de saklandı.

2.1.6 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Çözeltisi

Tablo 2.3: *DH5α* kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar

Kimyasal madde	Son konsantrasyon
1 M CaCl ₂	100 mM
% 99 gliserol	% 40

Tablo 2.4: *BL_21(DE3)* kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan tritilasyon tamponu

Kimyasal madde	Son konsantrasyon
CaCl ₂	100 mM
MnCl ₂	70 mM
Na asetat	40 mM
pH 5.5'e ayarlandı.	

2.1.7 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

Tablo 2.5: Agaroz jel elektroforezi solüsyonları

Solusyon	İçeriği
5 X TBE (pH 8,00)	54 g Tris Base, 27,5 g Borik Asit tartıldı. 20 ml 0,5 M EDTA Ph 8,00 ve dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.
0,5 X TBE	5 X TBE stok çözeltiden 100 ml alınarak üzeri dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.

2.1.8 Transfeksiyon Çözeltileri

Tablo 2.6: Transfeksiyon çözeltileri

Solusyon	İçeriği
2 mM CaCl_2	14,7 g CaCl_2 , 50 ml'ye distile su ile tamamlandı. Otoklav yapıldı, filtre edildi. +4°C de saklandı.
2 X Hepes	1,6 g NaCl, 0,04 g Na_2HPO_4 , 1,3 g Hepes 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. pH 7,05 – 7,12 olmalıdır. Otoklav yapıldı ve filtre edildi. -20°C de saklandı.

2.1.9 Lusiferaz ve SEAP (Secreted Alkaline Fosfatase-Salınan Alkalın Fosfataz) Çözeltileri

Tablo 2.7: Lusiferaz aktivite ölçüm çözeltileri

Solusyon	İçeriği
10 X Substrat Çözeltisi	Kit içerisindeki liyofilize substrat eşit hacimdeki substrat buffer ile çözüldü.
1 X Substrat/Reaksiyon Tamponu	1/10 oranında kullanılacak kadar miktar 10 X substrat çözeltisi, reaksiyon tampon ile sulandırıldı. Her ölçüm için 5 µl kullanıldı.

Tablo 2.8: SEAP aktivite ölçüm çözeltileri

Solusyon	İçeriği
1 X Dilusyon Tamponu	Kit içerisindeki 5 X dilüsyon tamponundan çalışmada kullanılacak hacim kadarı 1 X'e dH ₂ O ile sulandırıldı. Her örnek için 75 µl kullanıldı.

2.1.10 Spektrofotometrik aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

Tablo 2.9: Aktivite tamponları

Solusyon	İçeriği
2 mM Paraoksan çözeltisi	10,8 µl paraoksan, 1 ml asetonda çözüldükten sonra üzerine, 1 ml bazal aktivite tamponu eklendi ve karıştırıldıktan sonra kullanıldı.
Bazal aktivite tamponu	2 mM CaCl ₂ içeren 100 mM tris-HCl, pH 8; 3,0285 g (25 mmol) Tris, 200 ml distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirilirdi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl ₂ katılarak son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

2.1.11 Rekombinant protein ekspresyonunda kullanılan çözeltiler

Tablo 2.10: Bakteri yıkama tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Tris-base	20.19 M
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlandı.
Tris-base 90 ml dH ₂ O da çözüldü. pH=7.6 'ya ayarlanarak hacim 100 ml 'ye tamamlandı. 121 °C 'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.	

Tablo 2.11: Liziz tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-base	20 mM
0.5 M EDTA	0.5 mM
0.5 M EGTA	0.5 mM
dH ₂ O	1 litreye tamamlandı.
Tris-base, 0.5 M EDTA, 0.5 M EGTA 800 ml dH ₂ O da çözüldü. pH 8.7' ye ayarlandı. Otoklavlanarak +4°C'de saklandı.	

Tablo 2.12: PMSF (Fenilmetilsülfonil Florür) stok solüsyonu

Kimyasal Madde	Miktar
PMSF	174 mg
174 mg PMSF 10 ml 2-propanolde çözülerek -20 °C de saklandı.	

Tablo 2.13: Lizozim stok solüsyonu

Kimyasal Madde	Miktar
Lizozim	50 mg/ml
50 mg/ml olacak şekilde dH ₂ O ile hazırlandı ve -20 °C de saklandı.	

2.1.12 Western Blot Çözeltileri

Tablo 2.14: Western Blot çözeltileri

Solüsyon	İçeriği
Brom fenol mavi Çözeltisi	% 0.05 (w/v) bromfenol mavisi distile su içinde
SDS PAGE Alt Jel	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), % 10 (w/v) SDS
SDS PAGE Üst Jel	1 M Tris-HCl (pH 6,8), % 10 (w/v) SDS
SDS PAGE Yürütme Tampon Çözeltisi	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
10 X TBS	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4

2.1.13 SDS PAGE Çözeltileri

Tablo 2.15: SDS PAGE çözeltileri

Jel İçeriği	% 10 Ayırma Jeli	% 5 Yığma Jeli
Üst Jel Tamponu	-	2.5 ml
Alt Jel Buffer	2.5 ml	-
Akrilamid: Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
dH ₂ O	5 ml	6.25 ml
% 10 (w/v) APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

2.2 Metotlar

2.2.1 Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Isıya dayanıklı tüm cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi. Doku kültürü laboratuvarı her hafta düzenli olarak virkon içeren sıvılarla temizlendi. UV lamba kullanılarak oda ortamının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

2.2.2 DNA İzolasyonu ve Klonlama

2.2.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR reaksiyonları 50 µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak yaklaşık 200 ng DNA, her bir primer son konsantrasyonu 2 µM, 1 X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. $MgCl_2$ konsantrasyonu (2 mM, 4 mM ve 6 mM) ise her bir PZR reaksiyonu için optimize edildi. PZR programı ve döngü sayısı primerlere ve kalıp DNA kaynağına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Ancak 94°C'deki ilk denatürasyon basamağı ve Taq polimerazın optimum aktivasyon gösterdiği 72°C'de uzama basamağı her PZR reaksiyonu için aynı kullanılmıştır. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

2.2.2.2 Primer Tasarımı

Primer tasarımı yapmak için www.restrictionmapper.org, www.ncbi.nlm.nih.gov ve adresleri kullanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin

dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Tasarlanan primerler databanklarda (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB data bankaları) bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak insan *PON1* geni ile en iyi benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

2.2.2.3 DNA Agaroz Jel Elektforezi

DNA elektforezi yapmak üzere yatay jeller kullanıldı ve 90 volt elektrik akımında yaklaşık 30 dakika örnekler yürütüldü. Elektforez tamponu olarak 0,5 X TBE kullanıldı. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. DNA'yı izleme boyası olarak bromfenol mavisini tercih edildi. Çalışmada % 0,8 ve % 1 konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Elektforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünü tespit etmek için farklı büyüklüklerde DNA belirleyiciler kullanıldı. Elektforez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

2.2.2.4 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

Görölmek istenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Fermentas) kullanılarak DNA elüve edildi. Jelden geri kazanılan DNA'nın az bir miktarı tekrar jelde yürütölerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanları alındı.

2.2.2.5 PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PZR ürünleri pGEM-T Easy vektörüne prosedürün önerdiği şekilde T:A klonlaması yapıldı (Promega). Buna göre 20 µl toplam hacim olacak şekilde, 1 µl pGEM-T vektör (50 ng), 15 µl insert DNA (jelden kazanılan PCR ürünü), 2 µl 10 x T4 ligaz tamponu (Promega) ve 1 µl T4 DNA ligaz (Promega) +4 °C 'de bir gece inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli* DH10B kompetent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için ampisillin içeren LB agar besiyerlerine 100 µl IPTG (100 mM stok) ve 20 µl X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı.

2.2.2.6 Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)

Küçük miktarlarda DNA izolasyonu için Miniprep DNA isolation kit (Fermentas) kullanıldı. Kit prosedürüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampicilin içeren 10 ml LB besiyerine transformasyonu yapılmış olan tek koloni ekim yapılır ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve bakteri pelletine prosedüre uygun olacak şekilde yapılan işlemlerin ardından DNA elüe edildi.

2.2.2.7 Plazmit DNA İzolasyonu (Maxiprep)

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Endo-free Maxi Prep Kit (Fermentas) kullanıldı. Kit prosedürüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 5-10 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 37°C de 8 saat 250 rpm de çalkalamalı etüvde inkübe edilir. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda dilue edildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanıldı. 37°C de 12-16 saat 250 rpm'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaşmasının ardından 4°C'de 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak prosedürün diğer basamakları yapıldı. İşlem sonunda yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi.

2.2.2.8 Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA nın kesilmesi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile DNA için önerilen tamponlar kullanılarak 30 µl toplam hacimde 37°C'de 1 gece inkübe edilerek kesim yapıldı. İki farklı enzimle aynı anda kesim yapıldığı koşullarda iki enzimle aynı anda kesim yapılmasını sağlayan tamponlar kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

2.2.2.9 Kompetent Hücre Hazırlanması

2.2.2.9.1 *DH5α* Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi

Kompetent hücre hazırlanması için 50 mM kalsiyum klorür kullanıldı. İlk olarak 10 ml LB besiyerine tek koloni *E.coli DH5α* blue ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı etüvde bir gece inkübasyonu sağlandı. Daha sonra 1 gecelik kültürden 100 ml LB içine 100 µl inoküle edilerek, OD₆₀₀ 0,5 ile 0,6 arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37°C'de inkübe edildi. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücrelerin çökmesi sağlandı. 50 ml 50 mM soğuk kalsiyum klorür ile pellet çözüldü ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml soğuk kalsiyum klorür ile çözülerek üzerine 10 ml % 40 lık gliserol eklenerek ependorflara paylaştırıldı. -80 °C buzdolabında saklandı.

2.2.2.9.2 BL21(DE3) Kodon Plus Hücrelerinin Kompetan Hale getirilmesi

Bir gece önceden 10 ml LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapılarak 37 °C de inkübasyona bırakıldı. 100 ml taze LB sıvı besiyeri içerisine önkültürden 5 ml inoküle edildi. OD₆₀₀ 0,2 'ye ulaşınca kadar bakteri süspansiyonu 37°C de çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 2-3 saat bekletildi. Son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde MgCl₂ ve son konsantrasyon yaklaşık % 0,2 olacak şekilde glukoz ilave edilip 37°C de çalkalamalı inkübatörde OD₆₀₀0,5 olana kadar büyütüldü. + 4 °C de 2 saat bekletildi ve 4 °C de 5000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, hücre pelleti tritilasyon tamponu ile çözüldükten sonra 4 °C de 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Pellet % 15 lik gliserol içeren 25 tritilasyon tamponu ile çözüldü. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -80 °C de saklandı.

2.2.2.10 Transformasyon

Transformasyon için, 200 µl kompetan hücreye 5 µl (1-50 ng arası) plazmit eklenerek buz üzerinde 40 dakika bekletildi. Sonra 42°C'de 90 saniye ısı şoku

uygulandı. Üzerine 800 µl LB ilave edildi ve 37°C'de çalkalamalı etüvde bir saat inkübasyonu sağlandı. Süre sonunda kültürden 200 µl, uygun antibiyotiği içeren LB agar besiyerine yayıldı ve bir gece inkübe edildi.

2.2.3 Hücre Kültürü Teknikleri

2.2.3.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine, L Glutamine son konsantrasyonu 0,2 mM ve FCS son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde eklendi. Tüm bileşenler 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.3.2 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) -20 °C'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce 56°C 30 dakika ısı ile inaktive edildi ve tekrar -20°C de saklandı.

2.2.3.3 BSA Hazırlanması

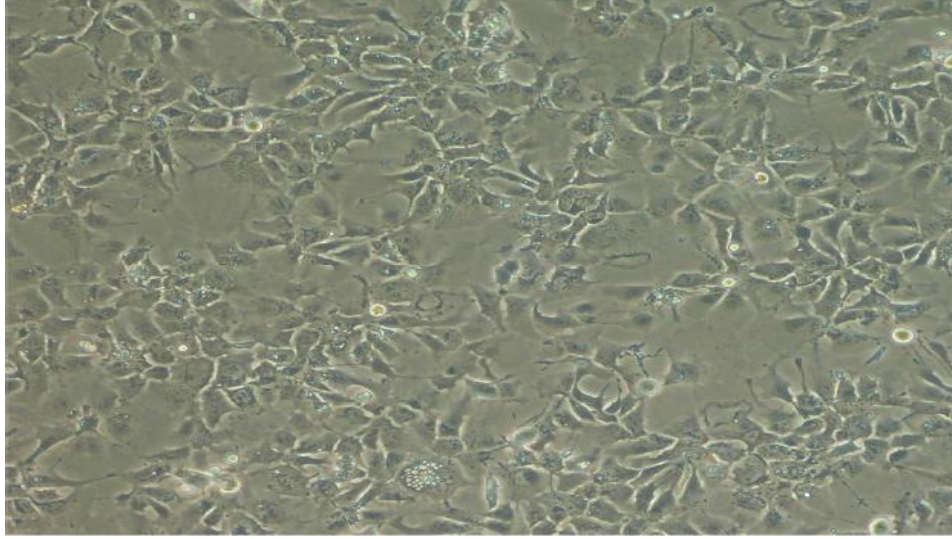
% 15 lik BSA hazırlanırken 0,75 gr BSA 5 ml PBS içinde çözüldü ve 0,22 µm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.3.4 PBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Tablet şeklinde satın alınan PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml dH₂O ile hazırlandı ve otoklavda steril edildi. 2-8 °C'de saklandı.

2.2.3.5 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyusu

Çalışmada insan hepatoma hücre hattı Hep3B kullanıldı.



Şekil 2.6: Hep3B hücrelerinin faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi

2.2.3.6 Hücre Soyunun Başlatılması

-80 °C dolabında muhafaza edilen hücre hatlarının büyütülmesi için -80 °C'den çıkarılan hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlı bir şekilde çözümleri gerçekleştirildi. Çözünen hücreler % 10 luk FCS içeren medyuma alındı ve 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flaslara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre koyuldu.

2.2.3.7 Hücrelerin Büyütülmesi

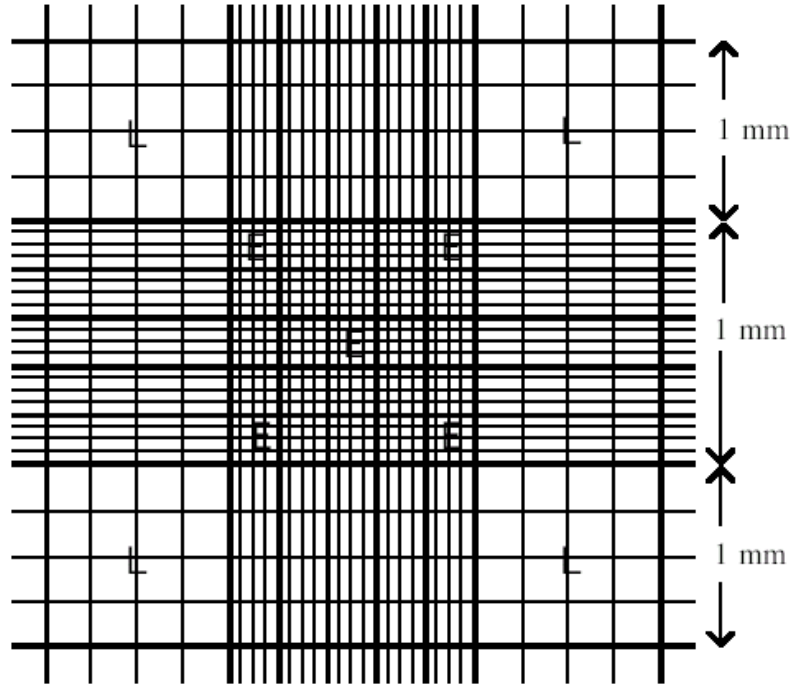
Hücreler 15 ml medyumda 75 cm² flaslarda, içerisinde, 0,2 mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

2.2.3.8 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyi % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez önceden steril edilmiş PBS ile yıkandı ve 75 cm^2 flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlenildi ve 37°C, % 5 CO_2 içeren inkübatöre konuldu.

2.2.3.9 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm^2 alan, 0.1 mm derinliği olan ve böylece toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanıldı (Şekil 2.7). Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 μl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilusyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmadı ve sayım yapıldı.



Şekil 2.7: Hemositometre

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı / ml} = \text{hemositometre sayım sonucu} \times 2 \times 10^4$$

2.2.3.10 Hücrelerin -80 °C de saklanması

Hücreler buldukları yüzeyi % 80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez önceden steril edilmiş PBS ile yıkandı ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet % 10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü ve cryovial tüplerine konularak etiketlendi ve -80 °C derin dondurucuya konuldu.

2.2.3.11 Kalsiyum-Fosfat Prespitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon

Bu metot 12 lik kuyucuklu plaka ile uygulandı. Transfeksiyondan 24 saat önce hücreler 25 X 10⁴ hücre / kuyu olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA ve 2 M CaCl₂ ayrı bir tüp içinde hazırlandı. Üzerine 2 X Hepes eklenerek yarım saat prespitasyon için oda sıcaklığında bekletildi. DNA- kalsiyum fosfat prespitasyonu oluştuktan sonra karışım damla damla kuyucuklara eklendi. Kuyucuklu plaka hafifçe sallanarak karışımın dağılması sağlandı. 6 saat sonra transfeksiyon solusyonu değiştirilerek, PBS ile kuyular yıkandı ve taze medyum eklendi. Bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.2.3.12 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Lusiferaz ölçümleri, thermo luminoscan kullanılarak yapıldı. 96 lık kuyucuklu plakada belirlenen kuyucuklara hücre ekstraktlarından 20 µl konuldu. Luminometre ayarı yapılarak 100 µl substrat enjeksiyonu ile aktivite ölçüldü.

2.2.3.13 Paraksonaz Aktivitesinin Spektrofotometrik olarak ölçülmesi

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilir. Aktivite ölçümünde öncelikle substrat çözeltisi hazırlanması gerekir, bunun için 10,8 µl paraokson 1 ml aseton içinde çözünmesi sağlandı, daha sonra üzerine 1 ml bazal aktivite tamponu eklenerek karıştırıcıda çözüldü. Bu karışımın aktivitesine bakarken taze olarak hazırlanmasına dikkat edildi. Sonraki aşamada kuyucuğa 220 µl bazal aktivite tamponu, 40 µl taze hazırlanmış substrat ve 40 µl medyum koyularak 412 nm'de 1 dakikadaki 37 °C de absorbansta meydana gelen değişme okundu.

2.2.3.14 Rekombinant proteinin ekspresyonu ve analizi

2.2.3.14.1 Ekspresyonun IPTG ile indüklenmesi

Rekombinant plazmit ekspresyon amacıyla BL_21(DE3) codon plus hücrelerine transforme edildi. 100 µg/ml kanamisin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37 °C inkübasyona bırakılarak önkültür hazırlandı. Hazırlanan bu önkültürün 10 ml' si, 100 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi. 37 °C inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürü OD_{550} 0,6-0,8'e ulaştığında son konsantrasyonu 0,4 mM - 1 mM arasında değişen konsantrasyonlarda IPTG ile indüklendi. Son konsantrasyonu yaklaşık 250 µM olacak şekilde $CaCl_2$ kültüre eklendi. İnkübatörün sıcaklığı 30°C ye indirilerek indükleme süresi 3, 4, 5 ve 6 saat olacak şekilde çalışıldı.

2.2.3.14.2 Hücrelerin Yıkınması

İndükleme süresi sonunda bakteri kültürü 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti yıkama tamponunda çözüldükten sonra tekrar santrifüjlendi. Bu işlem 2 kez tekrarlanmak hücreler yıkanarak kurutuldu. -20 °C ye kaldırıldı.

2.2.3.14.3 Liziz Aşaması

Bakteriyel hücre pelleti buz üzerine alınıp çözünmesi beklendi. 10 ml soğuk liziz tamponunda çözümlenerek vortekslendi ve buzda inkübasyona bırakıldı. Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde PMSF eklendi. Taze olarak hazırlanmış 10 mg/ml lizozim stok solüsyonundan 250 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 30 mg/ml protamin sülfat stok solüsyonundan 1 ml eklenerek santrifüj tüpü 2 dakika süreyle alt üst edildi. 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan temiz kısım temiz bir tüpe alındı.

2.2.3.15 SDS PAGE

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve % 70 etanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanarak, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve hemen üzerine % 90 izopropanol ilave edilerek hava kabarcığı oluşumu engellendi. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak dH₂O ile yüzey yıkandı ve Whatman 3 MM kağıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından yağma jeli döküldü ve kuyu oluşumunu sağlamak için tarak yerleştirildi. Yağma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş Whatman 3 MM kağıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi. Örnekler bromophenol blue ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve ilk kuyuya 5 µL protein Büyüklük belirteci (Fermentas) yüklendi. Jelin yürütülmesi, 0.1 (w/v) SDS içeren 1 X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) jel başına 0,4 amper kullanılarak yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

2.2.3.16 Western Blot

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Kısaca, jeller cam levhalar arasından çıkarılır, yağma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer buffer içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Kurutma kağıtlar ve PVDF membranlar jel ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer buffer içine alındı. Daha sonra sandviç hazırlandı. Bunun için transfer kasedi arasına sünger,

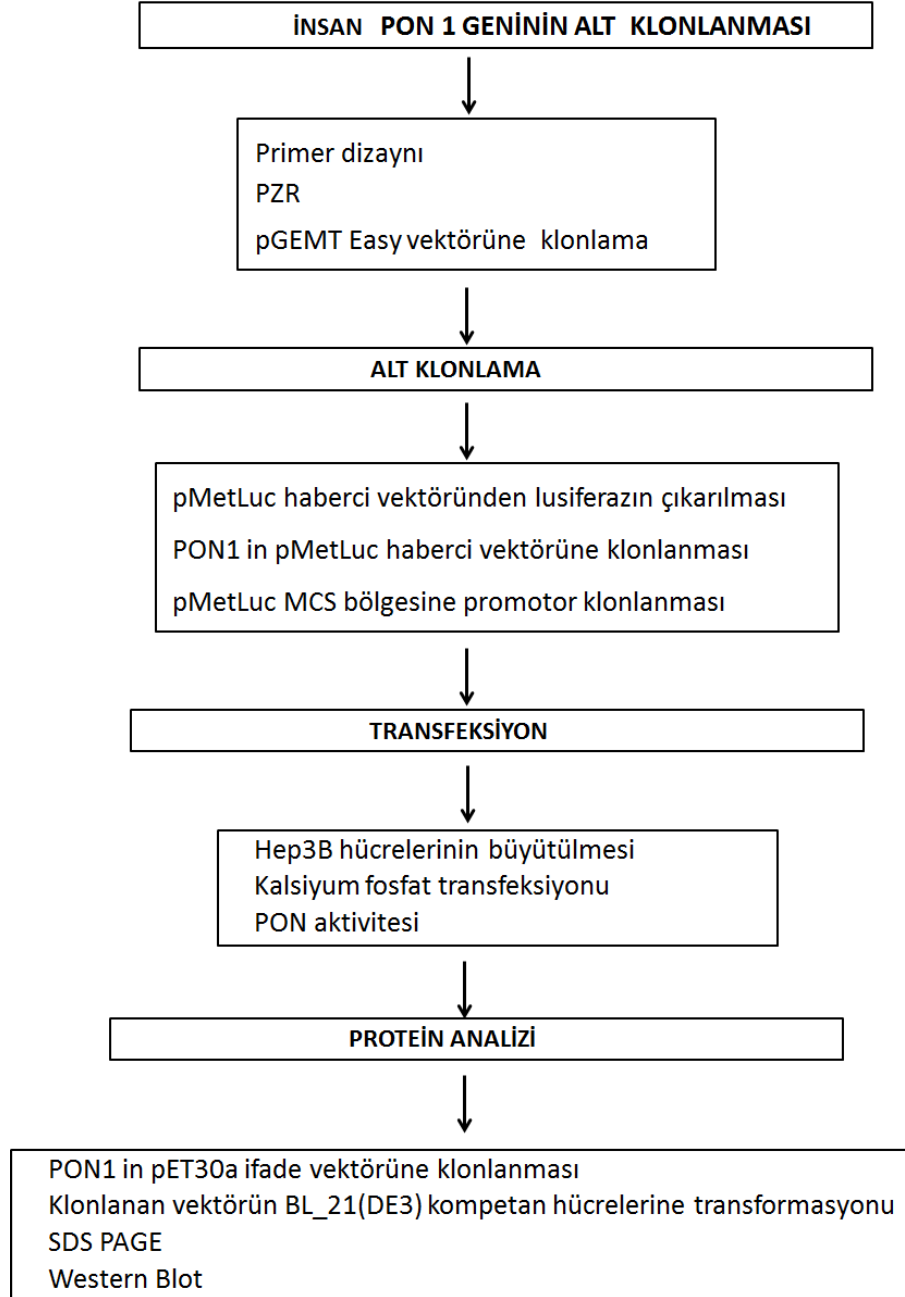
kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma kağıdı, sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve +4°C 'de 20 volt akımda 1 gece transfer yapıldı.

2.2.3.17 Proteinlerin Belirlenmesi

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 ml bloklama çözeltisinde (0,1 gram bloklama tozu ve % 0.1(v/v) Tween 20 içeren 1 X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için % 0.1 (v/v) Tween 20 içeren 1 X TBS kullanıldı. Membran primer antikor ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar 1-2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1,5 ml alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı.

3. BULGULAR

3.1 Çalışma Planı



Şekil 3.1: İnsan PON1 geninin alt klonlanması ve analizinin akış diyagramı

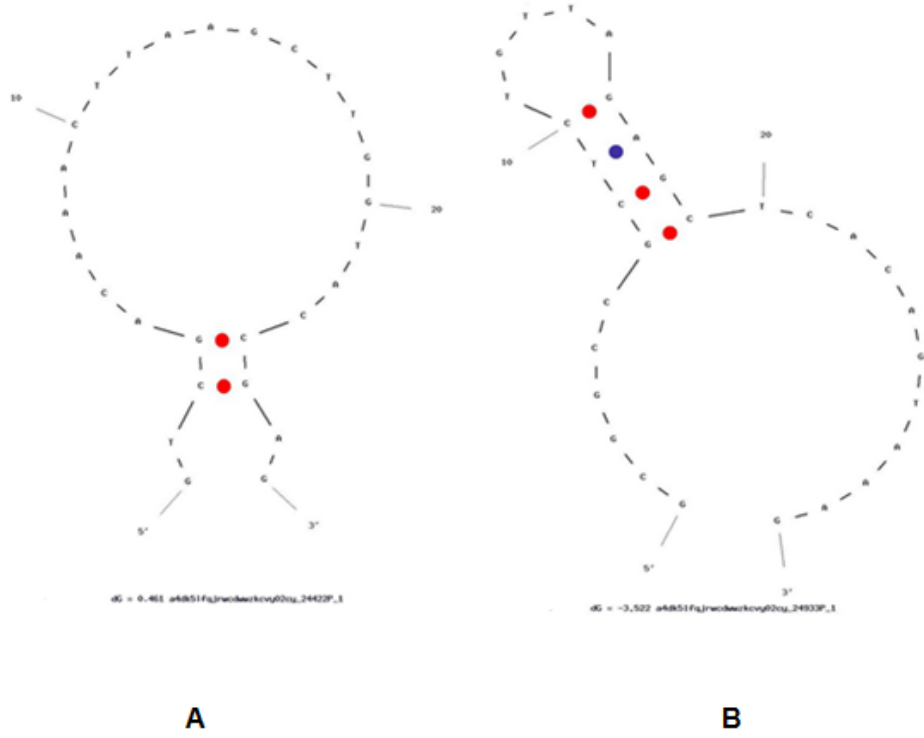
3.2 PON1 geninin alt klonlanması ve analizi

3.2.1 Primer tasarımı

İlk olarak insan PON1 geninin biyoinformatik restriksiyon haritalaması yapılarak, geni kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri saptandı. Diziyi kesmeyen enzimlerin pMetLuc haberci vektörünün lusiferaz bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi. Sal1 ve Not1 enzimlerinin hem geni kesmediği hem de vektörün lusiferaz bölgesini çıkarabileceği tespit edildi. Sonuç olarak Sal1 ve Not1 enzim kesim bölgeleri seçilerek primerlerde kullanıldı. Gen dizisinin doğru yönde klonlanabilmesi için, Sal1 kesim bölgesi forward primerde, Not1 kesim bölgesi ise reverse primerde kullanıldı. Bunun dışında tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi.

Tablo 3.1: Dizayn edilen özel primerin dizisi, Tm değeri ve uzunlukları

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	Dizisi
İPON 1 - Forward	27	59,2	<u>GTCGACAAACTTAAGCTTGGTACCGAG</u> Sal 1 kesim bölgesi
İPON 1- Reverse	30	65,2	<u>GCGGCCGCTCTGTTAGAGCTCACAGTAAAG</u> Not 1 kesim bölgesi



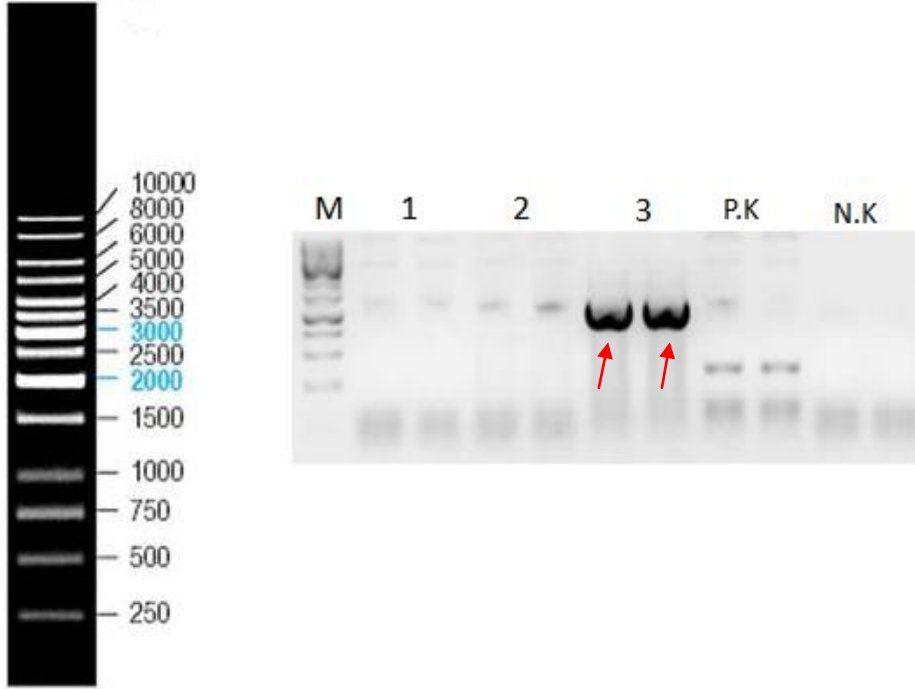
Şekil 3.2: PON1 primerlerin saç tokası oluşturma potansiyelleri A) Forward primer B) Reverse primer.

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR reaksiyonları 50 µl hacimde yapıldı. Buna göre PON1 dizisinin çoğaltılması için uygun şartların belirlenmesi amacıyla ilk olarak $MgCl_2$ konsantrasyonu ve kalıp DNA miktarı değiştirilerek, tampon, distile su, dNTP karışımı, forward primer, reverse primer ve Taq DNA polimeraz miktarları sabit tutuldu. Tablo 3.2 'de belirtilen PZR programı kullanılarak gen bölgesi çoğaltıldı. PZR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 1068 bç'lik insan PON1 genine ait bant UVP Görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğraflandı. Şekil 3.3' de gösterildiği gibi 3 nolu örneklerde tek bir bant şeklinde *PON1* geni elde edildi.

Tablo 3.2: İnsan PON1 geninin amplifikasyonu için PZR koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94°C	2 dakika
2	35	94 °C	45 saniye
		62°C	45 saniye
		72°C	1 dakika
3	1	72°C	2 dakika

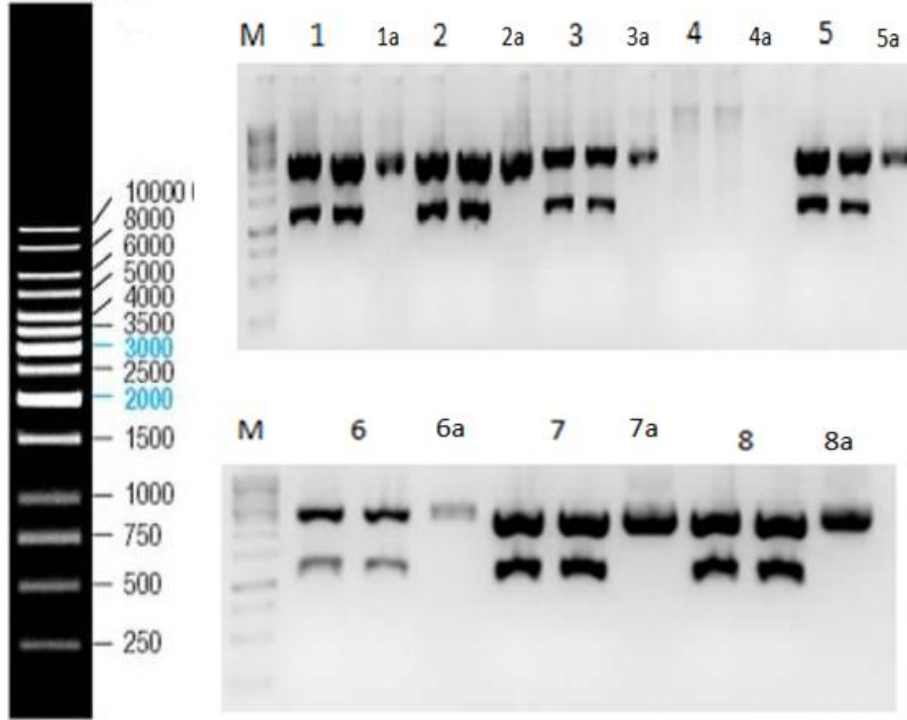


Şekil 3.3: PZR jel görüntüsü M: 1 kb Marker ; 1: 1 nolu örnek ; 2: 2 nolu örnek ; 3: 3 nolu örnek ; P.K : Pozitif kontrol ; N.K : Negatif kontrol

3.2.3 İnsan PON1 geninin pGEM-T Easy Vektörüne Alt Klonlanması

PZR ile çoğaltılan gen bölgesi T:A klonlama stratejisi ile klonlandı. Bu amaçla pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) kullanıldı. Öncelikle PZR sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanılarak klonlamaya hazır hale getirildi. Daha sonra üretici

firma protokolüne göre pGEM-T Easy vektörü ile jelden geri kazanılan insan *PON1* geni bir gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli DH10B* hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agarlı petrilere mavi-beyaz koloni seçimi yapılabilmesi amacıyla X-Gal ve IPTG yayıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan beyaz koloniler insan *PON1* genini içeren pGEM-Teasy vektörüne sahip hücrelerdir. Beyaz kolonilerden 8 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Miniprep (Fermentas) plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Plazmitler Sal 1 ve Not 1 restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.4' de görüldüğü gibi 7 kolonide bulunan vektörlerin herbiri rekombinanttır ve insan *PON1* gen dizisini içermektedir.



Şekil 3.4: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan PON1 geninin Sal1 ve Not 1 ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü. M : 1 kb marker, 1 :1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi, 3: 3.koloni kesimi, 4: 4. Koloni kesimi, 5: 5.koloni kesimi, 6: 6. Koloni kesimi, 7 :7 .koloni kesimi, 8 :8 .koloni kesimi, 1a: 1.koloninin miniprebi, 2a: 2.koloninin miniprebi, 3a: 3.koloninin miniprebi, 4a: 4.koloninin miniprebi, 5a: 5.koloninin miniprebi, 6a: 6.koloninin miniprebi, 7a: 7.koloninin miniprebi, 8a: 8.koloninin miniprebi.

Meydana gelen rekombinant plazmitlerden 7.koloni insan PON1 gen dizisinin kontrolü için REFGEN Biyoteknoloji, Ankara'ya dizi analizine gönderildi. Ulaşılan dizi analizi sonuçlarının biyoinformatik olarak NCBI da analizi yapıldı ve insan PON1 gen dizisi ile karşılaştırıldı. Dizi analizi sonucu ile gen bankasında bulunan dizi arasındaki uyum yüksek çıktı, bu sebeple 7.koloniyle klonlama çalışmalarına devam edildi.

```

S64615.1 -159 GACCATGGCGAAGCTGATTGCCCTCACCCCTCTTGGGGATGGGACTGGCACTCTTCAGGAA 218
|||||
PON1 6 GACCATGGCGAAGCTGATTGCCCTCACCCCTCTTGGGGATGGGACTGGCACTCTTCAGGAA 65

S64615.1 -219 CCACCAGTCTTCTTACCAAACACGACTTAATGCTCTCCGAGAGGTACAACCCGTACAAC 278
|||||
PON1 66 CCACCAGTCTTCTTACCAAACACGACTTAATGCTCTCCGAGAGGTACAACCCGTACAAC 125

S64615.1 -279 TCCTAACTGTAATTTAGTTAAAGGAATCGAAACTGGCTCTGAAGACATGGAGATACTGCC 338
|||||
PON1 126 TCCTAACTGTAATTTAGTTAAAGGAATCGAAACTGGCTCTGAAGACATGGAGATACTGCC 185

S64615.1 -339 TAATGGACTGGCTTTCATTAGCTCTGGATTAAAGTATCCTGGAGTAAAGAGCTTCAACCC 398
|||||
PON1 186 TAATGGACTGGCTTTCATTAGCTCTGGATTAAAGTATCCTGGAGTAAAGAGCTTCAACCC 245

S64615.1 -399 CAACAGTCTTGAAAAATACTTCTGATGGACCTGAATGAAGAAGATCCAACAGTGTGGA 458
|||||
PON1 246 CAACAGTCTTGAAAAATACTTCTGATGGACCTGAATGAAGAAGATCCAACAGTGTGGA 305

S64615.1 -459 ATTGGGGATCACTGGAAGTAAATTTGATGTATCTTCATTTAACCCCTCATGGGATTAGCAC 518
|||||
PON1 306 ATTGGGGATCACTGGAAGTAAATTTGATGTATCTTCATTTAACCCCTCATGGGATTAGCAC 365

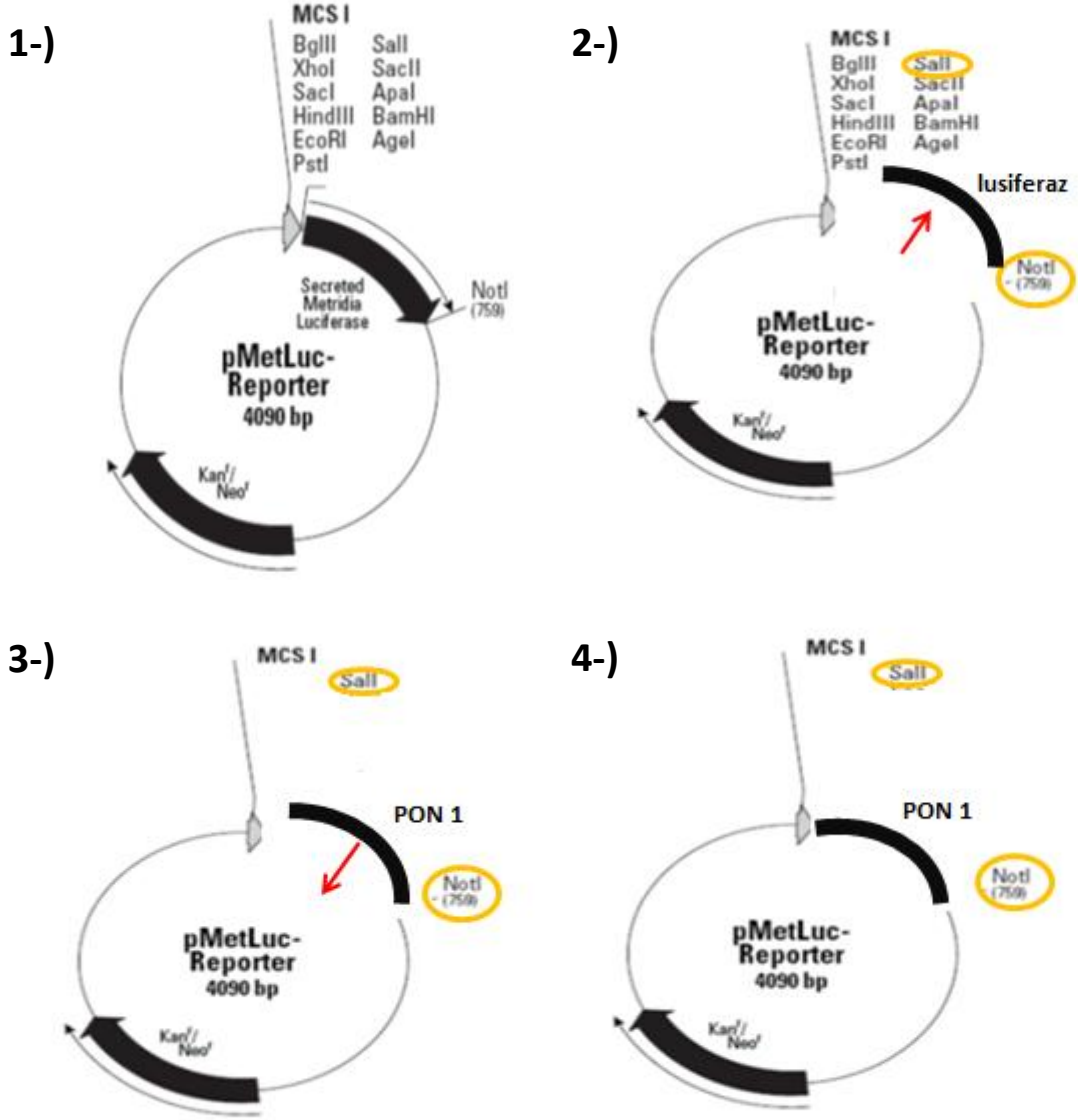
S64615.1 -519 ATTCACAGATGAAGATAGTGCCATGTACCTCCTGGTGGTGAACCATCCAGATGCCAAGTC 578
|||||
PON1 366 ATTCACAGATGAAGATAGTGCCATGTACCTCCTGGTGGTGAACCATCCAGATGCCAAGTC 425

S64615.1 -579 CACAGTGGAGTTGTTTAAATTCAGAAGAAGAAAAATCGCTTTTGCATCTAAAAAACAT 638
|||||
PON1 426 CACAGTGGAGTTGTTTAAATTCAGAAGAAGAAAAATCGCTTTTGCATCTAAAAAACAT 485

S64615.1 -639 CAGACATAAACTTCTGTCTAATTTGAATGATATTGTTGCTGTGGGACCTGAGCACTTTTA 698
|||||
PON1 486 CAGACATAAACTTCTGTCTAATTTGAATGATATTGTTGCTGTGGGACCTGAGCACTTTTA 545

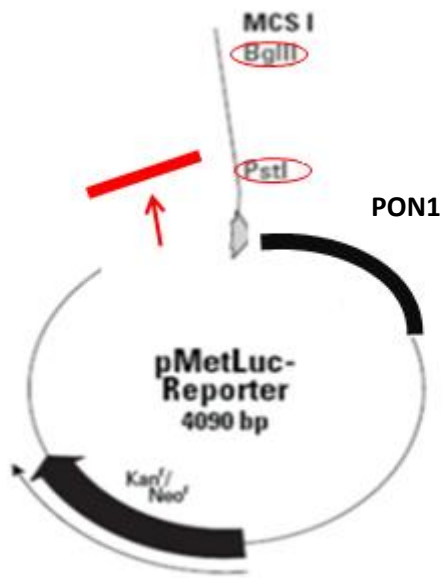
```


kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve SalI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.7 de görüldüğü gibi ekilen 6 koloniden 6 tanesinde bulunan vektör rekombinanttır ve insan *PON1* dizisini içermektedir.

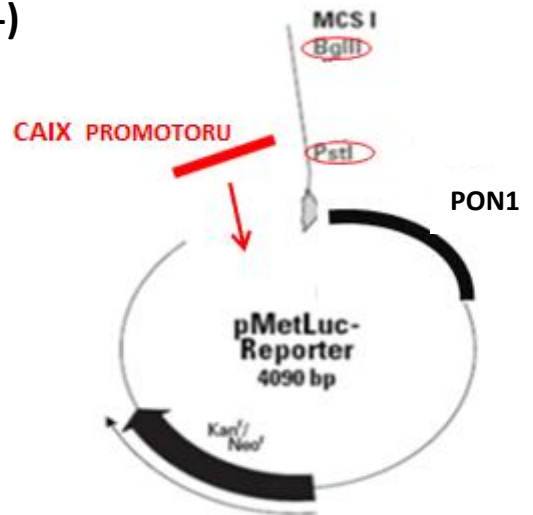


Şekil 3.6 : Klonlama basamakları

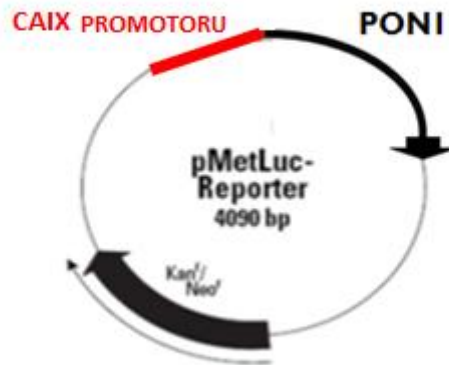
5-)



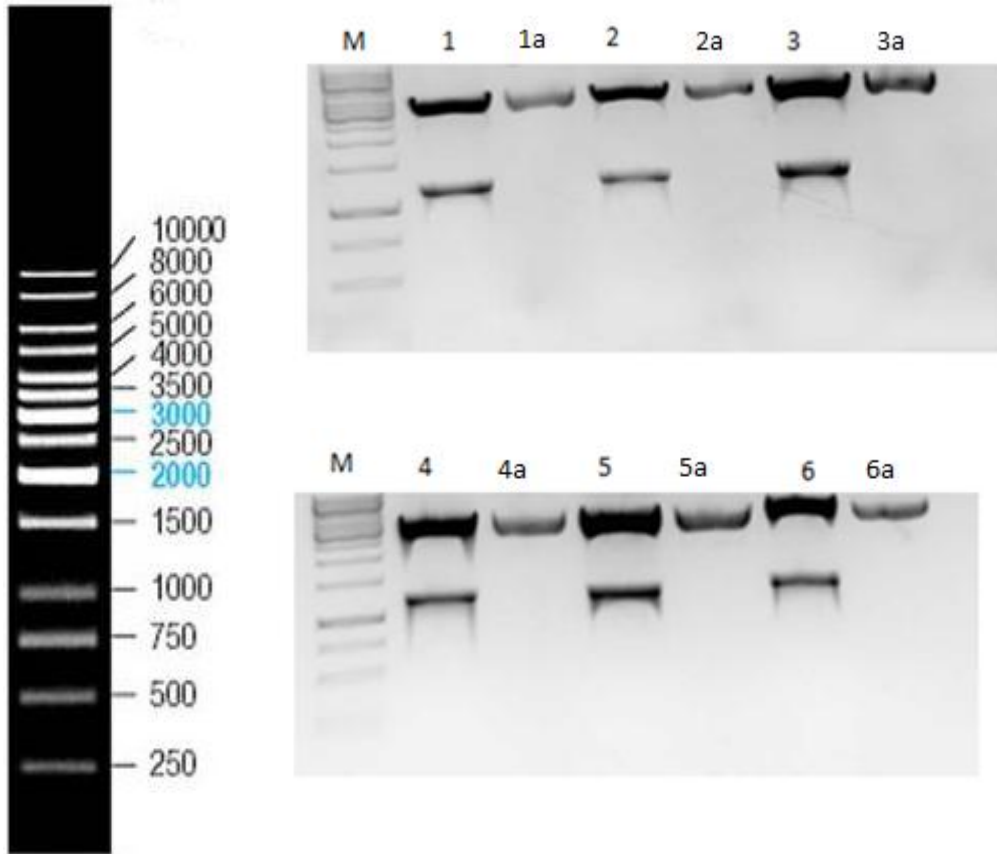
6-)



7-)



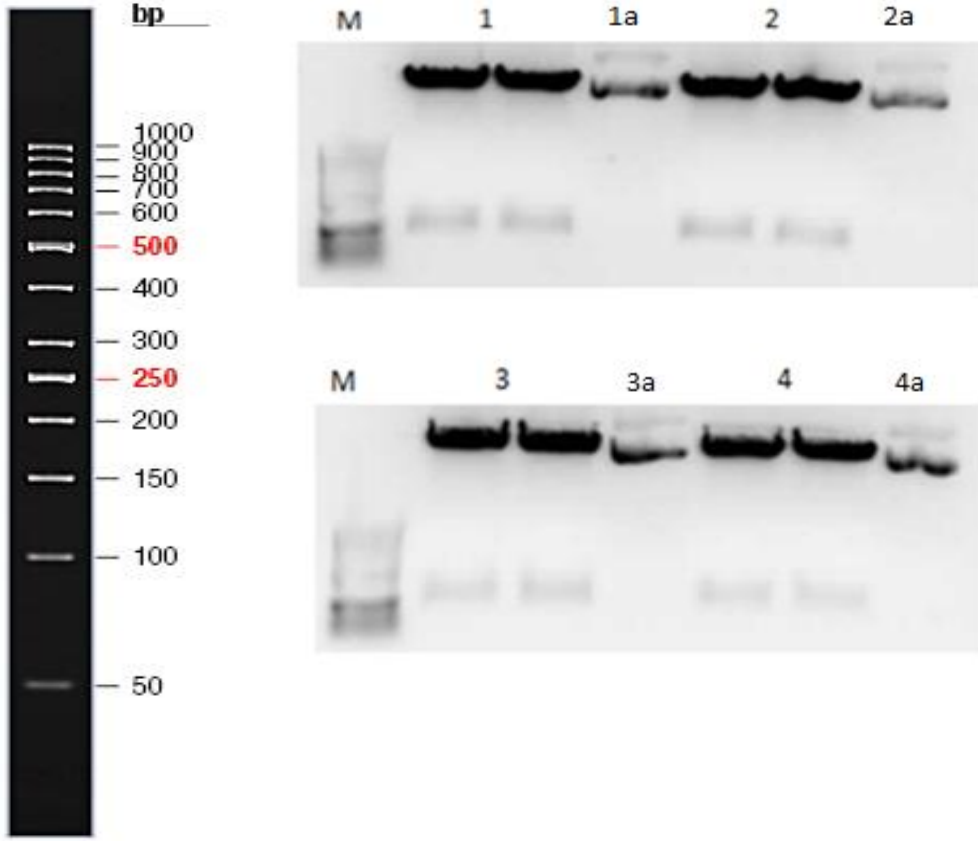
Şekil 3.7 'nin devamı



Şekil 3.8: pMetLuc vektörüne klonlanan PON1 geninin Sal1 ve Not 1 ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M : 1 kb marker , 1 :1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi, 3: 3.koloni kesimi, 4: 4. Koloni kesimi, 5: 5.koloni kesimi, 6: 6. Koloni kesimi, 1a : 1.koloninin miniprebi, 2a : 2.koloninin miniprebi, 3a : 3.koloninin miniprebi, 4a : 4.koloninin miniprebi, 5a : 5.koloninin miniprebi, 6a : 6.koloninin miniprebi.

Daha önceden pMetLuc haberci MCS bölgesine klonlanmış olan 154 bç büyüklüğündeki CAIX promotor bölgesi Bgl II ve Pst 1 enzimleri ile çıkarılarak PON1 bölgesini içeren pMetLuc haberci vektörüne klonlandı. Bu enzimleri seçerken hem PON1 genini hem de CAIX promotorunu kesmemesine dikkat edildi. Bunun için ilk önce CAIX promotor dizisi ve pMetLuc vektörü kesilerek jelden geri kazanıldı. Daha sonra de aynı enzimlerle kesilen bu iki parça 1 gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli DH10B* hücrelerine transforme edildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 4 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve Bgl II ve Pst 1 restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.8 de görüldüğü gibi ekilen 4

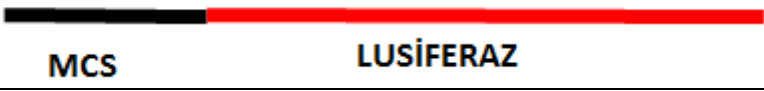
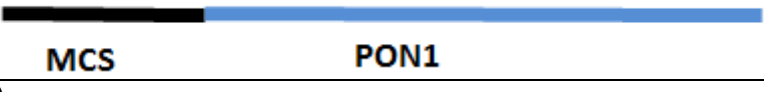
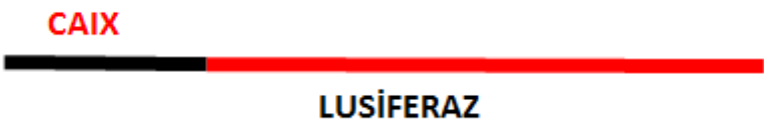
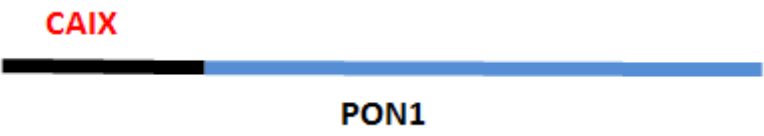
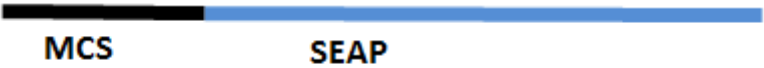
koloniden 4 tanesinde bulunan vektör rekombinanttır ve insan *PON1* dizisini içermektedir.



Şekil 3.9: pMetLuc vektörüne klonlanan CAIX promotorunun Bgl II ve Pst 1 ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M : 1 kb marker ,1 :1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi, 3: 3.koloni kesimi, 4: 4. Koloni kesimi,1a: 1.koloninin miniprebi, 2a: 2.koloninin miniprebi, 3a: 3.koloninin miniprebi, 4a: 4.koloninin miniprebi.

3.3 Transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesinde PON1'in kullanımı

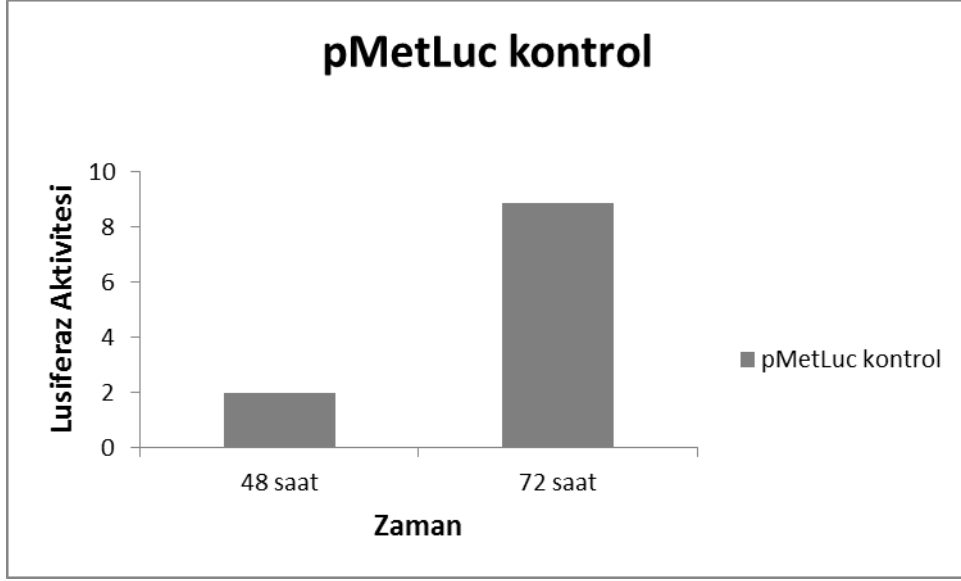
Transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için yukarıda detaylı olarak nasıl rekombinant hale getirildikleri basamak basamak açıklanan vektörler ile kontrol vektörleri kullanılmıştır. Vektörlerin şematize edilmiş hali şekil 3.9 da verilmiştir.

1-)		pMetLuc KONTROL
2-)		pMetLuc+PON1
3-)		pMetLuc + CAIX
4-)		pMetLuc + CAIX+PON1
5-)		SEAP KONTROL

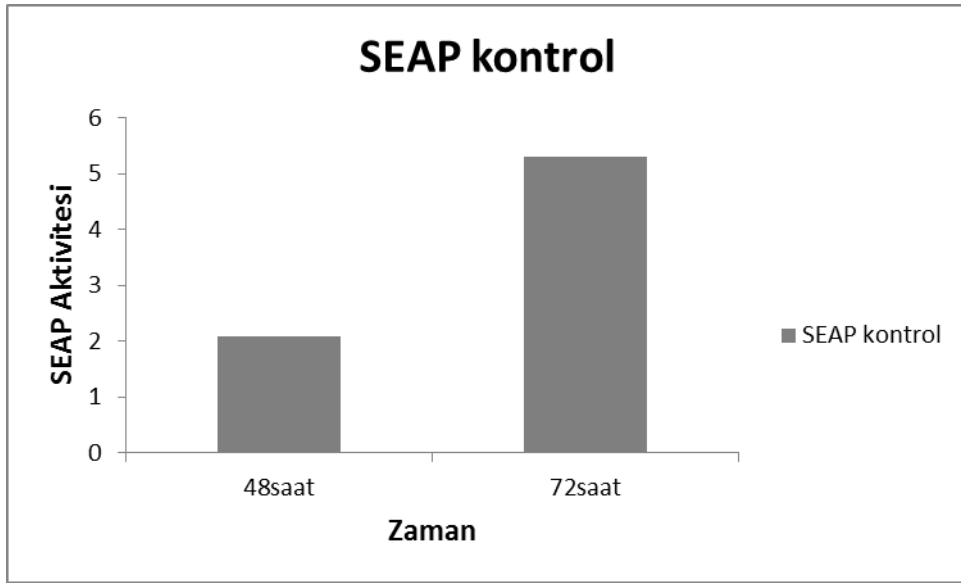
Şekil 3.10: Transfeksiyonda kullanılan vektörler

Şekil 3.9 da gösterilen vektörler kullanılarak hepatoma (Hep3B) hücrelerine kalsiyum fosfat presipitasyon metodu ile transfeksiyonlar yapılmış ve 48 ve 72 saat sonuçları analzi edilmiştir.

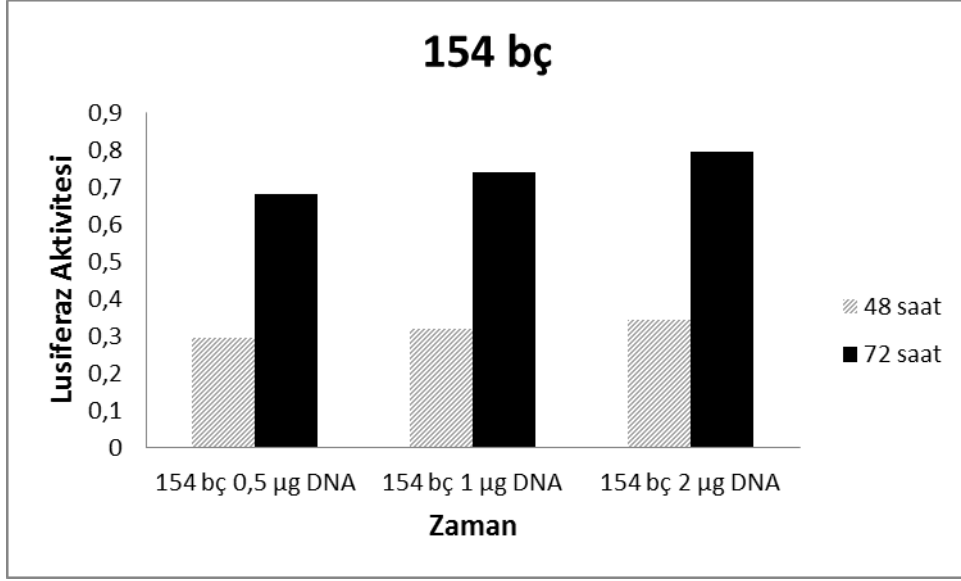
Lusiferaz enzim aktivitesini belirlemek için Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System kullanıldı. Ölçümler Luminoskan Ascent marka luminometre ile alındı. Lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesine oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Transfeksiyon sırasında transfeksiyon etkinliğinin analiz edilmesi amacıyla 0,5 µg SEAP (secreted alkaline fosfatase) vektörü de transfekte edildi.



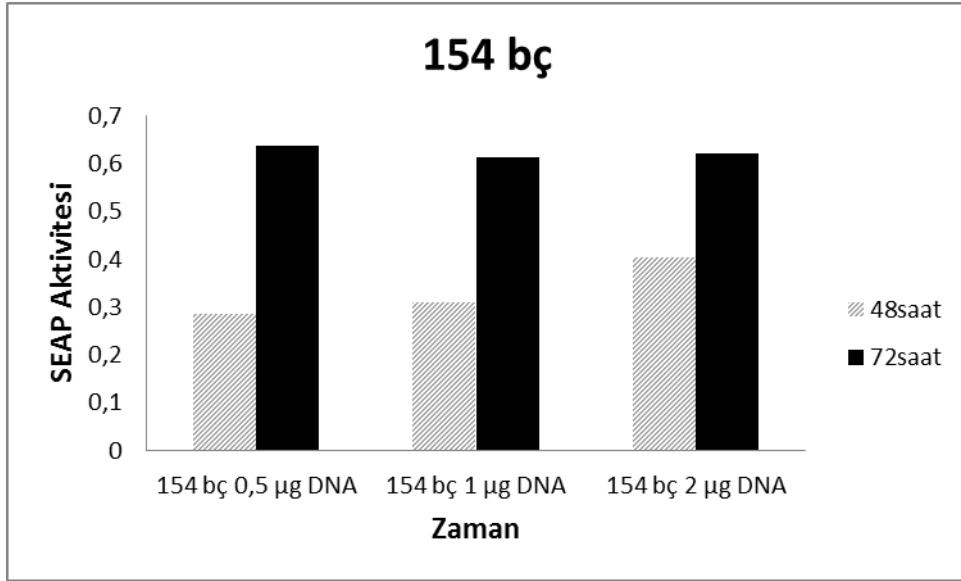
Şekil 3.11: pMetLuc kontrol vektörünün (1 numaralı konstrakt-şekil 3.9) lusiferaz sonuçları



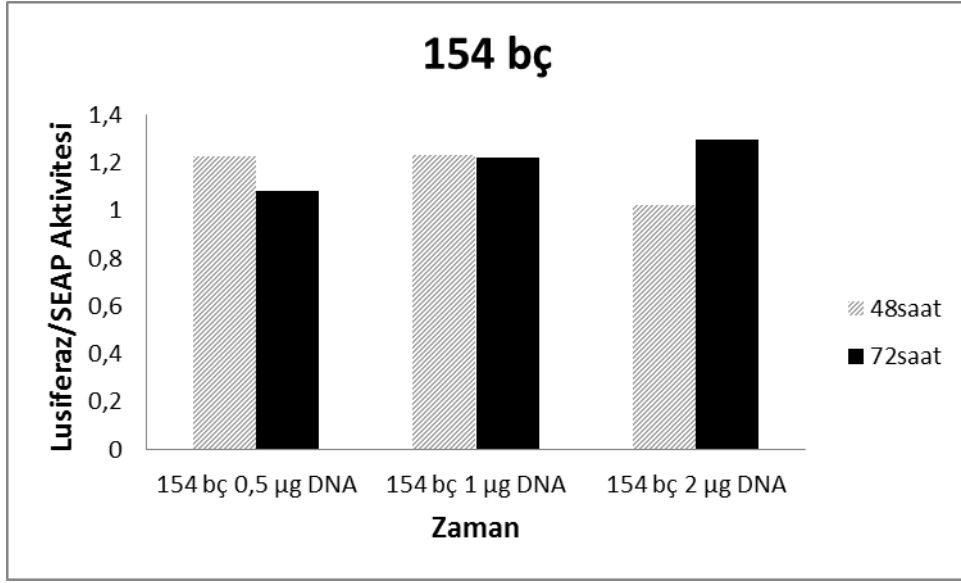
Şekil 3.12: SEAP kontrol vektörünün (5 numaralı konstrakt-şekil 3.9) seap sonuçları



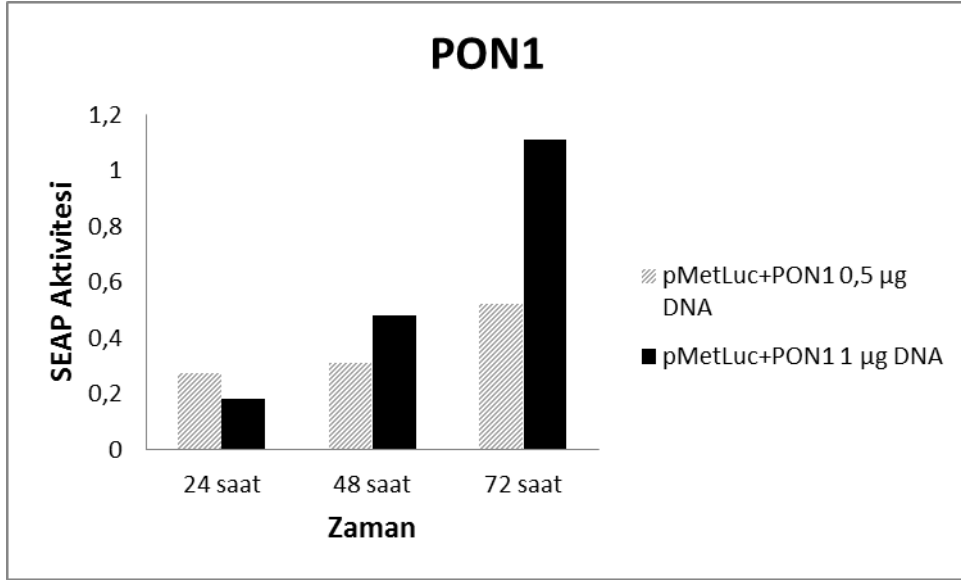
Şekil 3.13: 154 bç promotor parçasının (3 numaralı konstrakt-şekil 3.9) lusiferaz sonuçları



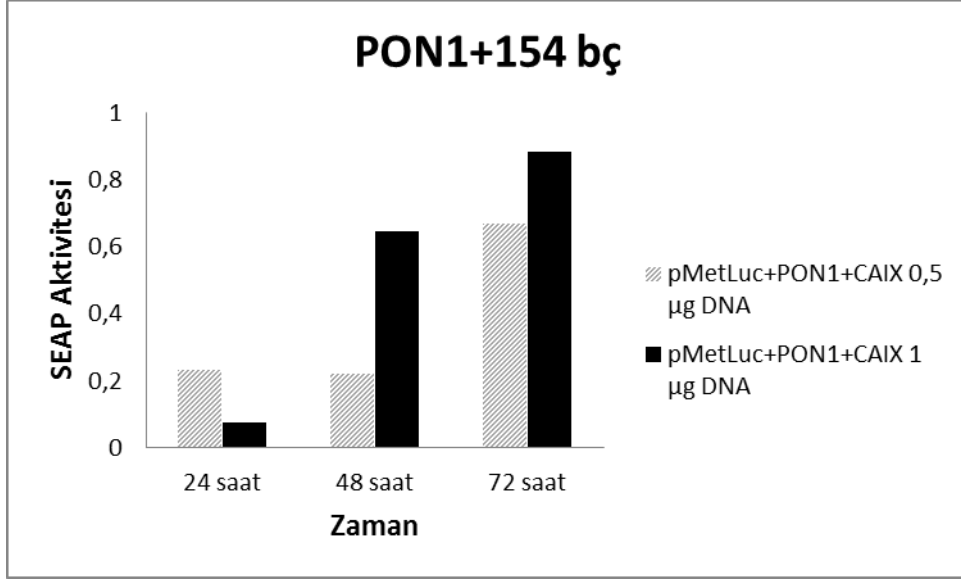
Şekil 3.14: 154 bç promotor parçasının (3 numaralı konstrakt-şekil 3.9) seap sonuçları



Şekil 3.15: pMetLuc vektörü içinde bulunan CAIX promotorunun (3 numaralı konstrakt-şekil 3.9) Lusiferaz/SEAP aktivitesi optimizasyon sonuçları (0,5 µg, 1 µg ve 2 µg)



Şekil 3.16: pMetLuc vektöründen lusiferaz geni çıkartılarak yerine PON1 geninin klonlanması ile oluşturulan 2 numaralı konstrakt için (şekil 3.9) seap sonuçları.



Şekil 3.17: PON1 geni ve CAIX promotorunu içeren pMetLuc vektörünün(4 numaralı konsrakt-şekil 3.9)seap sonuçları

pMetLuc +PON1		0,5 µg DNA					1 µg DNA	
		1.ölçüm	2.ölçüm	Fark	1.ölçüm	2.ölçüm	Fark	
	1.ölçüm	0,484	0,595	0,46	0,406	0,45	0,507	
	2.ölçüm	0,496	0,604	0,482	0,431	0,476	0,544	
	Fark	0,012	0,009	0,022	0,025	0,026	0,037	
pMetLuc +PON1+CAIX		0,5 µg DNA					1 µg DNA	
		1.ölçüm	2.ölçüm	Fark	1.ölçüm	2.ölçüm	Fark	
	1.ölçüm	0,444	0,406	0,483	0,478	0,552	0,508	
	2.ölçüm	0,466	0,458	0,513	0,492	0,567	0,523	
	Fark	0,022	0,052	0,031	0,014	0,024	0,015	

Şekil 3.18: 1 µg ve 0,5 µg PON1 ve PON1+CAIX un 24 saat spektrofotometre aktivite sonuçları

pMetLuc +PON1		0,5 µg DNA					1 µg DNA	
		1.ölçüm	2.ölçüm	Fark	1.ölçüm	2.ölçüm	Fark	
	1.ölçüm	0,534	0,574	0,788	0,461	1,935	1,179	
	2.ölçüm	0,54	0,578	0,802	0,48	1,867	1,409	
	Fark	0,006	0,004	0,014	0,019	-0,068	0,23	

pMetLuc +PON1+CAIX			0,5 µg DNA					1 µg DNA	
	1.ölçüm	0,573	0,956	0,568		0,601	0,606	0,517	
	2.ölçüm	0,607	1,04	0,596		0,617	0,625	0,56	
	Fark	0,034	0,084	0,028		0,016	0,019	0,043	

Şekil 3.19: 1 µg ve 0,5 µg PON1 ve PON1+CAIX un 48 saat spektrofotometre aktivite sonuçları

pMetLuc +PON1			0,5 µg DNA					1 µg DNA	
	1.ölçüm	0,494	0,439	0,444		1,385	0,399	0,438	
	2.ölçüm	0,498	0,441	0,455		1,334	0,41	0,444	
	Fark	0,004	0,002	0,011		-0,051	0,011	0,006	
pMetLuc +PON1+CAIX			0,5 µg DNA					1 µg DNA	
	1.ölçüm	0,52	0,54	0,417		0,442	0,467	0,443	
	2.ölçüm	0,529	0,584	0,43		0,461	0,488	0,476	
	Fark	0,009	0,044	0,013		0,019	0,021	0,033	

Şekil 3.20: 1 µg ve 0,5 µg PON1 ve PON1+CAIX un 72 saat spektrofotometre aktivite sonuçları

	N.K-1.KUYUCUK	N.K-2.KUYUCUK		N.K 1.KUYUCUK	N.K- 2.KUYUCUK
1.ölçüm	0,972	0,772	1.ölçüm	0,449	0,744
2.ölçüm	1,044	0,793	2.ölçüm	0,465	0,803
Fark	0,072	0,021	Fark	0,016	0,059
48 SAAT			72 SAAT		

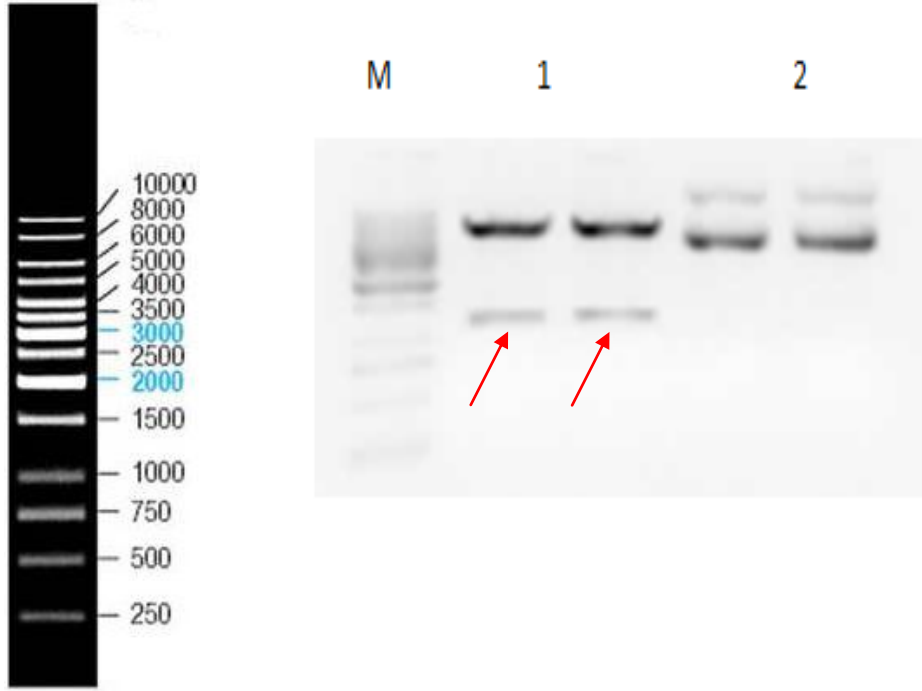
Şekil 3.21: Negatif kontrollerin(N.K) 48 ve 72 saat spektrofotometre aktivite sonuçları

Transkripsiyonel aktiviteler transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra medyundan alınan örnekler ile belirlendi Buna göre şekil 3.10 ve 3.11 görüldüğü gibi pMetLuc kontrol ve SEAP vektörlerindeki zamana bağlı aktivitedeki artış transfeksiyonun etkin bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Şekil 3.15 da PON 1 geni içeren pMetLuc vektörü ile Şekil 3.16 de PON1 geni ve CAIX promotörü içeren pMetLuc vektörlerinin SEAP vektörü ile kotransfeksiyonları sonucu elde edilen seap aktivitesi verilmiştir. Grafiklerde de görüldüğü üzere seap aktivitesi oldukça yüksektir ve transfeksiyonunun etkin bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Ancak tablolarda görüldüğü gibi, bu hücre gruplarından spektrofotometrik olarak PON1 enzim aktivitesinin tayin edilememiştir. Herhangi bir işlem yapılmamış olan negatif kontrol grupları ile karşılaştırdığında aktiviteler arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

3.4 Protein analizleri

3.4.1 İnsan *PON1* geninin ekspresyon vektörüne Alt Klonlama Yapılması ve *E.Coli*'ye Transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan *PON1* fonksiyonel protein aktivitesinin belirleneceği pET-30a ifade vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla öncelikle kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Daha sonra Sal 1 ve Not 1 enzimleriyle kesilmiş olan pET-30a vektörü ile jelden geri kazanılan insan *PON1* geni bir gece +4°C'de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E.coli DH5α* hücrelerine transforme edildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 2 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve Sal1 ve Not 1 restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.22 de görüldüğü gibi ekilen 2 koloniden 1 tanesinde bulunan vektör rekombinanttır ve insan *PON1* dizisini içermektedir.



Şekil 3.22: pET-30a vektörüne klonlanan PON1 geninin Sal1 ve Not 1 ile kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M: 1 kb marker, 1: 1.koloni kesimi, 2: 2.koloni kesimi.

3.4.2 pET-30a vektörü ve içine klonlanan PON1 geninin BL21DE3 kompetent hücrelere transformasyonu

Daha önceden plazmit izolasyonları yapılmış olan pET-30a ve PON1 içeren ekspresyon vektörü pET-30a, *BL21DE3* kompetent hücrelerine 5 µl kullanılarak transformasyonu gerçekleştirildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden 2 tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı.

3.4.3 Rekombinant proteinin ekspresyonu ve analizi

3.4.3.1 Ekspresyonun IPTG ile indüklenmesi

Rekombinant plazmit ve pET-30a ifade vektörü ekspresyon amacıyla BL_21(DE3) codon plus hücrelerine transforme edildi. 100 µg/ml kanamisin içeren

LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37 °C inkübasyona bırakılarak önkültür hazırlandı. Hazırlanan bu önkültürün 20 ml si 200 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi. 37 °C inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürü OD₅₅₀ 0,6-0,8'e ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM IPTG ile indüklendi. PON1 genini taşıyan örnek 0,5 mM IPTG ve 1 mM IPTG olmak üzere iki farklı şekilde 1 gece boyunca indüklenmeye bırakıldı. Son konsantrasyonu yaklaşık 250 µM olacak şekilde CaCl₂ kültüre eklendi. İnkübatörün sıcaklığı 30°C ye indirilerek indükleme süresi 16 saat olacak şekilde çalışıldı.

3.4.3.2 Hücrelerin Yıkınması

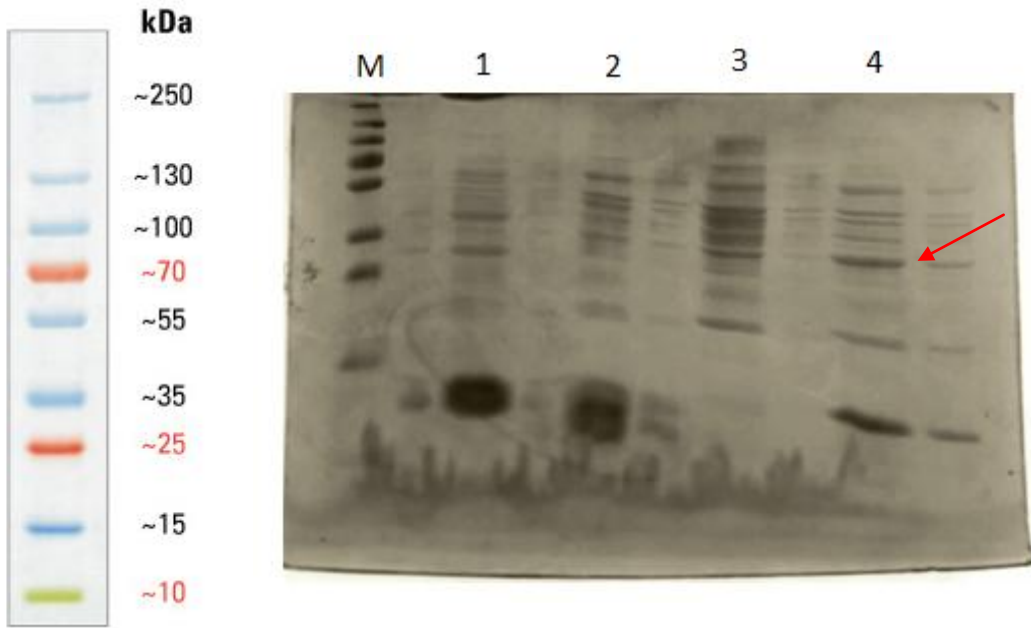
İndükleme süresi sonunda bakteri kültürü 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti yıkama tamponunda çözüldükten sonra tekrar santrifüjlendi. Bu işlem 2 kez tekrarlanmak hücreler yıkanarak kurutuldu. -20 °C ye kaldırıldı.

3.4.3.3 Liziz Aşaması

Bakteriyel hücre pelleti buz üzerine alınıp çözünmesi beklendi. 10 ml soğuk liziz tamponunda çözülerek vortekslendi ve buzda inkübasyona bırakıldı. Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde PMSF eklendi. Taze olarak hazırlanmış 10 mg/ml lizozim stok solüsyonundan 250 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 30 mg/ml protamin sülfat stok solusyondan 1 ml eklenerek santrifüj tüpü 2 dakika süreyle alt üst edildi. 3000 rpm de +4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan temiz kısım temiz bir tüpe alındı.

3.4.3.4 SDS PAGE

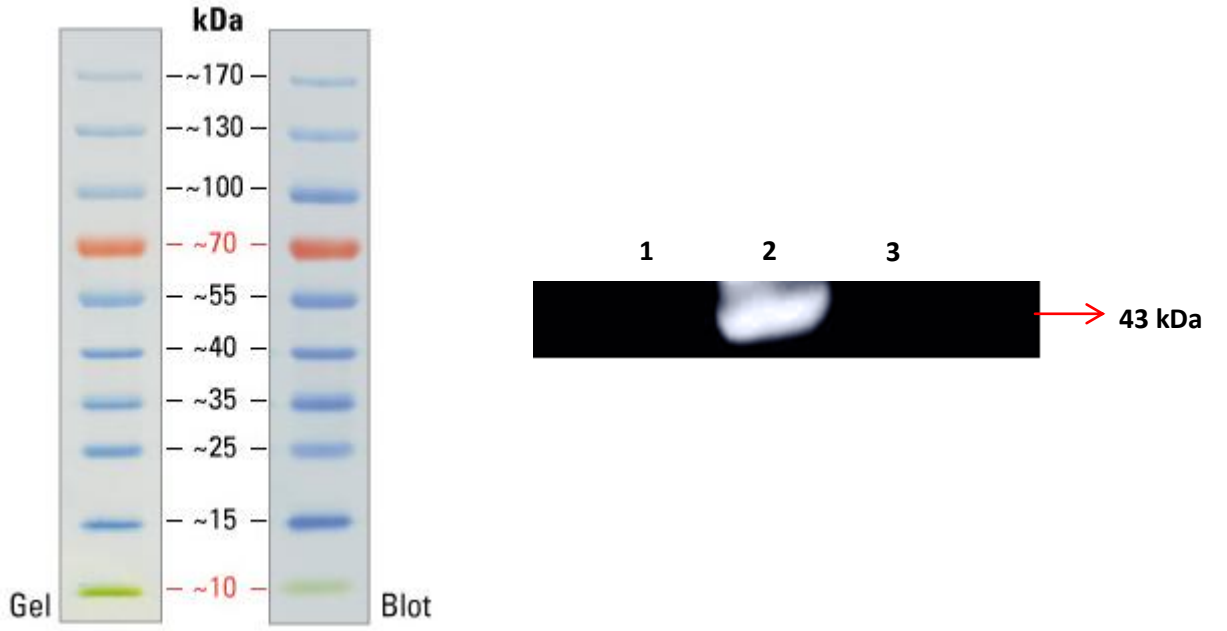
Lizizleri yapılan BL_21(DE3) kompetan hücresi, pET-30a vektörü ve PON1 genini taşıyan pET-30a protein seviyelerinin belirlenmesi amacıyla jele yüklendi. 4 nolu örnekte 43 kDa seviyesinde bant tespit edildi.



Şekil 3.23: SDS jel görüntüsü M: Marker, 1: BL_21(DE3) kompetan hücresi, 2: pET-30a vektörü, 3: 0,5 mM IPTG ile indüklenmiş pet30a vektörü içindeki PON1, 4: 1 mM IPTG ile indüklenmiş pET-30a vektörü içindeki PON1

3.4.3.5 Western Blot

PON1 ifadesinin SDS PAGE ile belirlenmesinin ardından, klonlanan genin protein düzeyinde var olup olmadığını belirlemek üzere western blot çalışması yapıldı. Buna göre proteinler bölüm 3.4.3.3'de belirtildiği gibi elde edilerek eperndoflara paylaştırılıp $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı. Elde edilen proteinler SDS PAGE yüklendi ve 1 gece $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de transfere bırakıldı. Transferden sonra protein bandlarının transfer olup olmadığını belirlemek için SDS jeli transfer sonrası boyamaya alındı. Western blot bölüm 2.2.3.16'da belirtildiği şekilde yapıldı ve primer antikor olarak 1: 500 dilüsyonda His Tag antikor (Qiagen) kullanıldı. $2240\text{ }\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda protein kullanılarak PON 1 proteininin işaretlanması yapıldı. Deney sonucunda 43 kDa büyüklüğündeki PON1 proteininin varlığı tespit edildi.



Şekil 3.24: İnsan PON1 proteinin işaretlenmesinin film üzerinde gösterimi. 1: BL_21(DE3) kompetan hücresi, 2: pET-30a vektörü içindeki PON1, 3: pET-30a vektörü.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmanın ilk aşaması klonlama ve alt klonlamadan oluşurken, diğer aşaması transfeksiyon ve protein analizinden oluşmaktadır. Klonlama basamağına geçmeden önce elimizde bulunan PON1 genini içeren pcDNA3.1 vektörü dizi analizine gönderildi ve genin büyüklüğü saptandı. Sonraki aşamada ise Sal1 ve Not1 enzimleri kullanılarak primer dizaynı yapıldı. Sal1 ve Not1 enzimlerinin seçilmesinin sebebi ise alt klonlama aşamasında pMetLuc haberci vektörünün lusiferaz bölgesinin yine aynı enzimlerle kesilmiş olmasıdır.

Kalıp olarak pcDNA3.1 vektörü kullanılarak PZR kuruldu ve istenilen büyüklükteki (1068 bp) PON1 geni çoğaltılmış oldu. Çoğaltılan gen bölgesi pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Alt klonlama safhasında ise, öncelikle olarak pMetLuc haberci vektöründe bulunan lusiferaz geni Sal1 ve Not1 restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkarıldı. Daha sonra bölüm 3.2.4'de anlatıldığı biçimde (şekil 3.6) çıkarılan bu bölgenin yerine pGEM-T Easy vektöründe bulunan PON1 geni yine aynı enzimlerle kesilerek yapıştırıldı ve alt klonlanma tamamlandı.

Paraoksonaz enzimi ve PON1 geni ilgili çalışmalar literatürde geniş yer kaplamaktadır. Temel olarak paraoksonaz enzimi ilk olarak 1946 yılında Abraham Mazur tarafından keşfedilmiş ve sonraki yıllarda insan serum paraoksonazı (PON1) olarak isimlendirilmiştir [1-4]. 1996 yılında paraoksonaz aktivitesinden sorumlu bir gen ailesinin olduğu belirlenmiş ve PON1, PON2 ve PON3 olarak sıralanmıştır [14,21].

Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [26, 27, 32]. Yapılan çalışmalar PON1 geninin 7.kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22 de bulunduğunu tespit etmiştir [14, 82].

İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [26,31].

Enzim üzerine yapılan çalışmalar daha çok aktivite ile ilgili olurken polimorfizm çalışmaları da oldukça fazladır. Paraoksonaz aktivite polimorfizminin

moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliğinden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile bağlantılıdır. Bu mutasyonlarda birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir. Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim 55. pozisyonda lösenden (L), metiyonine (M) olan değişimdir. Bu mutasyonun PON1'in aktivitesi üzerinde etkisi çok az iken, serumdaki protein seviyesini etkilediği tespit edilmiştir. PON1'in R allelinin kodlandığı proteinin paraoksan hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir. 1973'de Von Mallinckrodt ve arkadaşları tarafından enzimin genetik polimorfizm gösterdiği ve enzim aktivitelerinin trimodal dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir. Daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı bulgularla açıklamıştır [21,82-85].

Çalışmanın diğer basamağında PON1 geninin ifadesini saptamak için gen, ifade vektörü olan pET-30a vektörüne klonlandı. Daha sonra ise, hem PON1 genini içeren pET-30a hem de boş pET-30a vektörü BL_21(DE3) Codon plus kompetent hücrelerine transforme edildi. Örnekler SDS PAGE jeline yüklenmeden önce IPTG ile indüklenmeleri yapıldı, bunun yanında paraksonoaz enziminin katalitik bölgesinde Ca^{2+} iyonu bulunduğu için ekspresyon aşamasında PON1 genini içeren pET-30a vektörüne $CaCl_2$ eklendi. Paraoksonaz aktivite için Ca^{2+} iyonuna bağlı 43 kDa büyüklüğünde bir enzimdir [14, 86,87]. Bu aşamadan sonra SDS PAGE jeline örnekler yüklendi ve sonuçta paraksonazın moleküler ağırlığı olan 43 kDa 'a yakın bir bant gözlemlendi.

Bu durum geçmişte yapılan çalışmalarla uygunluk göstermektedir. PON1 'in minimum moleküler ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak saptamışlardır [14,87]. Bunun sebebi enzim yapısında toplam moleküler ağırlığının %15,8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir. İçerdiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizme reaksiyonu için gerekli değildir. Karbonhidrat molekülünün PON1'in çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada, zar yapısına bağlanmada görevlidir. PON1 enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmekte ve insan PON1 enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyun PON1 enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [14, 21,87-93].

İfade edilen PON1 western blot analizi ile analiz edildi. Bunun için pET-30a vektörüne özel antikor ve bloklama tamponunu içeren His Tag kiti kullanıldı.

Membranı bloklama işlemi 1 saat sürerken 1: 500 dilüsyonda olan antikorla muamele 2 saat sürdü. Çalışma sonunda tek bir bant elde edildi ve bant protein markerdan kontrol edilerek 43 kDa büyüklüğünde olduğu tespit edildi. Böylece klonlanan PON1 geninin ifade olduğu net bir şekilde anlaşılmış oldu.

İnsan hepatoselüler karsinoma ve rat hepatoma hücre dizilerinde, peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör-alfa (PPAR α) ligandlarının paraoksonaz 1 (PON1) enziminin ifadesine ve aktivitesine etkisi ve PPAR α ligandlarının kendi reseptör proteinlerinin ekspresyonunu nasıl etkilediği incelenmiştir. PON1 aktivitesi paraokson ve fenilasetat hidrolizi üzerinden spektrofotometrik olarak değerlendirilirken, PON1 ve PPAR α ekspresyonu ise western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir [94].

Çalışmanın asıl amacını içeren son aşama ise transfeksiyon deneylerinden oluşmaktadır. pMetLuc haberci vektörüne klonlanan PON1 genini içeren vektör transfeksiyonlar sırasında kontrol olarak kullanılırken, 154 bp büyüklüğündeki promotor parçasını ve PON1 genini içeren pMetLuc haberci vektörü ise asıl aktivitenin belirleneceği vektör olarak kullanıldı. Kullanılan haberci vektörün lusiferaz bölgesi çıkarılıp yerine PON1 genini klonladığı için örneklerin aktivite sonuçlarını alırken lüminimetre yerine spektrofotometre kullanıldı. Normalde lusiferaz geninin ön kısmına klonlanan promotor bölgeleri bu çalışmada PON 1 geninin önüne klonlanarak aktivite ölçümünde lusiferaz geni elimine edildi.

Lusiferaz içeren salınan haberci sistemlerin çalışma mantığında, kültürde büyütülen hücreler deney kurmaya hazır hale geldikten sonra kalsiyum fosfat pretipitasyon yöntemiyle örnekler hücrelere transfekte edilir ve genelde 24, 48 ve 72 saat aralıkla sonuçlar medyumdan alınır. Sonuç alınırken diğer haberci vektörlerde hücre kazıma metodu kullanılırken pMetLuc haberci vektörlerinde medyum kullanılır. Bunun sebebi ise vektörün kültür medyumuna salınmasıdır. Bu durum sonuç alırken büyük kolaylık sağlar. Alınan sonuçlar ise lusiferaz substratları kullanılarak lüminimetre de okutulur. Bu çalışmada ise lusiferaz yerine paraoksonaz kullanıldığı için promotor aktivitesi spektrofotometreden belirlenir. Spektrofotometre kullanılmasının en büyük avantajı ise pahalı solüsyonlar gerektirmemesi ve lüminimetre cihaz ihtiyacını ortadan kaldırmasıdır.

Çalışmada yapılan transfeksiyon deneyinde PON1 içeren pMetLuc vektörlerinin dışında transfeksiyonun etkinliğini belirlemek amacıyla SEAP vektörü, pMetLuc kontrol vektörü, güçlü bir promotor parçası içeren pMetLuc vektörü

kullanıldı. Bunun yanında hiçbir vektörle transfekte edilmemiş hücreler de kullanıldı. Çalışılan tüm örneklerin transfeksiyon aşamasında SEAP solüsyonu kullanıldığı için SEAP aktivitesine bakıldı ve değerler grafik haline getirilerek değerlendirildi. Bunun yanında PON1 bölgesini içermeyen örneklerin lusiferaz aktivitelerine bakıldı ve değerlendirildi. Bu sonuçlar sonunda transfeksiyonun etkinliği tespit edildi ve anlamlı değerler elde edildi.

Diğer taraftan ise PON 1 bölgesini içeren örneklerin 412 nm absorbansa 37 °C 'de sıcaklıkta 1 dakika arayla spektrofotometre de aktivitelerine bakılmıştır.

Salınan haberci lusiferaz sistemi, ökaryotik promotorların ve enhansörlerin sistematik analizleri için salınan haberci lusiferaz sistemi bir araçtır. Sistem, medyum süpernatantı kullanarak hücreleri liziz etmeden, promotor ve enhansörlerin aktivitesini gösteren haberci bir molekül olan salınan *Metridia* lusiferazı kullanır. Hücreler ilgili haberci vektör ile transfekte edilir ve deneye hazır hale gelene kadar kültüre alınır. İndükleyici eklendiğinde haberci molekül ifade olur ve hücre dışına süpernatantın içine salınır. Lusiferaz substratı medyum süpernatantına eklenir ve salınan lusiferaz aktivitesi için hücre liziz basamağına ihtiyaç duyulmadan, basit, duyarlı, liziz ve radyoaktif olmayan bu sistem kullanılarak pMetLuc haberci gen ifadesi belirlenir. Deney direkt olarak kültür içinde ya da süpernatant paylaşılırak diğer kuyucuklu plakaya transfer edilerek yapılabilir [81].

Salınan haberci sistemleri için alternatif bir yöntemin oluşturulmasını amaçlayan tezimiz kapsamında, lusiferaz yerine paraksonaz geni kullanılarak, zaten avantajlı olan sistemin daha ucuz ve kitlerden bağımsız olarak çalışmanın mümkün olması amaçlanmıştır. Özellikle sonuçların spektrofotometrik olarak belirlenebilecek olması en önemli avantajlardan bir tanesidir. Lusiferaz aktivitesinin luminometrik olarak belirlenebiliyor olması cihazın birçok laboratuarda bulunmaması nedeniyle kısıtlayıcı bir faktördür. Ancak spektrofotometre genel olarak bütün moleküler biyoloji, genetik ve biyokimya laboratuvarlarında bulunan genel bir cihazdır. Ayrıca paraksonazın substratı olan paraoksanın da ucuz olması ve kolay elde edilebilir olması sistemin diğer önemli avantajlarından. Lusiferazın substratı olan lusiferin oldukça pahalıdır ve bu sistemde kite bağımlı olarak çalışmak çalışmaların maliyetini artırarak araştırmacıları zorlamaktadır.

Sonuç olarak tezimiz kapsamında PON1 geni ve CAIX promotörü klonlanarak rekombine edilmiş bir vektör sistemi dizayn edilmiştir. Ayrıca pET30.a vektörüne klonlanan PON1 proteinin varlığı hem SDS analizi hemde western blot ile gösterilmiştir. Hazırlanan rekombinant vektörler ve kontrol vektörleri kullanılarak

yapılan transfeksiyon çalışmaları ile de transfeksiyon etkin bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak paraksonaz aktivitesinin spektrofotometrik olarak belirlenememiş olması hücre medyumunda PON1 in yeterli seviyede olmadığını düşündürmektedir. Bu konuda optimizasyonların yapılması gelecek çalışmalar için yapılacak hedeflerimiz arasındadır. Yine PON1'in hücre medyumuna salındığından emin olunması için hücre medyumundan protein analizlerinin de yapılması gerekmektedir. Tezimiz kapsamında yapılan çalışmalar özellikle transkripsiyonel aktivite çalışan araştırıcılar için alternatif bir vektör sisteminin geliştirilmesini amaçladığı için oldukça önemlidir ve bu konuda elde edilen ilk veriler olması aaisından çok önemlidir. Ayrıca çalışmalarımız bu konuda yapılacak gelecek çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

zet olarak tezimiz kapsamında sırasıyla aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- 1. *PON1* geninin *pMetLuc* vektörüne alt klonlaması:** Dragomir Draganov, MD, Phd'den temin edilen pCDNA3.1 vektörü içinde bulunan PON1 geni PZR dayalı strateji ile çoğaltılarak pGEMTeasy vektörüne klonlandı. İlk olarak pMetLuc vektöründeki lusiferaz gen bölgesi restriksiyon kesimleri ile uzaklaştırıldı. Lusiferaz geni yerine pGEMTeasy vektöründen kesilerek ıkarılan PON1 geni klonlandı. İkinci aşamada ise pMetLuc vektörü içindeki MCS bölgesine, CAIX promotörüne ait en küçük konstrukt olan [-116/+38] baz çiftlik bölge klonlandı.
- 2. *İnsan PON1* geni ifadesinin validasyonu:** Bu amaçla pGEMTeasy vektöründeki PON1 geni pET30a ifade vektörüne alt klonlaması yapıldı. Protein analizler SDS page ve western blot ile doğrulandı.
- 3. *Transfeksiyon analizleri:*** PON1 geni ve CAIX promotörünün klonlanması ile modifiye edilen pMETLuc vektörü, SEAP vektörü, CAIX promotörü ve Lusiferaz geni içeren modifiye edilememiş pMetLuc vektörü, lusiferaz geni içeren ancak promotör içermeyen pMetLuc kontrol vektrleri kullanılarak karaciğer hücre hattına (Hep3B) transfeksiyonlar yapıldı. Transfeksiyon sonuçları hem luminometrik hem de spektrofotometrik olarak lld ve analiz edildi.

5. KAYNAKÇA

- [1] Uysal S., Akyol S., Hasgöl R., Armutcu F., Yiğitoğlu M.R., “Çok Yönlü Bir Enzim: Paraoksonaz”, *Yeni Tıp Dergisi*, 28(3),136-141,(2011).
- [2] Mazur A.,” An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates”, *J Biol Chem*, 164, 271-89, (1946).
- [3] Aldridge WN., “Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B)hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination”, *Biochem J.*,53(1), 110-7, (1953).
- [4] Aldridge WN.,” Serum esterases II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera”, *Biochem J.*,53(1), 117-24, (1953).
- [5] Van Himbergen TM., Van Tits LJH, Roest M., Stalenhoef AFH.,” The story of PON1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine”, *Neth J Med.*, 64(2), 34-8, (2006).
- [6] Solmaz Avcıkurt, A.,” Bazı İlaçların Paraoksonaz İzoenzimleri (pon1 ve pon2) Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [7] Rodrigo, L., Gil,F., Hernandez, A.F.,Lopez, O., Pla, A.,”Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purificationand biochemical properties”, *Biochem. J.*, 376, 261–268, (2003).
- [8] Baskol, G., Köse K., ”Paraoksonaz: Biyokimyasal Özellikleri, Fonksiyonları ve Klinik Önemi”, *Erciyes Tıp Dergisi*, 26(2), 75-80, (2004).
- [9] Can Demirdöğen, B.,”Organofosfatlı-Pestisit-Zehirlenmeleri ve Serum Paraoksonaz 1 (PON1) Enziminin Organofosfat Metabolizmasındaki Rolü”,*Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(2), 97-112, (2010).
- [10] Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y., Morino, A.,” Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a

prodrug of a new antibacterial agent”, *Drug Metab Dispos*, 26(4): 355-9, (1998).

[11] Chambers, JE., *PON1 multitasks to protect health*, PNAS; 105 (35): 12639-40, (2008).

[12] Kaya,M.O.,”Meme Kanserli Olgularda Paraoksonaz (PON1) Polimorfizminin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).

[13] Erdem, M.S.T. "ST Elevasyonlu Miyokard infarktüsü (Stemi) Hastalarda insan Paraoksonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004).

[14] Sinan,S.,”İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).

[15] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry,” Enzyme Nomenclature. Recommendation 1984 Suppl. 2,correction and additions”, *European Journal of Biochemistry*,489-533,(1989).

[16] Mackness, B., D.P.N., Mackness, M.I., "Human Serum Paraoksonase". *Gene Pharmacy*, 31(3), 329-36, (1998).

[17] Memişoğulları, R., Orhan, N., "Paraoksonaz ve Kanser”.,*Konuralp Tıp Dergisi*, 2(2), 22-26, (2010).

[18] Juretic, D., Tadijanovic, M., Rekić, B., Simean-Rudolf, V., Reiner, E., Baricic, M.,” Serum paraoksonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study”, *Clin Sci*, 42, 146-150, (2001).

[19] Li, WF., Costa, LG., Furlong, CE.,” Serum paraoksonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates”, *J Toxicol and Environ Health*, 40: 337-346, (1993).

[20] Öztürk H.,”Diabetes Mellitus’da Paraoksonaz Aktivitesi ve AOPP Düzeyleri”.Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi, *Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi*,Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, İstanbul, (2008).

[21] Primo-Parma, SL., Sorenson, RC., Teiber, J., La Du, BN.,” The human serum paraoksonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family”, *Genomics*, 33, 498-509, (1996).

- [22] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Curr Opin Lipidol*, 7, 69-76, (1996).
- [23] Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkei, W., Durrington, P.N., "The effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification", *FEBS Letters*, 423, 57-60, (1998).
- [24] Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R.A., Curatola, G., "Protective effect of paraoxonase activity in highdensity lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type1 diabetic patients", *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2957-62, (2004).
- [25] Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C. ve ark., "Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females", *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 1728-33, (2005).
- [26] Akçay, F., "İnsan Serum Paraoksonaz Enzimi (PON 1) 192 GLN-ARG Gen Polimorfizminin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir*, (2006).
- [27] Michael, I., Mackness, B.M., Paul N. Durrington, "Paraoxonase and coronary heart disease", *Atherosclerosis Supplements*, 3, 49-55, (2000).
- [28] Marchesani, M., Tuomainen, T-P., Kaikkonen, J., Pukkala, E., Uimari, P., Seppälä, E., Matikainen, M., Kallioniemi, O.P., Schleutker, J., Lehtimäki, T., Salonen, J., "New Paraoxonase 1 Polymorphism I102V and the Risk of Prostate Cancer in Finnish Men", *Journal of the National Cancer Institute*, 95(11), 812- 818, (2003).
- [29] Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal", *Am Insit Pasteur*, 101-104, (1961).
- [30] Kirsty S. Robertson, Emma Hawe, George J. Miller, Philippa J. Talmud, Steve E. Humphries, "Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639, 203– 212, (2003).

- [31] Draganov, B.N.L.D., "Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, 78–88, (2004).
- [32] Liang, H., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases." , *J Mol Med*, 81, 766–779, (2003).
- [33] La Du, BN., Aviram, M., Billecke, S., et al., "On the physiological role(s) of the paraoxonases", *Chem Biol Interact*, 119-120, 379-388, (1999).
- [34] Rodrigo, L., Hernandez, F., Caballero L., Gil F, Pla A., "Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role", *Chem Biol Interact*, 137, 123-137, (2001).
- [35] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, CL., Newton, RS., Primo-Parmo, SL., La Du, BN., "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase", *J Clin Invest*, 101, 1581-1590, (1998).
- [36] Walker, CH., Mackness, MI., "A-esterases and their role in regulating the toxicity of organophosphates", *Arch Toxicol*, 60: 30-33, (1987).
- [37] Hahn, M., Subbiah, MT., " Significant association of lipid peroxidation products with high density lipoproteins", *Biochem Mol Biol Int*, 33, 699-704, (1994).
- [38] Watson, AD., Berliner, JA., Hama, SY., et al., " Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein", *J Clin Invest*, 96, 2882-2891, (1995).
- [39] La Du, BN., " Structural and functional diversity of paraoxonases", *Nat Med*, 2, 1186- 1187, (1996).
- [40] Eckerson, HW., Romson, J., Wyte, C., La Du, BN., " The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts", *Am J Hum Genet*, 35 (2), 214-27, (1983).
- [41] Gülcü, F., Gürsu, MF., " Paraoksonaz ve Aril Esteraz Aktivite Ölçümlerinin Standardizasyonu", *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(2), 45-9, (2003).
- [42] Selek, S., Cosar, N., Kocyigit A, Erel, O., Aksoy, N., Gencer, M., et al., "PON1 activity and total oxidant status in patients with active pulmonary tuberculosis", *Clin Biochem*, 41(3), 140-4, (2008).

- [43] PON kataliziyle gerçekleşen tepkime [online].(18 ekim 2013), [http://www.baranmedikal.com .tr/tr/?/DuyuruDevam/49](http://www.baranmedikal.com.tr/tr/?/DuyuruDevam/49).
- [44] Bilecke, S., Draganov, D., Counsell, R., et al.," Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab Dispos*, 28, 1335-1342, (2000).
- [45] Yıldırım, H.," Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [46] Klug, W. S. ve Cummings, M. R., Genetik Kavramlar, Öner, C., 6. baskı, Palme yayıncılık, Ankara, (2002).
- [47] Latchman, D. S. Eukaryotic Transcription Factors. London, Academic Press., (1998).
- [48] Tura Kockar, F. ," Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene", PH. D. Thesis, *Cardiff School of Biosciences*, Cardiff University, (1999).
- [49] Gen ifadesinin kontrolü. [online]. (15 ekim 2013), [https://www.google.com.tr /search?q=gene+expression&espv](https://www.google.com.tr/search?q=gene+expression&espv).
- [50] Uğraş, S.," C/EBP Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu", Yüksek Lisans Tezi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2007).
- [51] Wolffe, A., In Chromatin: Structure And Function (2nd Edn.), Academic Pres London, (1995).
- [52] Roeder, R.G., "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II" *Trends Biochem. Sci.*, 21, 327, (1996).
- [53] Ham, J., Steger, G And Yaniv. M.," How do eukaryotic activator proteins stimulate the rate of transcription by RNA polymerase II? " *Febs Lett.* 307,81, (1992).
- [54] Maniatis,T., Fritsch, E.F. And Sambrook, J. In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York , (1982).
- [55] Klamut, H.J., Bosnoyan-Collins, L.O., Worton, R.G., Ray, P.N., Davis, H.L., "Identification of a transcriptional enhancer within muscle intron 1 of the human dystrophin gene", *Human Molecular Genetics*, 5, 1599, (1996).

- [56] Bjorklund, S. And Kim, Y.J.” Mediator of transcriptional regulation.” *Trends Biochem. Sci.*, 21,335-337, (1996).
- [57] Ogbourne, S. ve Antalis, T.M.” Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes”, *Biochem J.*, 331,1-14, (1998).
- [58] Kamakaka, R. T., “Silencers and locus control regions: opposite sides of the same coin”, *Trends Biol. Sci.*, 22, 124, (1997).
- [59] Orphanides, G., Lagrange, T., Reinberg, D. "The general transcription factors of RNA polymerase II.", *Genes Dev* 10, 2657, (1996).
- [60] Kadonaga, J. T., "The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II.", *Exp Mol Med*, 34, 259, (2002).
- [61] Smale, S. T. and Kadonaga, J. T., "The RNA polymerase II core promoter.", *Annu Rev Biochem*, 72, 449, (2003).
- [62] Akyüz, M.D.”C2C12 Fare Miyoblast Hücre Hattında Kalıclı Transfeksiyonun Gerçekleştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Tıbbi Biyoloji Programı, Ankara, (2009).
- [63] Schenborn, E.T. ve Goiffon, V.” DEAE-Dextran Transfection of Mammalian Cultured Cells”, *Methods in Molecular Biology*, 130, 147-153, (2000).
- [64] Schenborn, E.T. ve Oler, J.” Liposome-mediated transfection of mammalian cells”, *Methods in Molecular Biology*, 130, 155-164, (2000).
- [65] Hücre kültüründeki transfeksiyon aşamaları [online]. (27 ekim 2013), <http://www.cellapplications.com/transfect-primary-cells.php>.
- [66] Power, C.A. ve Meyer, A.” Generation of Stable Cell Lines Expressing Chemokine Receptors”, *Methods in Molecular Biology*, 130, 99-104, (2000).
- [67] Transfeksiyon yöntemleri. [online]. (26 ekim 2013), <http://www.protocol-online.org>.
- [68] Van der Eb, *Virology*, 52, 456, (1973).
- [69] Kalsiyum fosfat transfeksiyonu [online]. (30 ekim 2013), <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209014288>.
- [70] Pediatrik Moleküler Patoloji and Genetik kongresi. Eylül, (2003).

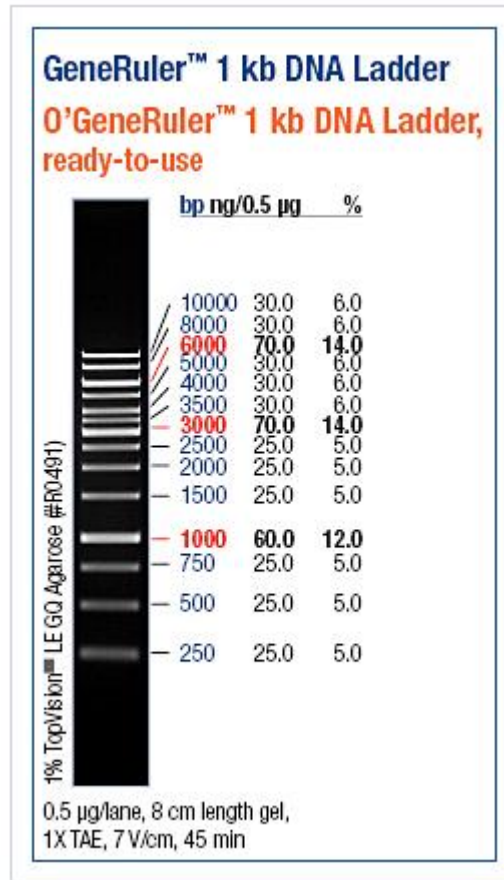
- [71] Lipozom yöntemli gen transferi. [online]. (1 kısım 2013), http://www.genbilim.com/index.php?option=com_content&task=view&id=25&Itemid=90.
- [72] Tufan F. (2010). Bitkilerde gen transferinde kullanılan doğrudan yöntemler [online] . (9 kısım 2013), <http://www.docstoc.com/docs/123416001/bitkilere-gen-transferinde-kullanilan-vektorler>.
- [73] Petolino, J.F., Hopkins, N.L., "Whisker-mediated transformation of embryogenic callus of maize", *Plant Cell Reports*, 19, 781–786, (2000).
- [74] Frame, B. R., "Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation", *The Plant Journal* , 6(6), 941-948, (1994).
- [75] Özcan, S., Babaoğlu, M., *Bitki Biyoteknolojisi II*, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, (2001).
- [76] Ahokas, E., " Transfection of germinating barley seed electrophoretically with exogenous DNA", *Theor Appl Genet*, 77, 469-472, (1989).
- [77] Liu, Y., "Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation", *Biotechnology Advances*, 24, 1– 16, (2006).
- [78] Trojanowska, M.R., " Alternative methods of plant transformation-A short review", *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7, 849 – 858, (2002).
- [79] Mathur J., "PEG-Mediated Protoplast Transformation with Naked DNA", *Methods in Molecular Biology*, 82,87, (1998).
- [80] Joersbo, M.," Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication", *Plant Cell Reports*, 9, 207- 210, (1990).
- [81] Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Systems User Manual, PT3902 1 (011612) Cat. Nos. 631729, 631735, 631739, 631740, 631742, 631744& 631747, (2012).
- [82] Humbert,R., Adler, D.A.,Disteche,C.M.,Hassett,C.,Omiecinski,C.J.and Furlong,C.E.,"The molecular basis of the human paraoxonase activity polymorphism", *Natura Genetics*, 3, 73, (1993).
- [83] Şipal B.," Koyun Serum Paraoksonaz Enziminin Bazı Pestisitlere Karşı İlgisinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).
- [84] Geldmacher, M., Hommel, G., Dumbach,J., "On The Genetics of The Human Paraoxonase", *Hum. Genet.*, 50(3), 313-326, (1979).

- [85] Playfer, J., Eze, LC., Bullen, MF., Evans, AP, "Genetic Polimorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity", *J. Med. Genet.*, 13, 337-342, (1976).
- [86] Eckerson, H. W., Wyte, C. M. and LA Du, B. N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, 35, 1126, (1983).
- [87] Gan ,K.N., Smolen,Eckerson, H.W., La Du, B.N.,"Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab.Dispos.*, 19, 100, (1991).
- [88] Furlong,C.E.,Richter,R.J.,Chapline,C. And Crabb,J.W.,"Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, 30, 10133, (1991).
- [89] Rodrigo,L.,Gil,F.,Hernandez,A.F.and Pla,A.,"Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity:biochemical evidence fort he identity of paraoxonase and arylesterase", *Chem.Biol.Interact.*, 263, 119-120, (1999).
- [90] Bastos,C.,Rossini,A.,Alves,M.V.,Ceccarelli,P.S.,Lima,J.A.F.and Bastos, J.C .,"Paraoxonase activity in sera from Piaractus mesopotamicus holmberg (Characidae) and Hypostomus punctatus valenciennes (Siluridae)", *Revta bras.Zool.*, 15(3), 665, (1998).
- [91] Keizer,J., D'Agostina, G. and Vittozi, L., "The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation ox diazinon in guppy (Poecilla retikula) and zebra fish (Brachydanio reriro)", *Aquatic toxic*, 21, 239, (1991).
- [92] Aharoni, A., "Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization", *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 101, 482, (2004).
- [93] Josse, D.," Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities", *Biochemistry*, 38, 2816, (1999).
- [94] Akbıyık,F., Çevik,S.,Bayrak,T., Doğan,A.L., Bayrak,A., Demirpençe,E., "Karaciğer Hücre Dizilerinde Paraoksonaz1 Ekspresyonu ve Aktivitesinin PPARa ile Kontrolü", *Türk Biyokimya Dergisi* , 35 (2) , 151–156, (2010).

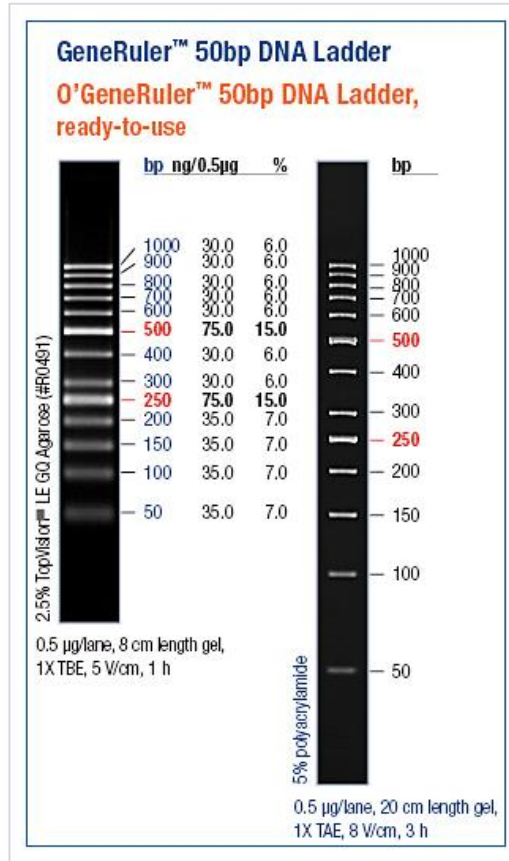
EKLER

6. EKLER

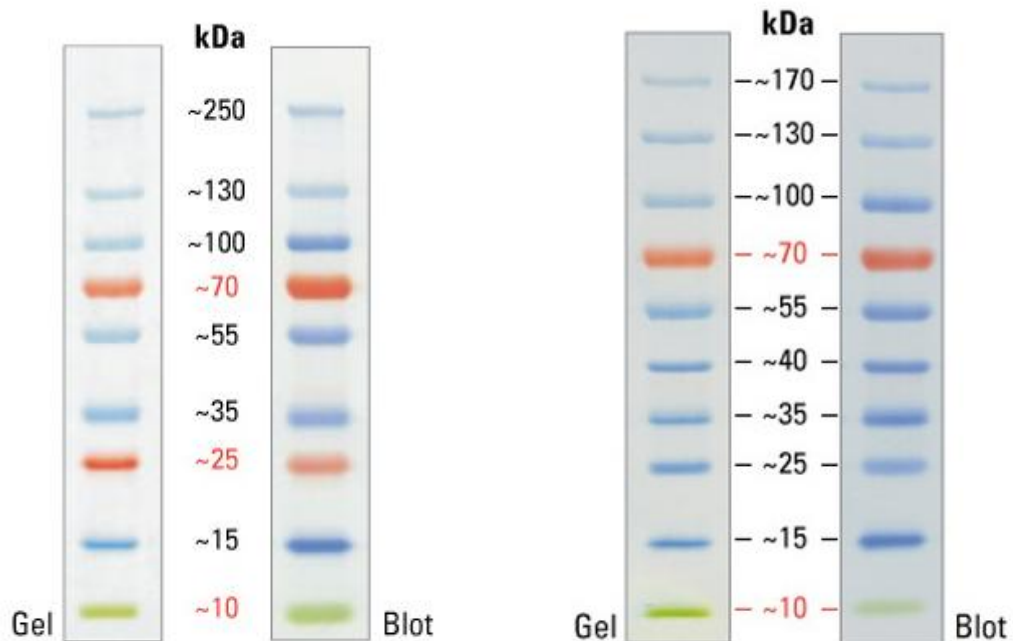
EK A Kullanılan markerlar



Şekil 0.1: Fermentas 1 kb DNA marker



Şekil 0.2: Fermentas 50 bp DNA marker



Images are from a 4-20% Tris-glycine gel (SDS-PAGE) and subsequent transfer to membrane.

Images are from a 4-20% Tris-glycine gel (SDS-PAGE) and subsequent transfer to membrane.

Şekil 0.3: Pageruler protein markerları (Thermo)

