

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



**TSPAN8 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONUNUN AYDINLATILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GAMZE GÜNGÖR

BALIKESİR, OCAK - 2017

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



**TSPAN8 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONUNUN AYDINLATILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GAMZE GÜNGÖR

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Yrd. Doç. Dr. Aylin ER

BALIKESİR, OCAK - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

GAMZE GÜNGÖR tarafından hazırlanan “**TSPAN8 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONUNUN AYDINLATILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 13.01.2017 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

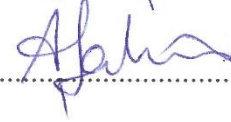
Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM



Üye
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ



Üye
Yrd. Doç. Dr. Aylin ER



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 113T075 nolu COST projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

**TSPAN8 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONUNUN
AYDINLATILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GAMZE GÜNGÖR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI:YRD. DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)**

BALIKESİR, OCAK - 2017

Tetraspanin ailesi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer almaktadır. Tetraspaninler hücresele seviyede hücrelerin adezyonu, migrasyonu, proliferasyonu ve füzyonunu düzenlemektedir. Tetraspanin ailesinin bir üyesi olan TSPAN8 geninin tümör metastazı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. TSPAN8 geninin fazla miktardaki ekspresyonunun sindirim sistemi kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. TSPAN8 geninin transkripsiyonel regülasyonunun belirlenmesi, genin tümör biyolojisi üzerindeki etkilerinin mekanizmasının aydınlatılması için oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, insan TSPAN8 geninin transkripsiyonel regülasyonunun belirlenmesi amacıyla, dört farklı uzunlukta (-1540 / + 41, -1048 / +41, -398 /+41, -145/+41) promotor parçası lusiferaz haberci vektörlerine klonlanmış ve dizi analizi ile kontrol edilmiştir. Bazal promotor aktivitesi MIA-PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde geçici transfeksiyon analizleri ile ölçülmüş ve [-1540 /+ 41] bç uzunluğundaki promotor parçası en yüksek bazal aktivite göstermiştir. İnterlökin 6 (IL-6) sitokininin MIA-PaCa-2 hücrelerinde normal oksijen koşulları ve hipoksik koşullarda 24 ve 48 saatte mRNA ve protein seviyesinde TSPAN8 ekspresyonunda değişikliğe sebep olduğu belirlenmiştir. TSPAN8 promotor parçalarının transfekte edildiği hücrelere IL-6 uygulamasının da transkripsiyonel aktivitede azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: TSPAN8, transkripsiyonel regülasyon, kanser, sitokin, IL-6.

ABSTRACT

EVALUATING THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF TSPAN8 GENE

MSC THESIS

GAMZE GÜNGÖR

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

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

BALIKESİR, JANUARY 2017

Tetraspanins take part in a variety of physiological and pathological processes. At the cellular level, tetraspanins modulate cell adhesion, migration, proliferation and fusion. It is known that TSPAN8, a member of tetraspanin superfamily, associate with tumor metastasis. The expression of TSPAN8 is linked to poor prognosis of digestive system cancers. Therefore, it is so important to elucidate the regulation of TSPAN8 gene that it is so crucial in tumor biology.

In this study, four truncated promoter construct (-1540/+ 41, -1048/+41, -398/+41, -145/+41) of TSPAN8 gene was cloned into reporter vector including luciferase enzyme to determine transcriptional regulation of TSPAN8 gene the promoter region of and checked by sequence analyzer. Transient transfection has performed in MIA-PaCa-2 pancreas cancer cell lines using promotor constructs and analyzed. Basal promoter activities are measured by transient transfection analysis and [-1540 /+ 41] bp promotor region showed highest basal activity. Interlökin 6 (IL-6) cytokine is applied to MIA-PaCa-2 cells under the normoxia and hipoxia conditions. It is determined that TSPAN8 expression in mRNA and protein levels changed at 24 and 48 hours after stimulation. Also, application of IL-6 cytokine to TSPAN8 transfected cells resulted in decrease of transcriptional activity in both normoxic and hypoxic conditions.

KEYWORDS: TSPAN8, transcriptional regulation, cancer, cytokine, IL-6.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Transkripsiyonel Regülasyon	1
1.1.1 Cis-Acting Regülatör Diziler: Promotorlar ve Enhansörler	2
1.1.2 Transkripsiyonel Regülatör Proteinler	5
1.1.3 Transkripsiyonel Aktivatörlerin Yapısı ve Fonksiyonları	7
1.1.4 Ökaryotik Baskılayıcılar	9
1.2 Tetraspanin Ailesi.....	11
1.2.1 Tetraspaninlerin Yapısı.....	12
1.2.2 Tetraspaninlerin Dağılımı ve Fonksiyonları	13
1.3 Tetraspanin 8	15
1.3.1 Tetraspanin 8 ve Kanser İlişkisi.....	16
1.4 Sitokinler	18
1.4.1 İnterlökin 6.....	19
1.5 Çalışmanın Amacı	20
2. MATERYAL VE METOT	22
2.1 Materyal.....	22
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	22
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	24
2.1.3 DNA ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	25
2.1.3.1 Agaroz Jel Elektrofrezindeki Solüsyonlar	25
2.1.3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu Solüsyonları	26
2.1.3.3 Çalışmada Kullanılan Vektörler.....	26
2.1.3.4 Transfeksiyon Çalışmalarındaki Solüsyonlar	28
2.1.3.5 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları.....	29
2.1.3.6 Bakteriyel Kültür Ortamı	29
2.1.3.7 Antibiyotikler	29
2.1.3.8 Antibiyotik İçeren Katı Besiyerinin Hazırlanması.....	29
2.1.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler	29
2.1.4.1 Hücre Kültüründe Medyumun Hazırlanması	29
2.1.4.2 FCS İnaktivasyonu	30
2.1.4.3 BSA Hazırlanması.....	30
2.1.4.4 PBS Hazırlanması	30
2.1.5 Proteinler ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	30
2.1.5.1 Western Blot Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler.....	30
2.2 Metotlar	31
2.2.1 Çalışmalarda Kullanılan Ortam ve Malzemelerin Temizliği ve Steril Edilmesi.....	31

2.2.2	DNA ile ilgili Teknikler.....	32
2.2.2.1	Primer Tasarımı.....	32
2.2.2.2	Kandan Genomik DNA İzolasyonu	32
2.2.2.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR).....	33
2.2.2.4	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	33
2.2.2.5	Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması	33
2.2.2.6	PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması	34
2.2.2.7	Miniprep Plazmit DNA İzolasyonu	34
2.2.2.8	Maxiprep Plazmit DNA İzolasyonu.....	34
2.2.2.9	DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	35
2.2.2.10	Restriksiyon Enzimleri ile DNA Kesilmesi	35
2.2.2.11	Kompetan Hücre Hazırlanması	35
2.2.2.12	Transformasyon.....	36
2.2.3	Hücre Kültüründe Kullanılan Teknikler	36
2.2.3.1	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	36
2.2.3.2	Hücre Soyunun Başlatılması	37
2.2.3.3	Hücrelerin Büyütülmesi	37
2.2.3.4	Hücrelerin Pasajlanması.....	37
2.2.3.5	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı.....	37
2.2.3.6	Hücrelerin -80 °C' de Saklanması.....	38
2.2.4	Hücre Kültüründe Kurulan Deneyler ve Analiz Yöntemleri	39
2.2.4.1	Kalsiyum Fosfat Prespitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon	39
2.2.4.2	Lüsiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	39
2.2.4.3	SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi.....	39
2.2.4.4	Protein ve mRNA Ekspresyon Çalışması Deneylerinin Kuruluşu	40
2.2.5	RNA ile İlgili Teknikler.....	41
2.2.5.1	RNA İzolasyonu.....	41
2.2.5.2	RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	41
2.2.5.3	cDNA Sentezi.....	42
2.2.5.4	İnsan Beta 2 Mikroglobulin Primerleri ile RNA'nın PZR ile Kontrol Edilmesi	42
2.2.5.5	Gerçek Zamanlı PZR.....	42
2.2.6	Protein ile ilgili Teknikler.....	43
2.2.6.1	Protein İzolasyonu.....	43
2.2.6.2	Protein Miktarının Belirlenmesi.....	44
2.2.6.3	SDS Page.....	44
2.2.6.4	Western Blot.....	45
3.	BULGULAR	46
3.1	Biyoinformatik Çalışmalar	46
3.2	Primer Tasarımı	51
3.3	Genomik DNA İzolasyonu	52
3.3.1	TSPAN8 Promotorunun Genomik DNA'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) ile Çoğaltılması.....	52
3.3.2	TSPAN8 Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ve E. coli Hücrelerine Transformasyonu	54
3.3.3	TSPAN8 Promotorunun pMET-LuC Lusiferaz Haberci Vektörüne Klonlanması ve E. coli' ye Transformasyonu.....	55
3.3.4	Otomatik Dizi Analizi.....	56

3.4	Farklı Uzunluklarda Promotor Parçalarının Oluşturulması.....	60
3.4.1	1089 [-1048/+41] bç Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması.....	60
3.4.1.1	Otomatik Dizi Analizi.....	64
3.4.2	438 [-398 /+41] bç Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması.....	67
3.4.2.1	Otomatik Dizi Analizi.....	69
3.4.3	186 [-145 /+41] bç Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması.....	71
3.4.3.1	Otomatik Dizi Analizi.....	74
3.5	İnsan TSPAN8 Geni Promotor Bölgesinin Fonksiyonel Analizi.....	75
3.5.1	Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi.....	76
3.6	IL-6 Sitokininin TSPAN8 Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	77
3.6.1	IL-6 Sitokininin TSPAN8 Ekspresyonu Üzerindeki Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi.....	78
3.6.2	IL-6 Sitokininin TSPAN8 Ekspresyonu Üzerindeki Etkilerinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi.....	79
3.6.3	IL-6 Sitokininin TSPAN8 Promotor Parçaları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	81
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
5.	KAYNAKLAR.....	88
6.	EKLER.....	94

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Ökaryotik regülatör dizilerin belirlenmesi.	3
Şekil 1.2: Ökaryotik promotör örneği.....	3
Şekil 1.3: SV40 enhansırı.	4
Şekil 1.4: Enhansır bölgesinin transkripsiyona etkisi.....	4
Şekil 1.5: DNA'nın kıvrılması.....	5
Şekil 1.6: Electrophoretic-Mobility Shift Assay (EMSA).....	6
Şekil 1.7: Transkripsiyonel aktivatörlerinin yapısı.	8
Şekil 1.8: Transkripsiyonel aktivatörlerin sinerjik hareketi.	9
Şekil 1.9: Ökaryotik baskılayıcıların hareketleri.	10
Şekil 1.10: Tetraspaninlerin yapısı.	12
Şekil 1.11: TSPAN8'in moleküler yapısı [8].	15
Şekil 1.12: TSPAN8 ve farelerde homoloğu olan D6.1A'nın ilişkili olduğu moleküller [8].....	16
Şekil 1.13: IL-6 aracılığı ile gen regülasyonunun kontrolü [44].	20
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.	26
Şekil 2.2: pMet-Luc haberci vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.	27
Şekil 2.3: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan pMet-Luc pozitif kontrol vektörü.....	27
Şekil 2.4: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan SEAP vektörü.....	28
Şekil 2.5: Çalışmada kullanılan pankreas kanseri hücre hatlarının mikroskop görüntüleri	36
Şekil 2.6: Hücre sayımında kullanılan Thoma lamı.	38
Şekil 3.1: TSPAN8 mRNA dizisi ile insan kromozom 12 dizisinin karşılaştırılması.	46
Şekil 3.2: 1581 [-1540/+41] bç TSPAN8 promotör bölgesi.....	49
Şekil 3.3: İnsan TSPAN8 promotöründe yer alan olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri.	50
Şekil 3.4: TSPAN8 promotör primerlerinin saç tokası oluşturma potansiyelleri	51
Şekil 3.5: Genomik DNA jel görüntüsü	52
Şekil 3.6: PZR reaksiyonu sonucu jel görüntüsü.....	54
Şekil 3.7: 1581 bç insert (1) ve ligasyon ürünü (2).	55
Şekil 3.8: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan TSPAN8 promotörünün kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	55
Şekil 3.9: pMET-LuC vektörüne klonlanan TSPAN8 promotörünün kontrol kesim sonucu jel görüntüsü	56
Şekil 3.10: Klonlanan 1581 bç promotör bölgesinin dizi analizi	57
Şekil 3.11: 1089 [-1048/+41] TSPAN8 promotör bölgesine ait spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli.	61
Şekil 3.12: 1089 [-1048/+41] bç uzunluğunda TSPAN8 promotör parçasının PZR sonu jel görüntüsü	61
Şekil 3.13: 1089 bç promotörü içeren pGEMT-Easy kesim sonucu jel görüntüsü.....	62

Şekil 3.14: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1089 bç TSPAN8 promotorunun kontrol kesim sonucu jel görüntüsü.....	62
Şekil 3.15: pMet-Luc vektörüne klonlanan 1089 bç [-1048/+41] bç uzunluğundaki promotorun kontrol kesimi sonucu jel görüntüsü..	63
Şekil 3.16: Klonlanan 1089 bç promotor bölgesinin dizi analizi.	65
Şekil 3.17: 1581 bç TSPAN8 promotoru içeren pGEMT-Easy vektörünün kesim sonucu jel görüntüsü	68
Şekil 3.18: 438 [-398 /+41] bç uzunluğunda promotor parçasını içeren pMet-Luc haberci vektörünün kesim sonucun jel görüntüsü	68
Şekil 3.19: Klonlanan 438 bç promotor bölgesinin dizi analizi	70
Şekil 3.20: 186 [-145 /+41] bç TSPAN8 promotor bölgesine ait spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli.	71
Şekil 3.21: 186 [-145 /+41] bç uzunluğunda TSPAN8 promotor parçasının PZR sonu jel görüntüsü	72
Şekil 3.22: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 186 bç TSPAN8 promotorunun kontrol kesim sonucu jel görüntüsü.....	73
Şekil 3.23: pMet-Luc vektörüne klonlanan 186 [-145 /+41] bç uzunluğundaki promotorun kontrol kesimi sonucu jel görüntüsü	74
Şekil 3.24: Klonlanan 186 bç promotor bölgesinin dizi analizi	75
Şekil 3.25: Farklı uzunluklardaki TSPAN8 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi.....	77
Şekil 3.26: Normal oksijen koşullarında 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda TSPAN8 mRNA seviyesinin belirlenmesi.....	78
Şekil 3.27: Hipoksik koşullarda 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda TSPAN8 mRNA seviyesinin belirlenmesi	79
Şekil 3.28: Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda IL-6 sitokininin TSPAN8 protein ekspresyon seviyesine etkilerini gösteren western blot görüntüsü.....	80
Şekil 3.29: Normal oksijen koşullarında 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonunda TSPAN8 protein seviyesinin belirlenmesi.....	80
Şekil 3.30: Hipoksik koşullarda 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonunda TSPAN8 protein seviyesinin belirlenmesi.	81
Şekil 3.31: Normal oksijen koşullarında 500 U/ml IL-6 sitokininin farklı uzunluklardaki TSPAN8 promotor aktivitesine etkileri.....	82
Şekil 3.32: Hipoksik koşullarda 500 U/ml IL-6 sitokininin farklı uzunluklardaki TSPAN8 promotor aktivitesine etkileri.....	83
Şekil 6.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.	94
Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.	95

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Bazı transkripsiyon faktörleri ve bağlanma bölgeleri.....	7
Tablo 1.2: Bazı tetraspaninlerin patofizyolojik önemleri.....	13
Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar	22
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri.	24
Tablo 2.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar	25
Tablo 2.4: Kandan genomik DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.....	26
Tablo 2.5: Geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan tampon ve Çözeltiler	28
Tablo 2.6: Klonlama için kullanılan kompetan hücreler.....	29
Tablo 2.7: Western blot tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler.	30
Tablo 2.8: Gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere tasarlanan spesifik primerlerin dizisi.....	43
Tablo 2.9: Gerçek Zamanlı PZR koşulları.	43
Tablo 3.1: Tasarlanan primerlerin dizisi, Tm değeri ve uzunlukları.....	51
Tablo 3.2: TSPAN8 promotorunun çoğaltılması için PZR koşulları	53
Tablo 3.3: TSPAN8 promotorunun çoğaltılması için PZR içerikleri	53
Tablo 3.4: Tasarlanan 1089 [-1048/+41] bç TSPAN8 promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, Tm değeri ve uzunluğu.....	60
Tablo 3.5: Tasarlanan 186 [-145 /+41] bç TSPAN8 promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, Tm değeri ve uzunluğu.....	71

SEMBOL LİSTESİ

Akt	Protein Kinaz B
BSA	Sığır Serum Albumin
CD13	Alanin aminopeptidaz
C/EBPα	CCAAT/enhancer-binding protein
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMSO	Dimetil Sulfoksit
DEPC	Dietilpirokarbonat
ECL	Hücre dışı halka
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetrasedik asit
EPCAM	Epitel hücre adezyon molekülü
EWI-F	Ig süperailisi transmembran proteini
FA	Formaldehit Agaroz
FAK	Fokal adhezyon kinaz
FCS	Fetal Sığır Serum
LB	Luria Broth
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
UV	Ultra-viyole
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PI3K	Fosfoinositid 3 kinaz
PI4KII	Fosfatidilinositol 4 kinaz
PKC	Protein kinaz C
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RT-PZR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SP1	Specificity protein 1alpha
TEMs	Tetraspaninlerce zenginleştirilmiş mikrodomanler
TM	Transmembran bölgesi
TMSF4, TSPAN	Tetraspanin ailesi
TSPAN8	Tetraspanin 8

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın deneysel kısmı Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiş olup Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim görevlisi olan Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM danışmanlığında yürütülmüştür.

Tez çalışmalarımın planlanmasında, yürütülmesinde ve gerçekleştirilmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, kıymetli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller üzerinde şekillendiren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM' a en içten minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve görüşleriyle her zaman yol gösteren ve destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Yrd. Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU' na,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında her zaman her konuda bana destek olan sevgili hocalarım Merve KARAMAN, Uz. Dr. Esra TOKAY ve Dr. Tuğşen AYDEMİR, Öğr. Gör. Derya OKUYAN' a, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve birlikte çok iyi zaman geçirdiğim Fatma POYRAZLI, Sinem GÜLTEKİN, Sevgi BAYSAL, Gizem GÜLER ve diğer ekip arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni koşulsuzca seven ve destek olan, amaçlarım peşinde giderken yanımda olan ve beni yüreklendiren canım babam Ali GÜNGÖR, canım annem Hatice GÜNGÖR, her zaman iyi bir abla olmak için çabaladığım canım kardeşlerim Yağmur GÜNGÖR, Recep GÜNGÖR ve Şuranur GÜNGÖR' e çok teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, birçok hücrel işlevin ve farklılaşmanın temelini oluşturmaktadır. Çok hücreli bir organizmanın bütün hücreleri aynı genetik materyale sahip olsalar dahi, hücre tipleri farklı fonksiyonları yerine getirmektedir ve çevreden gelen sinyallere farklı şekillerde cevaplar vermektedir. Hücreler aynı genetik bilgiye sahip olmalarına rağmen, bu bilgi her hücre tipi için farklı şekillerde işlenmektedir. Organizma gen ekspresyonunun kontrol edilmesi sayesinde, belirli bir hücre tipi için belirli bir gen takımını, farklı hücre tipi için ise diğer farklı gen takımını çalıştırabilme yeteneğine sahip olmaktadır. Çok hücreli organizmalarda gen regülasyonu, genomun özgün kısımlarını etkin hale geçirirken, diğer genleri baskılayan kontrol mekanizmaları ile ifade edilmektedir. Gen ekspresyonunun sıkı bir şekilde kontrol edilmesi, hücrelerin çevreden gelen uyarılara ve metabolik ihtiyaçlarına cevap verilmesi yani gelişiminin ve farklılaşmasının da kontrolü anlamına gelmektedir [1,2].

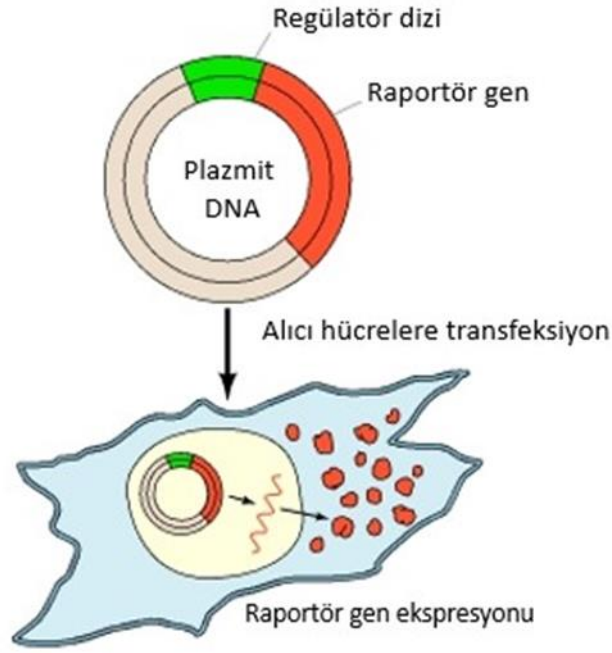
DNA' da şifrelenmiş olarak bulunan genetik bilginin proteine dönüştürülmesi süreci, DNA' nın RNA' ya transkribe edilmesi, RNA' nın işlenmesi, protein sentezi (translasyon) ve post-translasyonel değişikliklerin yapıldığı aşamalardan oluşmaktadır. Bu aşamaların her birinde gen ekspresyonunun kontrolü mümkün 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 da açıklanabilir [1,3,4].

Ökaryotlarda gen ekspresyonunun kontrolü bakterilerden daha kompleks olmasına rağmen, aynı temel prensipler uygulanır. Bakterilerde olduğu gibi, ökaryot hücrelerde de transkripsiyon spesifik regülatör dizilere bağlanan ve RNA polimeraz

aktivitesini değiştiren proteinler tarafından kontrol edilmektedir. Çok hücreli organizmaların farklılaşmış hücre tiplerinde, gen ekspresyonunun düzenlenmesinin kompleks görevi ilk olarak birkaç farklı transkripsiyonel regülatör proteinin birlikte hareketi ile tamamlanmaktadır [5].

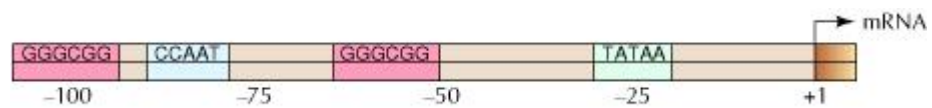
1.1.1 Cis-Acting Regülatör Diziler: Promotorlar ve Enhansörler

Bakterilerde transkripsiyon, bitişindeki genlerin transkripsiyonunu kontrol eden cis-acting dizilere (örn, *lac* operonu) proteinlerin bağlanması ile düzenlenmektedir. Benzer cis-acting diziler ökaryotik genlerde de mevcuttur ve ekspresyonu düzenlerler. Bu diziler memelilerde klonlanmakta olup, genlerin tahmin edilen regülatör bölgelerinin aktivitesini belirlemek için gen transferi analizlerinin kullanılmasıyla büyük ölçüde belirlenmiş durumdadır. Ökaryotik genin regülatör dizisi kolaylıkla tespit edilebilir bir enzim kodlayan bir haberci vektör içerisine klonlanır (Şekil 1.1). Sonuçta elde edilen plazmit kültürde büyütölmüş alıcı hücrelerin içine transfer edilir. Böylece aktif bir regülatör dizi haberci genin transkripsiyonunu yönlendirmektedir ve ekspresyonu transfekte edildiği hücrelerde belirlenebilmektedir. Biyolojik olarak aktif regülatör bölgeler böylece tanımlanabilir ve in vitro mutagenesis ile bu bölgenin içindeki spesifik diziler belirlenebilir [5].



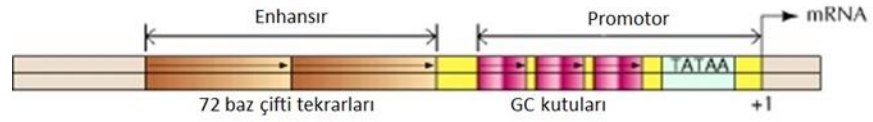
Şekil 1.1: Ökaryotik regülatör dizilerin belirlenmesi [5].

Ökaryotlar RNA polimeraz I, II ve III olmak üzere üç farklı sınıfa sahiptir. Bütün mRNA molekülleri RNA polimeraz II tarafından sentezlenmektedir [6]. RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen genler, genel transkripsiyon faktörleri için spesifik bağlanma bölgesi olarak hizmet eden TATA kutusu ve başlatıcı eleman (Inr) olmak üzere iki core promotor elamanına sahiptir. Diğer cis-acting diziler, bireysel genlerin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici faktörlerin büyük bir kısmı için bağlanma bölgesi olarak görev yapmaktadır. Bu cis-acting düzenleyici diziler daima olmasa da sık bir şekildedir ve TATA kutusunun yukarı kısmında lokalize olmuşlardır. Örneğin, birçok ökaryotik gende bulunan iki düzenleyici dizi, timidin kinaz kodlayan herpes simplex virüs geninin promotorunun çalışılmasıyla belirlenmiştir (Şekil 1.2). Bu dizilerin ikisi de TATA kutusunun 100 baz çifti yukarısında yerleşim göstermektedir. Konsensus dizileri (GC kutusu olarak da adlandırılan) CCAAT ve GGGCGG'dir. Bu dizilere bağlanan ve transkripsiyonu uyarıcı spesifik proteinler belirlenmiş durumdadır [5].

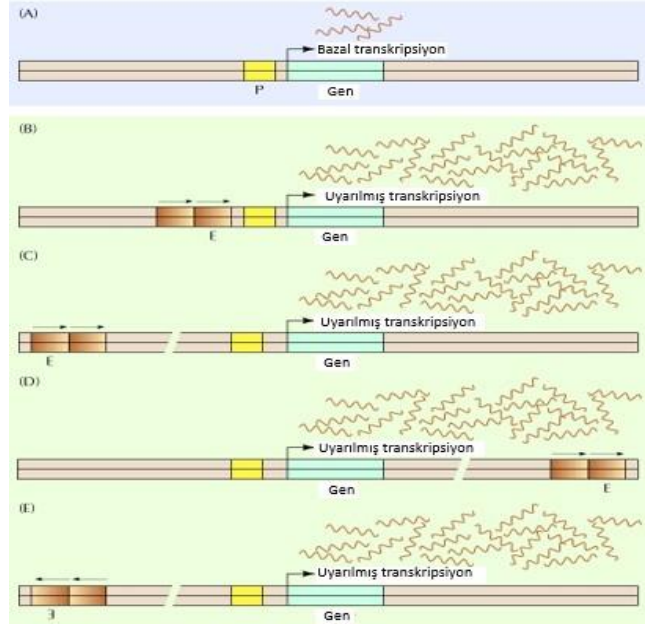


Şekil 1.2: Ökaryotik promotor örneği [5].

Herpes timidin kinaz promotorundaki CCAAT ve GC kutularının basit organizasyonunun nispeten aksine, memeli hücrelerinde birçok gen transkripsiyon başlama bölgesinden daha da uzakta (bazen 10 kilobazdan daha fazla) bulunan düzenleyici diziler tarafından kontrol edilmektedir. Bu diziler enhansrlar olarak adlandırılır ve başka bir virüs olan SV40'ın promotorunun çalışılması sırasında 1981 yılında Walter Schaffner tarafından belirlenmiştir (Şekil 1.3). Bir TATA kutusu ve altı GC kutusu takımına ek olarak daha yukarıda bulunan iki 72 baz çifti tekrarlarının promotordan etkili bir transkripsiyon için gerekli olduğu bulunmuştur. Bu dizilerin SV40'ın yanısıra diğer promotorlarda da transkripsiyonu uyardığı belirlenmiştir ve şaşırtıcı bir şekilde bu bölgenin aktivitesinin ne transkripsiyon başlama bölgesine olan uzaklığına ne de oryantasyonlarına bağlı olmadığı görülmüştür. (Şekil 1.4). Promotorun aşağısında ya da yukarısında, oryantasyon olarak ileri veya geride buldukları zaman transkripsiyonu uyarabilmektedirler [5].

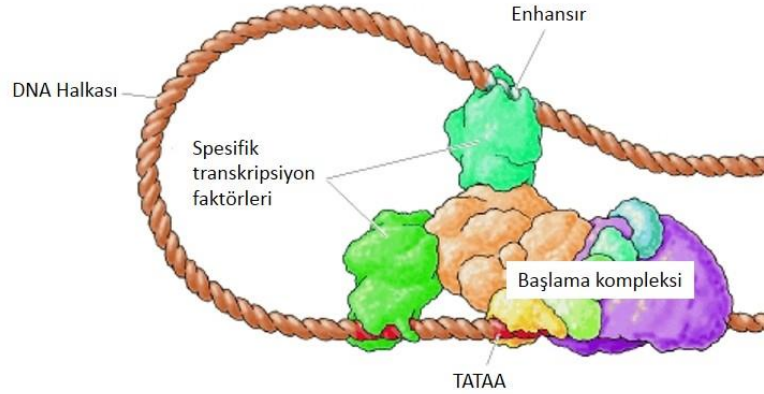


Şekil 1.3: SV40 enhansırı [5].



Şekil 1.4: Enhansır bölgesinin transkripsiyona etkisi. Bir enhansır olmadan, gen düşük bazal seviyede transkribe edilir (A). Bir enhansır eklendiğinde (Örneğin E enhansırı, SV40 72 baz çifti tekrarları) transkripsiyonu uyarır. Enhansır promotörün yukarı kısmında yer aldığı zaman değil (B) aynı zamandatranskripsiyonel başlangıç bölgesinden hem aşağıda hem yukarıda ekli olduğu zaman da aktiftir (C ve D). Ayrıca, enhansırlar hem ileri hem geri oryantasyonda aktiftir (E) [5].

İlk olarak enhansırların fonksiyonlarını yerine getirme yeteneklerinin promotorlarından farklı bir mekanizma ile çalıştığı öne sürülmüştür. Fakat, daha sonra durumun böyle olmadığı görülmüştür. Enhansırlar da promotorlar gibi, RNA polimerazı düzenleyen transkripsiyon faktörlerini bağlayarak işlev görmektedir. Bu DNA kıvrılmasıyla mümkündür (Şekil 1.5). Enhansırlara bağlanan transkripsiyon faktörleri promotora bağlanan diğer proteinler ile etkileşerek, transkripsiyonu artırmaktadır [5].

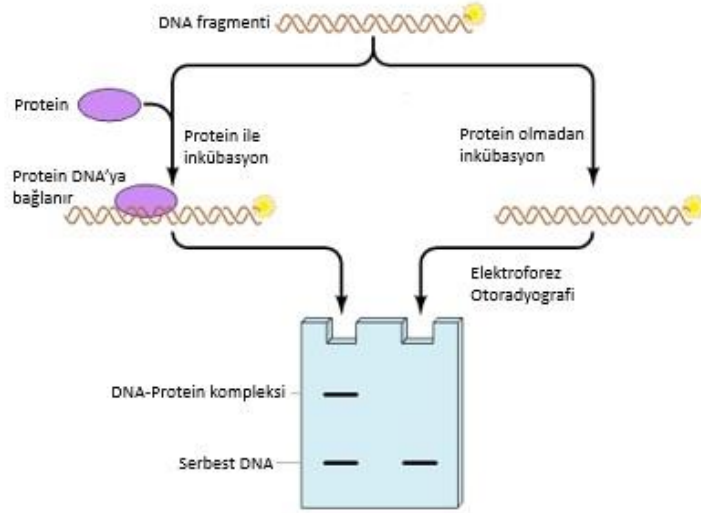


Şekil 1.5: DNA'nın kıvrılması [5].

1.1.2 Transkripsiyonel Regülatör Proteinler

Çeşitli transkripsiyonel regülatör proteinlerin izolasyonu, bu proteinlerin promotor ya da enhansır dizilere spesifik olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Bu DNA dizilerine protein bağlanması yaygın olarak iki farklı yöntem ile analiz edilmektedir. İlki prokaryotik promotorlarına RNA polimerazın prokaryotik promotorlara bağlanması ile bağlantılı olarak daha önce tarif edilmiş olan “footprinting”dir. İkinci yaklaşım ise radyoaktif işaretlenmiş bir DNA fragmentinin bir protein preparatı ile inkübe edildiği ve daha sonra denatüre edilmeyen bir jel vasıtasıyla elektroforez işlemine tabi tutulduğu electrophoretic-mobility shift assay (EMSA) olarak adlandırılan yöntemdir (Şekil 1.6). Protein bağlanması, DNA fragmentinin elektroforetik hareketliliğinde bir azalma olarak algılanmaktadır, zira jel içerisinde DNA migrasyonu protein bağlanması ile yavaşlatılır. “Footprinting” ve EMSA yöntemlerinin birlikte kullanılmasıyla, promotor ve enhansırların düzenleyici elemanlar ile protein bağlanma bölgelerinin ilişkisine neden olduğu ve bu dizilerin

genellikle spesifik DNA-bağlanma proteinlerinin tanıma bölgesini oluşturdukları gösterilmiştir [5].



Şekil 1.6: Electrophoretic-Mobility Shift Assay (EMSA) [5].

Ökaryotik transkripsiyon faktörlerinin prototiplerinden biri, Robert Tjian ve meslektaşları tarafından SV40 DNA'sının transkripsiyon çalışmaları sırasında tanımlanmıştır. Sp1 (specificity protein 1) olarak adlandırılan bu faktörün SV40 promotorunda transkripsiyonu uyardığı bulunmuştur. Daha sonra Sp1 tarafından transkripsiyonun uyarılmasının SV40 promotorunda GC kutularının bulunmasına bağlı olduğu bulunmuştur. Bu diziler yok edildiğinde Sp1 tarafından uyarılmanında ortadan kalktığı görülmüştür. Ayrıca, "footprinting" deneyleri ile Sp1' in GC kutusu dizilerine spesifik olarak bağlandığı tespit edilmiştir. Bütün bu sonuçlar birlikte ele alındığında, GC kutusunun bir transkripsiyonel aktivatör olan Sp1 için spesifik bir bağlanma bölgesini temsil ettiği ortaya çıkmaktadır. Benzer deneyler, CCAAT dizisi ve immünooglobülin enhansırının çeşitli dizi elemanlarını içeren ve aynı zamanda spesifik DNA-bağlama proteinleri için tanıma bölgelerini temsil eden birçok başka transkripsiyonel regülatör dizinin olduğunu göstermiştir (Tablo 1.1) [5].

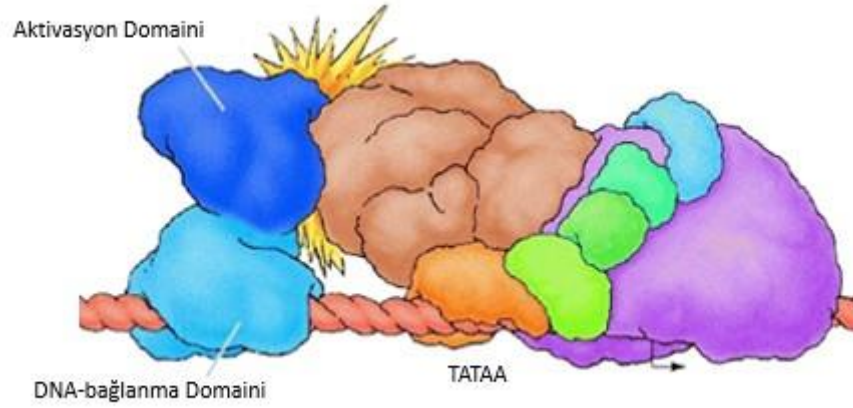
Tablo 1.1: Bazı transkripsiyon faktörleri ve bağlanma bölgeleri [5].

Transkripsiyon Faktörü	Konsensus Bağlanma Dizisi
Specificity protein 1 (Sp1)	GGGCGG
CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP)	CCAAT
Activator Protein 1 (AP1)	TGACTCA
Octamer Binding Proteins (OCT-1 ve OCT-2)	ATGCAAAT
E-box Binding Proteins (E12, E47, E2-2)	CANNTG ^a

a,N: Herhangi bir nükleotidi belirtir.

1.1.3 Transkripsiyonel Aktivatörlerin Yapısı ve Fonksiyonları

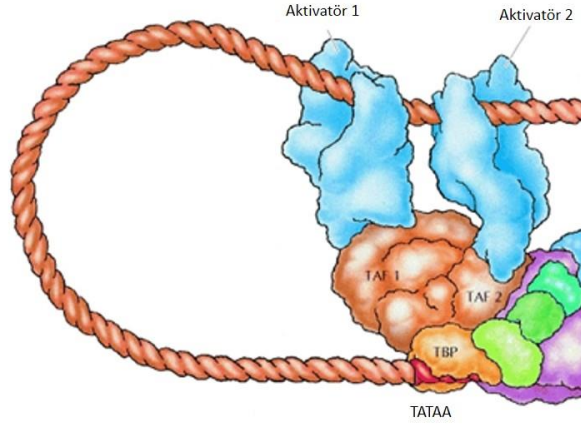
Transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunun regülasyonu için odak nokta olduklarından dolayı onların mekanizmasını anlamak, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide süregelen çalışmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu proteinlerden baştan sona en çalışılmış olanlar Sp1 gibi DNA dizisine bağlanan ve transkripsiyonu uyaran transkripsiyonel aktivatörlerdir. Genel olarak bu faktörlerin iki domainden oluştuğu bulunmuştur. Bir bölge spesifik olarak DNA'ya bağlanırken, diğer bölge ise transkripsiyonel düzeneğin diğer bileşenleri ile etkileşerek transkripsiyonu aktive etmektedir (Şekil 1.7). Transkripsiyonel aktivatörler, farklı faktörlerin DNA bağlanma ve aktivasyon bölgelerinin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak değiştirilebilmesi bakımından modüler proteinler gibi görünmektedirler. Bu tür manipülasyonlar DNA-bağlanma domainlerinin spesifikliğı ile belirlenen promotor ya da enhansır dizilere bağlanmasıyla transkripsiyonu aktive eden hibrit transkripsiyon faktörleri ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla DNA-bağlanma domaininin temel fonksiyonunun DNA üzerindeki uygun bölgeye transkripsiyon faktörlerini bağlamak olduğu ortaya çıkmaktadır. Daha sonra aktivasyon bölgesi bağımsız olarak diğer proteinlerle etkileşerek transkripsiyonu uyarmaktadır [5].



Şekil 1.7: Transkripsiyonel aktivatörlerinin yapısı [5].

Kompleks çok hücreli organizmalarda dokuya spesifik ve uyarılabilir gen ekspresyonunun karmaşıklığı göz önüne alındığında, tahmin edilebileceği gibi ökaryotik hücrelerde birçok farklı transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. Moleküler karakterizasyon yapıldığında, bu proteinlerin birçoğunun DNA bağlama domainlerinin birbiriyle ilişkili olduğu görülmüştür.

Transkripsiyonun aktivasyon bölgesi aynı zamanda DNA-bağlanma bölgesi olarak karakterize edilmemektedir. Asitik aktivasyon bölgeleri olarak adlandırılan bazı bölgeler negatif yüklü aminoasitler bakımından (aspartat ve glutamat) zengindir, bazı bölgeler ise prolin ya da glutamin aminoasitleri bakımından zengindir. Bu aktivasyon bölgelerinin TFIIB veya TFIID gibi genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek transkripsiyonu uyardıkları ve böylece promotor üzerinde transkripsiyon faktörlerinin bir araya gelmesini kolaylaştırdıkları düşünülmektedir. Örneğin, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon bölgelerinin TATA bağlanma proteini (TBP) ilişkili faktörlere (TAFs) bağlanarak TFIID ile etkileştiği gösterilmiştir (Şekil 1.8). Bu etkileşimlerin önemli bir özelliği farklı aktivatörlerin başka genel transkripsiyon faktörlerine ya da TAF' lara bağlanabilir olmasıdır. Bu şekilde, birden fazla faktörün birleşen etkisi ile sinerjik olarak transkripsiyonu uyarabilen bir mekanizma sağlanmaktadır. Bu ökaryotlarda transkripsiyonun regülasyonu için anahtar bir özelliktir [5].

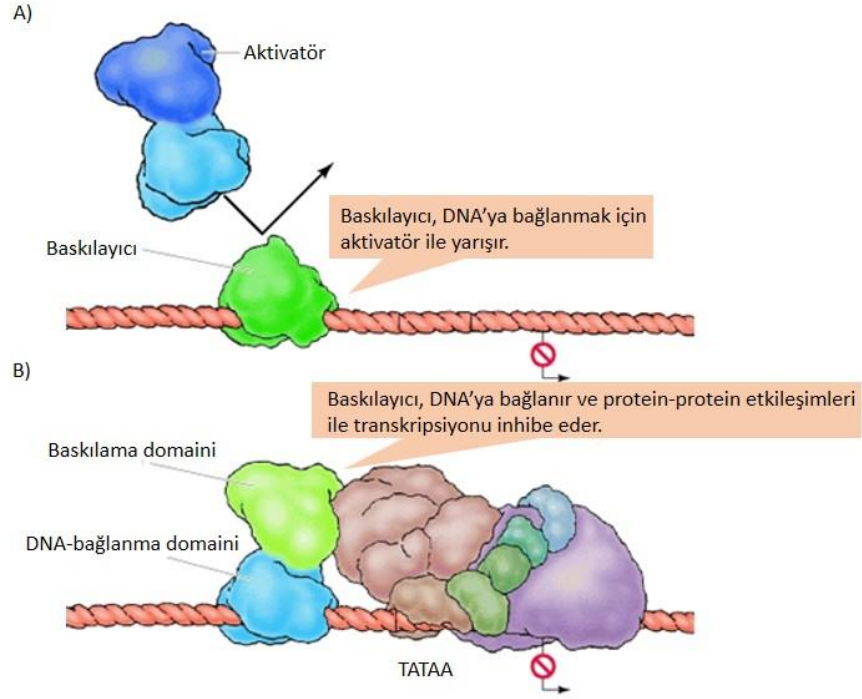


Şekil 1.8: Transkripsiyonel aktivatörlerin sinerjik hareketi. TBP: TATA bağlanma proteini, TAF1 ve TAF2: TATA bağlanma proteini ilişkili faktörler [5].

1.1.4 Ökaryotik Baskılayıcılar

Ökaryotlarda gen ekspresyonu transkripsiyonel aktivatörlerin yanı sıra baskılayıcılar tarafından da düzenlenmektedir. Ökaryotik baskılayıcılar prokaryotlardaki karşılıkları gibi, spesifik DNA dizisine bağlanmakta ve transkripsiyonu inhibe etmektedir. Bazı durumlarda ökaryotik baskılayıcılar DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engellemektedir (Şekil 1-9A). Örneğin, bir represörün transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın bir şekilde bağlanması, RNA polimerazın veya genel transkripsiyon faktörlerinin promotör ile etkileşimini engelleyebilir. Diğer baskılayıcılar ise spesifik regülatör dizilere bağlanmak için aktivatörler ile rekabet etmektedirler. Bazı baskılayıcılar aktivatörler gibi DNA-bağlanma bölgesi içerirler fakat aktivasyon bölgesine sahip değildir. Sonuç olarak, baskılayıcının bir promotora veya enhansıra bağlanması, aktivatörün bağlanmasını engelleyerek transkripsiyonu inhibe eder.

Basit bir şekilde aktivatörlerin bağlanmasına müdahale eden baskılayıcıların aksine aktif baskılayıcı olarak adlandırılan birçok baskılayıcı, protein-protein etkileşimleri aracılığıyla transkripsiyonu inhibe eden spesifik fonksiyonel domainler içermektedir (Şekil 1-9B). İlk olarak bu aktif baskılayıcılar 1990 yılında, *Drosophila*'da embriyonik gelişim ortaya çıkan *Krüppel* olarak adlandırılan genin çalışmaları sırasında tanımlanmıştır.



Şekil 1.9: Ökaryotik baskılayıcıların hareketleri [5].

Birçok aktif baskılayıcı hayvan hücrelerinde transkripsiyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır ve çoğu durumda hücre çoğalması ve farklılaşmasının önemli bir düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Transkripsiyonel aktivatörlerde olduğu gibi birkaç farklı baskılama bölgesi tanımlanmış durumdadır. Örneğin, Krüppel'in baskılama bölgesi alanin aminoasidi bakımından zengindir, oysaki diğer baskılama bölgeleri prolin ya da asitik aminoasitler bakımından zengindir. Baskılayıcıların fonksiyonel hedefi farklılık göstermektedir. Bazı baskılayıcılar TFIID gibi genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek transkripsiyonu inhibe ederken bazı baskılayıcıların ise spesifik aktivatör proteinler ile etkileştiği düşünülmektedir.

Aktivatörlerin yanı sıra baskılayıcılar tarafından da transkripsiyonun düzenlenmesi ökaryotik genlerin ekspresyonunu kontrol eden mekanizmanın genişliğini önemli oranda artırmaktadır. Baskılayıcıların önemli rollerinden biri uygun olmayan hücre tiplerinde dokuya spesifik genlerin ekspresyonunu inhibe etmektir. Örneğin, immüoglobulin enhansırında bir baskılayıcı bağlanma bölgesinin lenfoid olmayan hücre tiplerinde transkripsiyonu baskılayarak dokuya spesifik ekspresyona

katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Başka baskılayıcılar hormonlara ve büyüme faktörlerine tepki olarak hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının kontrolünde birçok önemli rol oynamaktadır [5].

1.2 Tetraspanin Ailesi

Tetraspanin proteinleri transmembran 4 süper ailesinin bir üyesidir. Tetraspaninler (TSPAN ya da TM4SF) integral membran proteinlerinin büyük bir kısmını oluşturur. İnsanlarda 33, farelerde 34 kuşlarda 35 üyeye sahip olduğu belirlenmiştir [7]. Süngerlerden memelilere kadar birçok türde ifade edilen bu küçük membran proteinleri ilk olarak 1990 yılında insan beyaz kan hücrelerinin yüzeyinde keşfedilmiş ancak birçok dokuda ifade edildiğinin gösterilmesi çok zaman almamıştır [8,9].

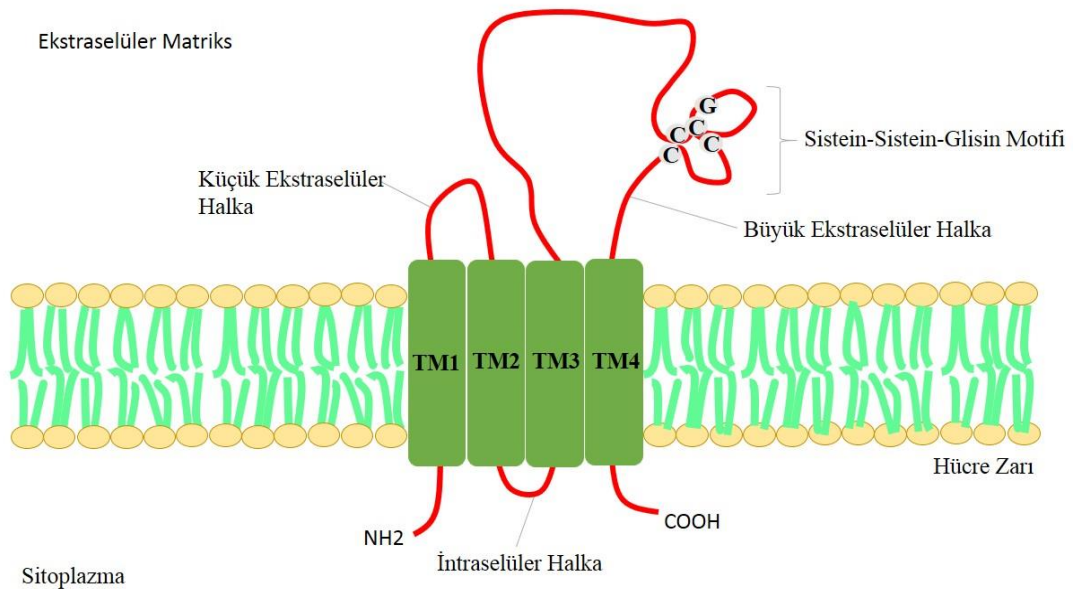
Döllenme, parazit ve virütik enfeksiyon, kas-sinir kavşağında sinaptik bağlantılar, trombosit agregasyonu, cilt bütünlüğünün sürdürülmesi, bağışıklık yanıtını tetikleme, metastaz baskılama ve tümör ilerlemesi gibi çok sayıda biyolojik süreçte yer aldığı bulunmuştur [8]. Fonksiyonlarını yerine getirmek için diğer tetraspaninler ve birçok transmembran ve sitozolik proteinler ile etkileşerek kompleks oluşturdukları belirlenmiştir [10].

Tetraspaninlerin birçok dokuda yaygın ve bol miktarda ifade edilmesine rağmen biyolojik fonksiyonları kapsamlı olarak çalışılmamıştır. Tetraspaninler integrin $\beta 1$ gibi birçok önemli reseptör ve sinyal molekülü ile etkileşme yeteneğine sahiptir ve böylece hücre zarında çok moleküllü kompleksler oluşturmaktadır. Tarrant ve arkadaşları tetraspanin proteininin temel rolünün hücre yüzeyinde sinyal iletimi için diğer proteinleri organize etmek olduğunu öne sürmüşlerdir. Ayrıca, tetraspanin-zenginleştirilmiş mikrodomanlerde (TEMs) tetraspanin ve komşu membran proteinleri arasında çok sayıda *cis* etkileşimleri vardır. Transmembran proteinlerinin bu grubu plazma membranında sinyal iletimini kolaylaştırır. Aynı zamanda bu proteinler migrasyon, adezyon, apoptozis gibi biyolojik süreçlerin bir çoğuna katılır ve bu süreçlerin hayati rol oynadığı metastazda da bazı üyeleri yer almaktadır. Biyolojik süreçlerde tetraspaninlerin önemi fertilizasyon, sinir sistemi, bağışıklık sistemi ve kanser üzerindeki ana etkisiyle karakterize edilir. Fakat, hücre içi sinyal

yolakları ile bağlantılı tetraspanin komplekslerinin mekanizması hala büyük oranda bilinmemektedir. Dahası, bazı rahatsızlıkların patolojisi ile tetraspaninlerin ilişkisi, tetraspaninlerin konak hücrenin membranında bulunan mikrobiyal reseptörler ile fonksiyonel birleşimleri organize etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Böylece, tetraspaninlerin belirli virüsler, parazitler, bakteriler ve mantarlar gibi çeşitli patojenler için bağlantı platformu olduğu anlaşılmaktadır [11-19].

1.2.1 Tetraspaninlerin Yapısı

Tetraspanin protein ailesi dört transmembran bölge içerir (Şekil 1.10). Sitoplazmik kısa amino- ve karboksi- terminal kuyruklara, transmembran membran bölgesi 2 (TM2) ve transmembran bölgesi 3 (TM3) arasında bir küçük intraselüler halkaya, transmembran bölgesi 1 (TM1) ve TM2 arasında küçük bir ekstraselüler halkaya (ECL1), TM3 ve transmembran bölgesi 4 (TM4) arasında büyük bir ekstraselüler halkaya (ECL2) sahiptir. Büyük ekstraselüler halka proteinlerin arasındaki etkileşimleri etkiler, intraselüler bölgeler ise sinyal ve hücre iskeleti moleküllerine bağlanabilir [11].



Şekil 1.10: Tetraspaninlerin yapısı.

Tetraspaninler bazı aminoasitlerin korunduğu dört transmembran bölge içermesi ile karakterize edilmesinin yanı sıra ECL2' nin bazı yapısal özellikleri sebebiyle de diğer proteinlerden farklıdırlar. ECL2 bölgesi çoğunlukla sabit bölgeler ve değişebilir bölgeler olarak ayrılabilir. Sabit bölgelerin dimerizasyon için, değişken bölgelerin ise tetraspanin olmayan partner moleküllerle etkileşim kurabilmek için olduğu belirtilmektedir [8]. Birçok tetraspanin ECL2 bölgesinde 4-6 adet sistein aminoasidi, glikozillenme bölgesi ve son derece korunmuş imza “CCG” motifi bulundurur.

1.2.2 Tetraspaninlerin Dağılımı ve Fonksiyonları

Birçok tetraspaninin eritrositler haricinde bütün hücrelerde ifade edildiği söylenmektedir [9,20-24]. Bazı tetraspaninlerin ifade edilmesi geniş bir dağılım gösterirken, bazıları ise çok sınırlı bir ifade modeline sahiptir (Tablo 1.2). Bu durum özellikle özelleşmiş yapılara sahip olan tetraspaninler için geçerlidir. Buna örnek olarak; ürotelyumun asimetrik birim membranlarının bileşenleri olan UP1a ve Up1b üroplakinleri [25] ve segment diskinin dışındaki fotoreseptörün kenarında bulunan RDS/peripherin ve Rom-1 proteinleri [26] verilmektedir. Fakat diğer tetraspaninlerin ifadesi de özel hücresele alt kümelerle sınırlıdır. Örneğin; CD53 başlıca bir lökosit belirteci iken, CD37 sadece lenfoid B hücrelerinde yüksek ifade seviyesi gösterir [20].

Tablo 1.2: Bazı tetraspaninlerin patofizyolojik önemleri [10].

Tetraspanin	Ekspresyon Profili	Deneysele modellerde genetik değişimler ile ilgili fenotipler	Hastalıklardaki sonuçlar ve diğer bilgiler
CD9	Geniş Dağılım	Bozulan sperm-yumurta birleşimi; artan makrofaj ve kas hücre birleşimi	Potansiyel metastaz baskılayıcı, hücrelere difteri toksininin bağlanmasını düzenler.
CD37	B lenfositlerde yüksek ekspresyon	İmmun yanıtın (özellikle sıvısal yanıtta) çeşitli özelliklerinde değişiklikler	Kronik lenfatik lösemide monoklonal antikor tarafından terapötik hedefleme
CD63	Geniş Dağılım	Bozulmuş melanojenez ve su dengesi	Trombosit aktivasyonunda yaygın olarak kullanılan belirteç

Tablo 1.2: (devam).

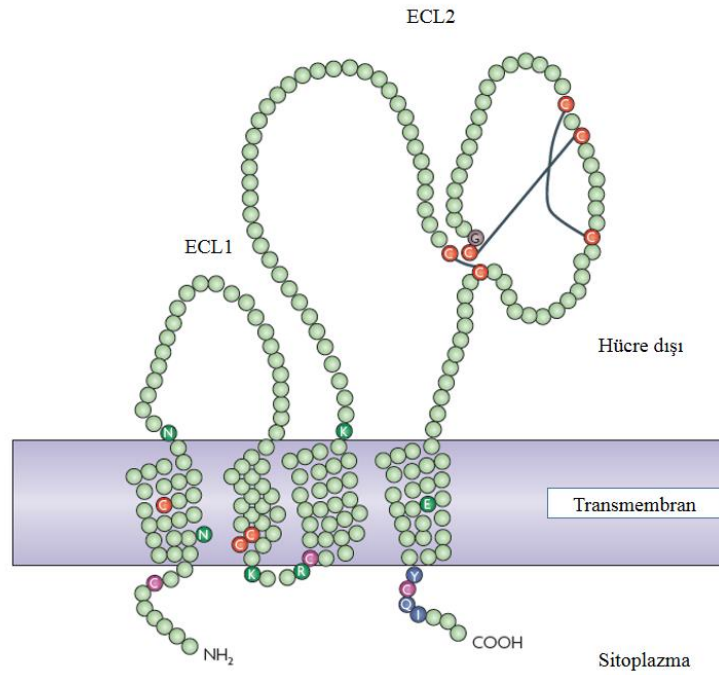
CD82	Geniş Dağılım		Potansiyel metastaz baskılayıcı
CD151	Geniş Dağılım	Böbrek bozukluğu, bozulan damar içi pıhtılaşma oluşumu, bozulan patolojik anjiyogenez	Kanser ilerlemesini düzenler,
TSPAN7	Beyin, lösemi T hücreleri		
TSPAN8	Sindirim epitelleri	Vücut ağırlığında azalma	Kanser ilerlemesini düzenler
TSPAN12	Protein seviyesinde bilinmiyor	Anormal retinal damar dizilişi ve yayılışı	
TSPAN33	Protein seviyesinde bilinmiyor	Alyuvar oluşumunda önemli bir rol oynar.	
Periferin/RDS ve ROM-1	Fotoreseptörler		
UP1a ve UP1b	Ürotelyum		UPI ve UPIII ile ilişkili olarak, ürotelyumun bariyer fonksiyonu için önemli olan ürotelyum plaklarını oluştururlar.

Aynı zamanda her yerde bulunmayan ama yaygın olan tetraspaninler CD9, CD63, CD82, CD51 olarak rapor edilmiştir [9,24].

Bağışıklık sisteminde CD81 ve CD37 tetraspaninlerinin bulunmasının ne gibi sonuçları meydana getireceği nakavt fareler kullanılarak araştırılmıştır. CD81' in nakavt edilmesi CD19 katılımını takip eden kalsiyum taşınmasında azalma ile ilişkili olarak B hücre antijeni CD19'un ekspresyonunda azalmaya neden olduğu görülmüştür [27-29].

1.3 Tetraspanin 8

TSPAN8 tarafından kodlanan Tspan8 proteini Tetraspanin ailesinin bir üyesidir. TM4SF3 (transmembran 4 superfamily 3), CO-029, ve farelerde D6.1A olarak da isimlendirilirler. Bütün tetraspaninlerde olduğu gibi dört transmembran domain bulunduran hücre yüzeyi glikoproteinleridir. İnsan geninde kromozom 12 üzerinde bulunmaktadır. Tetraspaninler ile ilgili bahsedilen özellikler ve fonksiyonların çoğu TSPAN8’ de de mevcuttur.



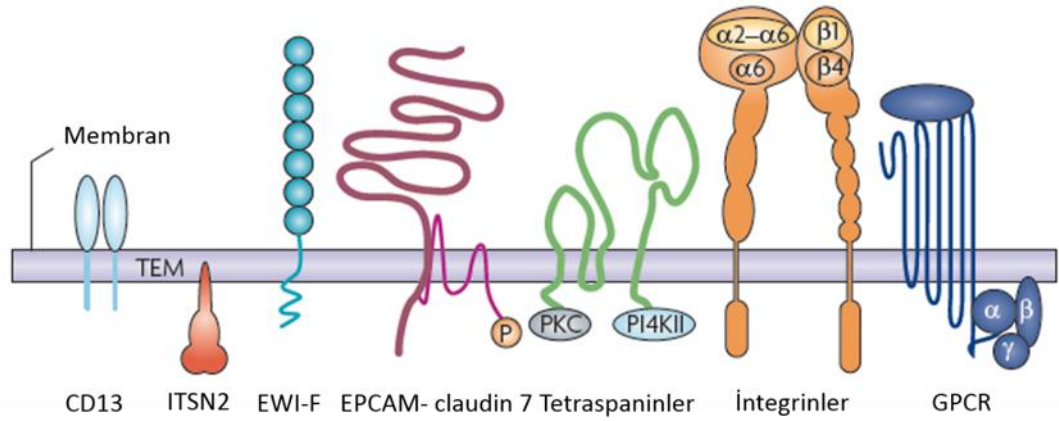
Şekil 1.11: TSPAN8’in moleküler yapısı [8].

Şekil 1.11’ de görüldüğü gibi ekstraselüler bölge 2 üzerinde CCG motifini de kapsayan 6 korunmuş sistein aminoasidi (kırmızı) vardır. Disülfat bağları ile gösterilmiştir. Transmembran 1 ve 4 bölgeleri polar aminoasitlere (yeşil) sahiptir. Karboksi-terminal bölge bir ayırma motifi (mavi) içermektedir.

Sitoplazmik bölgeler palmitoilasyon bölgeleri (pembe) içermektedir. Palmitoilasyon tipik olarak membran proteinlerinin sistein aminoasitlerine (az sıklıkla serin ya da treonin) palmitik asit gibi yağ asitlerinin kovalent bağlanmasıdır. Palmitoilasyon proteinlerin hidrofobikliğini kuvvetlendirmekte ve membran ilişkilerine katkı sağlamaktadır.

TSPAN8; CD9, CD81, CD151 tetraspaninleri ve $\alpha 3\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ dahil olmak üzere çeşitli integrinler ile ilişkilidir (Şekil 1.12). Fakat TSPAN8 ve $\alpha 3\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ integrinleri arasındaki ilişki TSPAN8 ve CD151 arasındaki ilişkienden daha zayıftır. TSPAN8 aynı zamana EWI-F, EPCAM, CD13, PKC, ve PI4KII gibi integrin olmayan moleküllerle de ilişki kurmaktadır [8].

TSPAN8 üyesi olduğu tetraspanin ailesi içerisinde tümörler üzerinde ilk belirlenen antijenlerdendir.



Şekil 1.12: TSPAN8 ve farelerde homologu olan D6.1A'nın ilişkili olduğu moleküller [8].

1.3.1 Tetraspanin 8 ve Kanser İlişkisi

Tetraspanin süper ailesinin bir üyesi olan TSPAN8' in farklı kanser dokuları ve hücre hatlarında ifade edildiği bilinmektedir. Yemek borusu karsinomu, hepatoselüler karsinom, pankreas, kolorektal, karaciğer ve gastrik kanserlerinin çeşitli tiplerinde yüksek seviyede ifade edilen tümör ilişkili antijen ve metastaza teşvik eden bir tetraspanin olarak belirtilmiştir. TSPAN8 kanser hücrelerinin hayatta kalması, migrasyon, metastaz ve tümör anjiyogenezi gibi birçok kanser hücre fonksiyonunda rol almaktadır.

TSPAN8 ekspresyonu hepatoselüler karsinomda sıklıkla yükselmektedir. TSPAN8'in yüksek seviyede ekspresyonunun hepatoselüler kanserin karaciğer içinde yayılımı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. TSPAN8'in tümör büyüme ve metastaza teşvik etme aktivitesinin anjiyogeneze ve kanser hücre hareketliliğine neden olabilme yeteneği ile mümkün olduğu belirtilmektedir [30].

Yemek borusu kanserinde TSPAN8 ve ADAM12M arasındaki iş birliği metastaza yol açmaktadır [31].

İnsan kolon kanser hücrelerinde tetraspanin ağını belirlemek için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bahsedilen çalışma da iki metastatik hücre hattı ve bir metastatik olmayan hücre hattı kullanılmıştır. TSPAN8'in metastatik hücre hattında ekspres olurken metastatik olmayan hücre hattında ekspres olmadığı ifade edilmektedir. Primer tümörden türeyen kolon karsinomuna nazaran metastazda TSPAN8 ekspresyonunun artması, TSPAN8'in tümör ilerlemesinde bir role sahip olduğunu desteklediği belirtilmiştir [32-33].

İnsan gastrik kanser dokularında TSPAN8'in ekspresyonu araştırılmıştır. Normal ve tümöre yakın dokular karşılaştırıldığında gastrik kanser dokularında hem mRNA hem protein seviyesinde artış gözlemlenmiştir. AGS hücre hattı kullanılarak in vitro bir deney gerçekleştirilmiş ve EGF sitokininin AGS hücre proliferasyonunu ve invazyonu üzerinde artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. TSPAN8'in nakavt edilmesi ile gastrik kanser hücre proliferasyonu ve invazyonu üzerinde EGF'in etkisinin azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda TSPAN8'in insan gastrik kanserinde bir onkogen olduğu ve kısmen de olsa invazyon ve proliferasyonda EGF'in etkisine aracılık ettiği öne sürülmüştür [34].

Başka bir çalışmada gastrik kanserde TSPAN8'in MAPK yolağı aracılığıyla metastaza yol açtığı belirtilmiştir. Özellikle $\alpha6\beta4$ ile yaptığı güçlü bağlantısıyla buna katkı sağladığı söylenmiştir. TSPAN8- $\alpha6\beta4$ ilişkisinin göze çarpan bir şekilde tümör hücre hareketliliğini artırdığı ifade edilmiştir [31].

TSPAN8'in malignant glioma için önemli bir onkogen olabileceğinden bahsedilmektedir. Bunun kanıtı olarak şu sonuçlar bulunmuştur. Çeşitli klinik malignant glioma dokularında TSPAN8'in yüksek ekspresyon seviyesi, normal beyin dokusu çevresinde düşük ekspresyon seviyesi sergilediği görülmüştür. Ayrıca ekspresyon seviyesinin tümörün derecesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Malignant glioma hücrelerinde TSPAN8 ekspresyonu hücre proliferasyonu ve migrasyonunu düzenlemektedir. Diğer yandan aynı hücre hatlarında siRNAlar aracılığıyla TSPAN8 knockdown edilmiş ve hücre migrasyonu ve proliferasyonunun baskılandığı görülmüştür. TSPAN8'in susturulması malignant glioma hücrelerinde temozolomide duyarlılığını artırmıştır. TSPAN8, glioma dokularında ve hücrelerinde aktive edilmiş

FAK ile bir kompleks oluşturmaktadır ve TSPAN8'in knockdown edilmesinin malignant glioma hücre hatlarında FAK aktivasyonunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bütün bu sonuçlar doğrultusunda TSPAN8'in malignant glioma gelişiminde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir [35].

TSPAN8'in yüksek ekspresyon seviyesinin apoptoz direncinin artmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Apoptoz direncinin ortaya çıkması PI3K-Akt yolağının aktifleşmesiyle meydana gelmektedir. Başka bir olasılıkla da TSPAN8 ilişkili EPCAM-claudin kompleksi buna neden olabilir. Anti-apoptotik protein ve PI3K aktivasyonunun düşmesi ve Akt'nin kaybı durumunda insan ve fare kanser hatlarında EPCAM ve claudin 7'nin knockdownu ile beraber ilaç direncinde dikkat çeken bir azalma meydana geldiğinden bu sonuca varılmıştır. Sinyaller, claudin 7 fosforilasyonu ya da başka bir olasılıkla tetraspanin 8 ilişkili PKC'nin eşliğinde TEMs' e EPCAM-claudin 7 kompleksinin katılmasıyla başlamaktadır [8].

Pankreatik kanser kök hücre (Pa- CSC) belirteçleri arasında CD44v6, c-Met, EpCAM, TSPAN8, CXCR4, $\alpha6\beta4$, ve prominin 1 (CD133) en dikkat çekenlerdir. Tetraspanin partnerleri arasında en göze çarpan proteinlerin integrinler olduğu bilinmektedir. Özellikle $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ ve $\alpha6\beta4$ olmak üzere $\alpha4\beta1$ ve $\alpha5\beta1$ integrinleri de TSPAN8 ile ilişkilidir. Proteazlar işlevsel olarak önemli olan tetraspanin partnerlerinin başka bir sınıfıdır. TSPAN8, dipeptidaz CD26, MMP14, TACE (ADAM17), MMP2 ve MMP9 ile ilişkilidir. Pa-C4SC belirteci olarak TSPAN8'in en önemli aktivitesinin $\alpha6\beta4$, CD44v6 ve EpCAM ile ilişkisi olduğu ifade edilmektedir [31].

1.4 Sitokinler

Sitokinler embriyonik gelişim, hastalık oluşumu, enfeksiyona spesifik olmayan yanıt, antijene spesifik yanıt, zihinsel fonsiyonlarda değişiklikler, yaşlanmadaki dejeneratif süreçlerin ilerlemesi gibi birçok biyolojik süreci etkilemektedirler. Günümüzde "sitokin" terimi interferonlar, interlökinler, kemokin ailesi, mezenşimal büyüme faktörleri, tümör nekroz faktörü ailesi ve adipokinezleri kapsamaktadır.

Son yıllarda sitokinler, insan hastalıkları için diagnostik, prognostik ve terapötik ajanlar olarak tıpta önemli bir yer edinmiştir. Sitokinler yaklaşık her biyolojik

disiplinde çalışılmış olmasına rağmen, sitokinlerin aracılık ettiği etkiler inflamasyon, immunoloji, aterosklerosis ve kanserde baskın olmaktadır [36].

1.4.1 İnterlökin 6

Hücrelerde farklılaşma, hayatta kalma, apoptoz ve proliferasyon gibi süreçleri düzenleyerek hücrel ve fizyolojik cevaplara neden olan interlökin-6 (IL6) moleküler ağırlığı 26 kilodalton (kDa) olan ve 184 aminoasit içeren bir glikoproteindir [35]. Tek çekirdekli fagositler, T hücreleri ve fibroblastlar gibi birçok hücre tarafından üretilir. Diğer birçok sitokin gibi proinflamator ve anti-inflamatör özelliklere sahip olan IL-6; immün yanıt, inflamasyon, hemotopoez, onkogenez ve kemik erimesinde önemli roller üstlenmiştir.

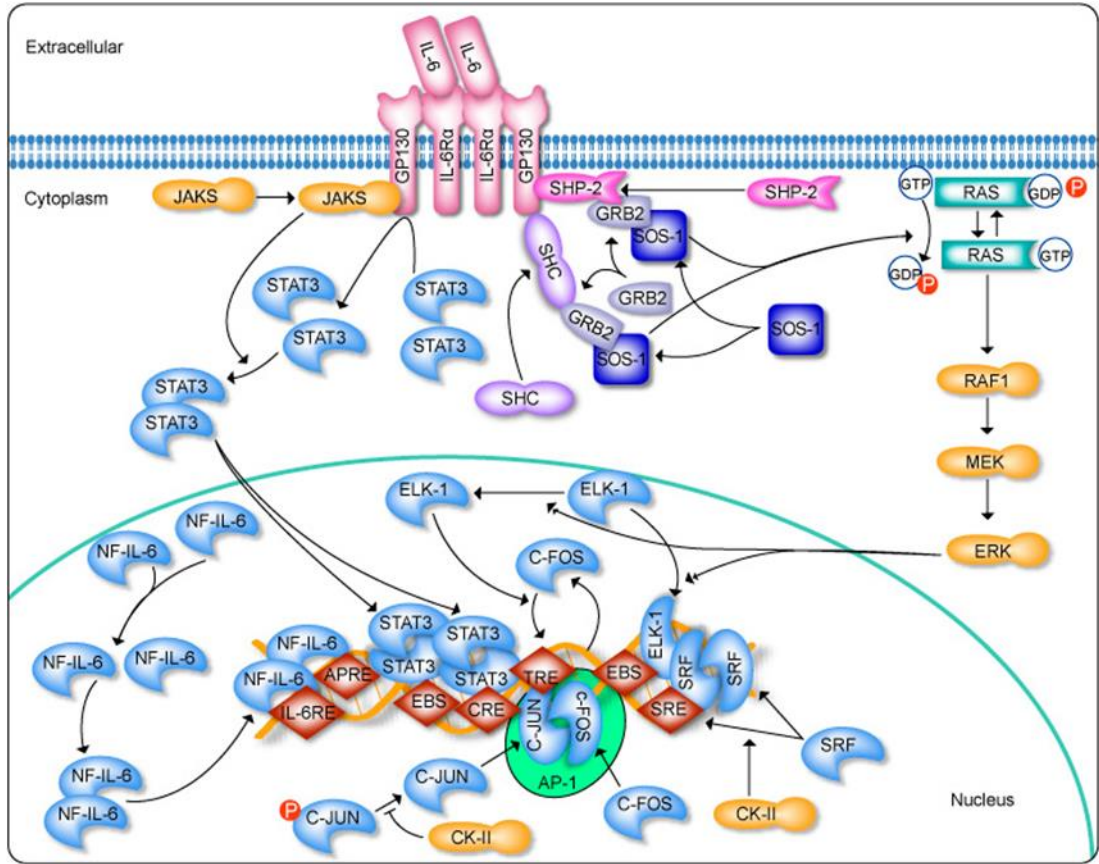
Olgun B hücreleri için büyüme faktörü olarak hareket eder ve onların antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmesine neden olur. T hücrelerinin aktivasyonu ve farklılaşmasına neden olmaktadır ve IL-2 ve IL-6 reseptörlerinin ekspresyonunun başlatılmasında yer almaktadır [38].

İnterlökin 6 kanser aktivitesini etkileyen birçok fonksiyona sahip bir sitokindir. Artan ekspresyon seviyesi yüksek kanser riski ile ilişkilidir ve bu yüksek ekspresyon seviyesi çeşitli kanser tipleri için prognostik bir faktör olarak gösterilmiştir [39]. Ayrıca, koroner kalp bozuklukları, insülin direnci hastalıkları, ileri derece kanser hastaları, astım durumlarında seviyesinin arttığı belirlenmiştir.

Tümör büyümesi, kanser hücrelerinin kötü huylu tümöre farklılaşması ve mikroçevre immunomodülasyonunda yer almaktadır [40]. Bu özellikler kuvvetlendirilmiş neo-anjiyogenez, kanser hücre apoptozunun inhibisyonu ve kazanılmış hücre direncinin bir sonucudur. Bu sonuçlara çeşitli sinyal yolları aracılığıyla vasıta olmaktadır ve bunlardan en önemlisi STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription-3; Transkripsiyon Sinyali Arttırıcı ve Aktivatörü)'tür.

Birçok hücrenin yüzeyinde bulunan IL-6 reseptörleri iki alt üniteden oluşmaktadır (Şekil 1-4). IL-6 reseptörünün α alt ünitesi ligand spesifikliğini sağlarken, diğer alt ünite GP130 (glikoprotein 130) ise IL-6 ailesindeki bütün reseptörler ile ortak özellikler taşır. IL-6'nın reseptörüne bağlanması ile JAK

Kinazların (Jasus Kinase) ve Ras-aracılı yolların aktivasyonu sağlanır. Aktive olmuş Jak Kinazlar, STAT3 ve SHP2 (SH2 (Src Homology-2) Domain containing Tyrosine Phosphatase) transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek aktive ederler. Fosforillenen STAT3 dimer oluşturarak çekirdeğin içerisine hareket eder ve STAT3 bağlanma dizisi içeren genlerin regülasyonunu sağlar. IL-6 sitokini için diğer önemli olan Ras-aracılı yolda ise aktive olan JAK Kinazlar SHP2'yi fosforilleyerek GRB2, SHC ve Ras aracılığıyla sinyalin MAPKinaz yolağına ulaşması sağlanır ve ELK-1 ve NF-IL-6 (C/EBP beta) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlanır (Şekil 1.13) [41-43].



Şekil 1.13: IL-6 aracılığı ile gen regülasyonunun kontrolü [44].

1.5 Çalışmanın Amacı

Çalışmamızda kanser ilişkili TSPAN8 geninin regülasyonunun aydınlatılması amaçlanmıştır. Çalışmamız kapsamında ilk olarak TSPAN8 promotor bölgesi biyoinformatik yöntemler ile analiz edilerek belirlenmiş ve transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi için kullanılacak olan lüisiferaz haberci vektöre

klonlanmıştır. Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda bazal ve IL-6 sitokini ile uyarılmış transkripsiyonel aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca IL-6 sitokininin TSPAN8 genin ekspresyonuna etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Gerçek Zamanlı PZR ile mRNA seviyesindeki değişiklikler, western blot analizleri ile protein seviyesindeki değişiklikler belirlenmiştir. Bu çerçevede planlanan çalışmaları basamak basamak özetlersek;

- i. İnsan TSPAN8 promotor bölgesinin biyoinformatik olarak analiz edilmesi
- ii. Biyoinformatik araçlarla olası transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin belirlenmesi
- iii. İnsan TSPAN8 promotor bölgesinin genomik DNA kullanılarak PZR stratejisi ile klonlanması
- iv. Farklı uzunluklarda promotor parçalarının oluşturulması
- v. Transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için lusiferaz haberci vektörlere klonlanması
- vi. Klonlanmış olan DNA dizilerinin dizi analizi ile doğrulanması
- vii. Farklı uzunluktaki promotor parçalarının, MIA-PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine geçici olarak transfekte edilmesi
- viii. Promotorun transfekte edildiği hücrelerde lüsiferaz aktivitesi ölçülerek bazal transkripsiyonel aktivitelerinin ve IL-6 sitokini ile uyarıldığındaki transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi
- ix. Birçok biyolojik süreçte rol aldığı bilinmekte olan IL-6 sitokininin TSPAN8 geninin mRNA seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi için, Gerçek Zamanlı PZR analizleri yapılması
- x. Aynı zamanda protein seviyesindeki ekspresyonunun western blot analizleri ile gösterilmesi.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküllere biyoloji için uygun saflıktadır. Klonlamada kullanılan vektör sistemleri ve enzimler ise Fermentas MBI, Promega firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan kimyasallar.

DNA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
Kullanılan Malzeme	Üretici Firma
Taq DNA Polimeraz Enzim ve Buffer	Fermentas
MgCl ₂	Fermentas
T4 DNA Ligaz Enzim ve Buffer	Fermentas
pGEM-T Easy Vektör Sistemi	Promega
pMet-Luc Lüsiferaz Haberci ve Kontrol Vektörü	Clontech
Plasmid Mini Prep Kiti	Fermentas
Plasmid Maxi Prep Kiti	Fermentas
Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	Fermentas, NEB
HEPES	Sigma
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay Kiti	Clontech
Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
Kullanılan Malzeme	Üretici Firma
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum (DMEM)	Gibco

Tablo 2.1: (devam).

Fetal Sığır Serumu (FCS)	Biological Industrial
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
Fosfat Tamponu Tabletleri (PBS)	Amresco/Oxoid
EDTA	Sigma
Tripsin	Sigma
Tripan Mavi Boyası	Sigma
CaCl ₂	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
RNA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
Kullanılan Malzeme	Üretici Firma
B-Merkaptoetanol	Sigma
GeneJET™ RNA Purification Kit	Fermentas
SYBR® Green PZR Master Mix ve Gradiend su	Roche
Protein Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kitler	
Kullanılan Malzeme	Üretici Firma
B-aktin Antikor	Sigma
TSPAN8 antikor	Sigma
Sekonder antikor (monoklonal goat, anti-mouse)	Sigma
Sekonder antikor (monoklonal goat, anti-rabbit)	Abcam
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma
Page ruler plus prestained protein ladder (26619)	Thermo Scientific
Tris	Sigma
Amonyum persülfat	Merck

Tablo 2.1: (devam).

PVDF Membran	Millipore
Pierce ECL (Western Blotting Substrat)	Advansta

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri.

Kullanılan Gereç	Modeli
-20° ve +4° Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
-80°C Ultralow Freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
CO ₂ 'li inkübatör	Nuair, ABD
DNA Elektroforezi	Minicell Primo
Etüv	WTB German, Nüve Türkiye
Hassas Terazı	Sartorius, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon, Japonya
Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, ABD GFL, Almanya
Jel Görüntüleme Sistemi	UVP, İngiltere
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
Luminometre	Thermo, ABD
Mikro santrifüj	Thermo, ABD
Otoklav	Hirayama, Japonya
Otomatik pipetler	Finnpipette
PZR Cihazı	Biolab, Thermo

Tablo 2.2: (devam).

pH Metre	WTW, Almanya
Qubit	İnvitrogen
Saf Su Cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Almanya
Sıcak Su Banyosu	Consort, İngiltere
UV Visible Spektrofotometre	Thermo Scientific™ Multiskan GO
Vorteks	VELP Scientifica

2.1.3 DNA ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

2.1.3.1 Agaroz Jel Elektroforezindeki Solüsyonlar

Tablo 2.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar.

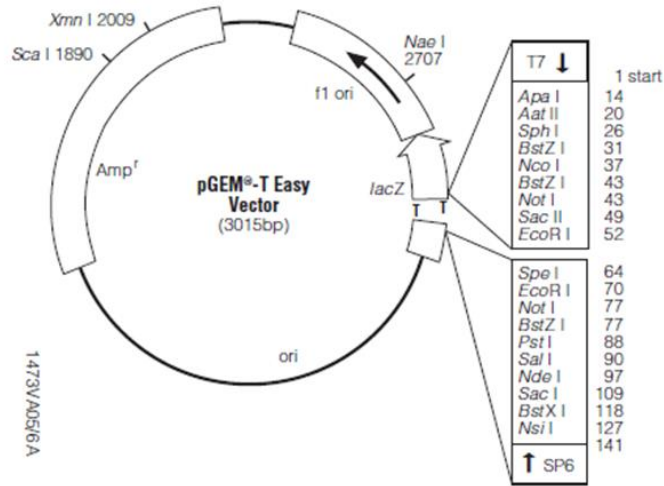
Solüsyon	İçeriği
5X TBE (pH: 8,00)	54 gram Tris Baz, 27,5 gram Borik Asit tartılır. 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,00) eklenir. dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır.
0,5X TBE	5X TBE stok tampondan 100 ml alınarak üzeri dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır.
1 kb DNA Marker	1 µl (DNA Ladder):2 µl (yükleme boyası):2 µl steril dH ₂ O oranlarında çözülür.
Etidyum Bromür Solüsyonu	10 mg/mL olacak şekilde steril dH ₂ O ile hazırlanır. Işığı geçirmeyen koyu renkli bir şişede muhafaza edilir.

2.1.3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu Solüsyonları

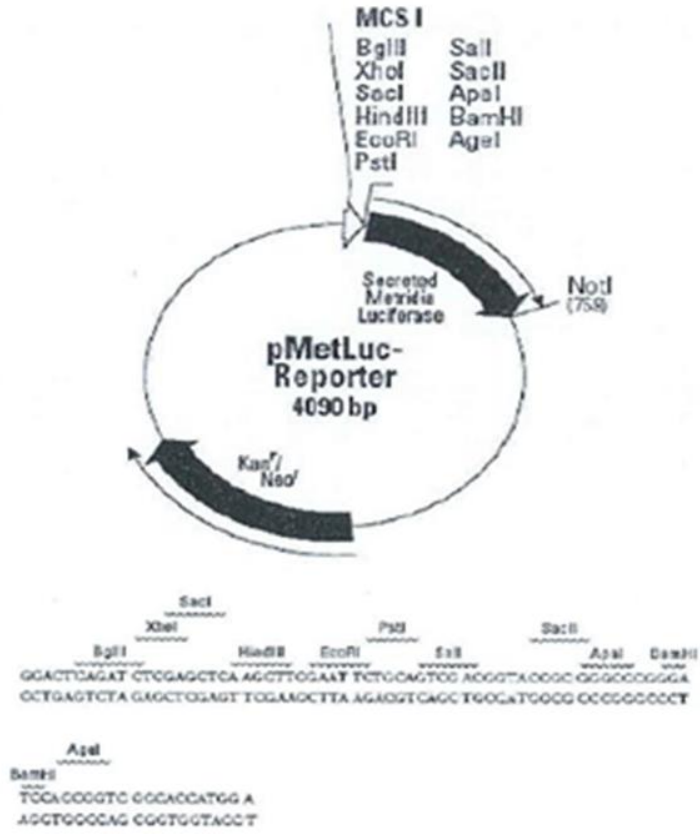
Tablo 2.4: Kandan genomik DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar.

Solüsyon	İçeriği
Proteinaz K	Proteinaz K son konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde hazırlanır. (1 ml dH ₂ O' da 0,01 gram). -20 °C' de saklanır.
Doymuş Amonyum Asetat (NH ₄ Ac)	74 gNH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100 ml' ye tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda yaklaşık 40°C' de çözülür. Filtrasyon ile steril edilir. +4 °C' de saklanır.
Nüklei Lizis Buffer	10 mM Tris Base, 400 mM NaCl, 2 mM Na ₂ EDTA, pH 8,2 distile H ₂ O ile istenen miktara tamamlanır. +4° C' de saklanır.

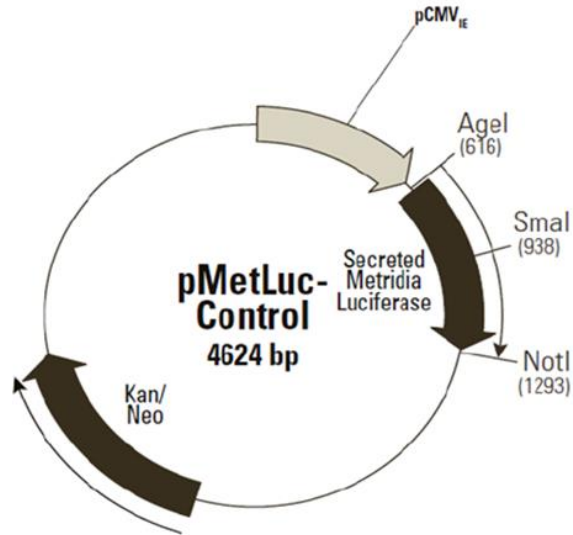
2.1.3.3 Çalışmada Kullanılan Vektörler



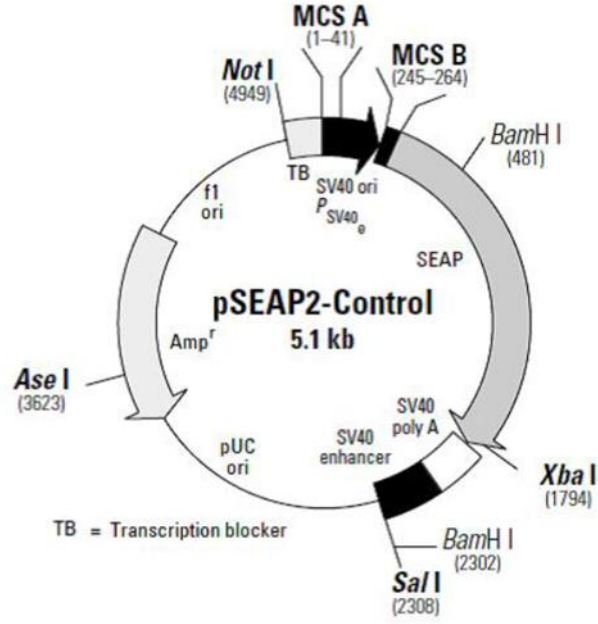
Şekil 2.1: pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.



Şekil 2.2: pMet-Luc haberci vektörünün restriksiyon haritası ve klonlama bölgesi.



Şekil 2.3: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan pMet-Luc pozitif kontrol vektörü.



Şekil 2.4: Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan SEAP vektörü.

2.1.3.4 Transfeksiyon Çalışmalarındaki Solüsyonlar

Tablo 2.5: Geçici transfeksiyon deneylerinde kullanılan tampon ve çözeltiler.

2mM CaCl₂	14,7g CaCl ₂ , balon jode saf su ile 50ml'ye tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra filtre edilir ve +4 °C' de saklanır.
2X HEPES	0,04 g Na ₂ HPO ₄ , 1,6 g NaCl, 1,3 g HEPES distile su ile 100 ml' ye tamamlanır. pH: 7,05 ile 7,12 aralığında olmasına dikkat edilmelidir. Otoklavlanır, filtre edilir ve -20 °C' de saklanır.
10X Substrat Solüsyonu	Liyofilize olarak gelen substrat, substrat tamponu ile çözülür.
1X Substrat (Reaksiyon Tamponu)	10X Substrat solüsyonu, 10 kat olacak şekilde sulandırılır. Elde edilen reaksiyon tamponundan her ölçüm için 5µl kullanılır.

2.1.3.5 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları

Tablo 2.6: Klonlama için kullanılan kompetan hücreler.

1	<i>E. coli</i> XLI-Blue (endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK ⁻ mK ⁺))
2	<i>E. coli</i> DH5α (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1)

2.1.3.6 Bakteriyel Kültür Ortamı

E. coli hücrelerinin üreyebilmeleri için uygun kültür ortamı LB agar ve LB sıvı besiyeri ile sağlandı. Toz halinde satın alınan bakteriyel medyum firmanın önerdiği miktarlarda ddH₂O ile hazırlanarak otoklavda steril edilerek kullanıldı.

2.1.3.7 Antibiyotikler

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

2.1.3.8 Antibiyotik İçeren Katı Besiyerinin Hazırlanması

Katı besi yeri firmanın önerdiği gibi 8,75 gr LB agar tartılır ve 250 ml dH₂O ile çözüldü ve otoklavlandı. İldıktan sonra ilgili antibiyotik eklenerek petrilere döküldü. Donmasının ardından parafilmenip +4 °C' ye kaldırıldı.

2.1.4 Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler

2.1.4.1 Hücre Kültüründe Medyumun Hazırlanması

Hücre kültüründe ticari olarak temin edilen FCS son konsantrasyonu %10 olacak şekilde DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) medyumunu içerisine eklendi.

2.1.4.2 FCS İnaktivasyonu

Soğuk zincir ile taşınması yapılan FCS, -20 °C' de saklanır. Stok FCS kullanılmadan önce +4 °C' de eritildi ve ardından 56 °C' de 30 dakika su banyosu kullanılarak inaktive edildi. 0,22 µm steril filtreden geçirilerek steril edildi. Rutin kullanım için tekrar -20 °C' de saklandı.

2.1.4.3 BSA Hazırlanması

Stok %15' lik BSA hazırlanırken 0,75 gr BSA 5 ml PBS içinde çözüldü. 0,22 µm steril filtreden geçirilerek steril edildi ve +4 °C' de saklandı.

2.1.4.4 PBS Hazırlanması

Tablet şeklinde satın alınan PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tableti 100 ml dH₂O içersine eklendi. Otoklavda steril edildi ve +4 °C' de saklandı.

2.1.5 Proteinler ile İlgili Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

2.1.5.1 Western Blot Tekniğinde Kullanılan Çözeltiler

Tablo 2.7: Western blot tekniğinde kullanılan tampon ve çözeltiler.

Solüsyon	İçeriği
10X Tris Buffered Saline (10X TBS)	Çözelti 20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl olacak şekilde hazırlanır ve pH 7.4' e ayarlanır. Otoklavlanarak steril hale getirilir.
Bromfenol Mavisi Boyası	%0.05 (w/v) bromfenol mavisi dH ₂ O içinde çözülür.

Tablo 2.7: (devam).

Ripa Tamponu	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH:8.0), %1 IGEPAL, %0,5 Sodyum Deoksikolat ve %0,1 SDS ile hazırlanır. Filtre edilir ve -20 °C' de saklanır.
Renk Açma Çözeltisi	Hacimce %. 7,5 Asetik Asit, % 5 Metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir.
SDS PAGE Ayırma Jeli Tamponu	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), %10 (w/v) SDS ile hazırlanır.
SDS PAGE Yığıma Jeli Tamponu	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 (w/v) SDS ile hazırlanır.
Western Blot Transfer Tamponu	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol ile hazırlanır.
Yükleme Boyası	1,4 gr Tris, 4 gr SDS, 20 gr Sükroz, 4 mg Bromfenol mavisi 100 mL' ye tamamlanır ve pH 6,8' e ayarlanır.

2.2 Metotlar

2.2.1 Çalışmalarda Kullanılan Ortam ve Malzemelerin Temizliği ve Steril Edilmesi

Isıya karşı dayanıklı olan tüm cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta) boyunca otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce çalışılacak alan ve pipetler %70' lik alkol ile temizlendi.

Doku kültürü laboratuvarı her hafta düzenli olarak alkol ve virkon içeren sıvılar ile temizlendi. Ortamdaki havanın sterilizasyonunu sağlamak amacıyla oda kullanılmadığı zamanlarda UV lamba kullanıldı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow çalıştırılarak çalışma ortamındaki havanın sterilizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.2 DNA ile ilgili Teknikler

2.2.2.1 Primer Tasarımı

Primer tasarımı için www.ncbi.nlm.nih.gov, www.restrictionmapper.org ve www.idtdna.com internet adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edildi. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda bulunan DNA sekansları ile blast yapılarak insan TSPAN8 promotörü ile en yüksek benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir.

2.2.2.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için, 400 µl EDTA' lı tüpe alınan kan 1,5 ml' lik ependorf tüplerine paylaştırıldı. Her tüpün üzerine 1 ml distile su ilave edildi ve 5 dakika boyunca çalkalandı. Süre sonunda ependorflar 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve tekrar 1 ml distile su eklenerek çalkalandı. Tekrar aynı koşullarda santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldıktan sonra alt kısımda kalan çökeltinin üzerine 250 µl nüklei lizis tamponu, 20 µl % 10' luk SDS tamponu ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek çalkalandı. Ardından 72 °C su banyosunda 10 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda 175 µl doymuş amonyum asetat eklenerek çalkalama yapıldı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Bekleme aşamasının ardından 4500 rpm' de 20 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant temiz bir ependorfa alındı. Üzerine 2 katı oranında absolü etanol ilave edildi. Ependorf ters düz edilerek DNA' nın çökmesi sağlandı. Tekrar üstte kalan kısım uzaklaştırılarak çökelti üzerine 250 µl %75' lik etanol eklenerek 13.000 rpm' de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Üstte kalan kısım atılıp ependorfun kapağı açık bırakılarak DNA'nın kuruması beklendi. Son olarak DNA distile su ile çözülerek kullanılmak üzere -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

2.2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

Polimeraz reaksiyonları 50 µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak yaklaşık 200 ng DNA, her bir primer son konsantrasyonu 2 µM, 1X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH:9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP, 2,5 ünite Taq DNA Polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonu 1 mM, 2 mM, 3 mM olacak şekilde 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 ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra jelde görüntülenmiş ve istenilen bantlar jelden geri kazanılmıştır.

2.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

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

2.2.2.5 Agaroz Jelden DNA'nın Saflaştırılması

İstenilen büyüklükte olan DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden bistüri ile kesilerek ependorflara alındı. DNA jel ekstraksiyon kiti (Fermentas) kullanıldı ve üretici talimatlarına uyularak DNA elüe edildi. Jelden geri kazanılan DNA'nın bir miktarı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanları alındı.

2.2.2.6 PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Taq DNA polimerazın kullanıldığı PZR sonucu elde edilen ürünlerin pGEM-T easy vektörüne prosedürün önerdiği şekilde T:A klonlaması gerçekleştirildi. PZR ürünümüzde oluşan Adenin kuyukları pGEM-T easy vektöründe kullanılan Timin nükleotidine dimer oluşturarak ligasyon bölgesi oluşturuldu. Buna göre 20 µl toplam hacim olacak şekilde, 1 µl pGEM-T vektör (50 ng), 15 µl insert DNA (jelden kazanılan PZR ürünü), 1 µl T4 DNA ligaz, 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu ve +4 °C' de bir gece inkübe edildi. Ligasyon sonucunda elde edilen ligasyon ürünlerinin *E. coli XLI-Blue* kompetan hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için oluşan mavi-beyaz kolonilerden beyaz tek koloni seçimi yapıldı. Mavi-beyaz koloni oluşumu için ampisilin içeren LB agar besiyerlerine 20 µl X-Gal (stok 50 mg/ml) ve 100 µl IPTG (100 mM stok) yayıldı.

2.2.2.7 Miniprep Plazmit DNA İzolasyonu

Küçük miktarlarda DNA izolasyonu için Fermentas Miniprep DNA izolasyon kiti kullanıldı. Kit prosedürüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB besiyerine transformasyonu yapılmış olan tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Bir gecenin sonunda bakteri kültürü 4000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve bakteri pelletine kitin talimatlarına uygun olacak şekilde yapılan işlemlerin ardından DNA elüe edildi.

2.2.2.8 Maxiprep Plazmit DNA İzolasyonu

Büyük miktarda ve transfeksiyon için uygun saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Fermentas Maxiprep DNA izolasyon kiti kullanıldı. Kullanılan ticari kitin prosedürüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 5-10 ml LB sıvı besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 37 °C ve 250 rpm çalkalamalı inkübatörde 8 saat inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde ön kültür 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyum içerisine inoküle edildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanılır. 37 °C ve 250 rpm' de 12-16 saat inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. Bakteriler yeterli

yoğunluğa ulaşınca 4°C 6000 rpm' de 15 dakika santrifüj yapılarak prosedürün diğer basamakları yapıldı. İşlem sonunda yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi.

2.2.2.9 DNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

Plazmid DNA izole edildikten sonra miktarının ve saflığını belirlenmesi için iki yöntem kullanıldı. İlk yöntemde spektrofotometrik olarak ölçüm alındı. DNA dH₂O ile 40 kat sulandırılır ve kuvarz küvet kullanılarak spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans alınır. İkinci yöntemde ise qubit (Invitrogen) kullanılarak ölçüm alındı. Qubitte ölçüm alabilmek için gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra okutulacak materyele göre standartları okutulur ardından örnekler içinde boya olan solüsyon ile seyreltilir. DNA' ya bağlanan boyanın ışımaya göre miktar belirlenir. DNA saflığını belirlemek için A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanır. Spektrofotometrik ölçümler sonucu DNA konsantrasyonu aşağıdaki formülüne göre hesaplanır.

$$\text{DNA Miktarı} = 50 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{seyreltme miktarı} = \mu\text{g/mL}$$

2.2.2.10 Restriksiyon Enzimleri ile DNA Kesilmesi

DNA'nın kesilmesi için belirlenen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile önerilen tamponlar kullanılarak ve enzimlerin optimum sıcaklıklarına göre önerilen inkübasyon sürelerinde 30 µl son hacimde kesim yapıldı. İki farklı enzimle aynı anda kesim yapılması gereken koşullarda da iki enzimle aynı anda kesim yapılmasını sağlayan tamponlar kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

2.2.2.11 Kompetan Hücre Hazırlanması

Kompetan hücre hazırlanması için 50 mM kalsiyum klorür kullanıldı. İlk olarak 10 ml LB besiyerine tek koloni *E. coli DH5α* ekim yapılarak 37°C' de çalkalamalı etüvde bir gece inkübasyonu sağlandı. 16 saatin sonunda elde edilen kültürden 100 ml LB sıvı besiyeri içine 100 µl inoküle edilerek, OD₆₀₀ 0,5 ile 0,6

arasına gelinceye kadar çalkalamalı etüvde 37 °C’ de inkübe edildi. Ardından 5000 rpm’ de 5 dakika santrifüj ile hücrelerin çökmesi sağlandı. Pellet 50 ml 50 mM soğuk kalsiyum klorür ile çözüldü ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 10 ml soğuk kalsiyum klorür ile çözüldü ve üzerine 10 ml %40’ lık gliserol eklenerek ependorflara paylaştırıldı. -80°C derin dondurucuda saklandı.

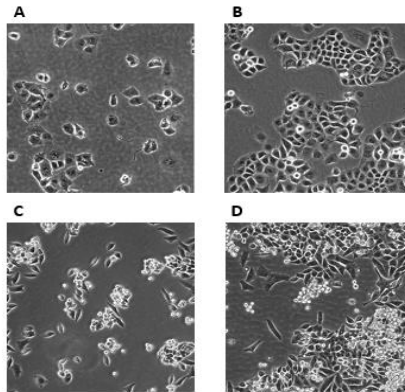
2.2.2.12 Transformasyon

Transformasyon için, 200 µl kompetan hücrenin üzerine 5 µl (1-50 ng arası) plazmit DNA eklenerek buz üzerinde yaklaşık 40 dakika bekletildi. 42 °C ’de 90 saniye ısı şoku uygulandı ve tekrar buz üzerine alındı. Üzerine 800 µl LB sıvı besiyeri ilave edildi ve 37 °C ’de çalkalamalı etüvde bir saat inkübasyonu sağlandı. Süre sonunda kültürden 200 µl alınarak, uygun antibiyotik içeren LB agar besiyerine steril öze ile yayıldı ve bir gece 37 °C’ de inkübe edildi.

2.2.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Teknikler

2.2.3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmanın tamamında pankreas kanseri hücre hattı olan adherent PANC-1 ve MIA-PaCa-2 hücreleri kullanıldı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Çalışmada kullanılan pankreas kanseri hücre hatlarının mikroskop görüntüleri: (A) PANC-1 hücre hattı, düşük yoğunluk. (B) PANC-1 hücre hattı, yüksek yoğunluk. (C) MIA-PaCa-2 hücre hattı, düşük yoğunluk. (D) MIA-PaCa-2 hücre hattı, yüksek yoğunluk.

2.2.3.2 Hücre Soyunun Başlatılması

-80 °C derin dondurucuda muhafaza edilen hücre soylarının büyütülmesi için dondurulmuş hücreler 37 °C sıcaklığındaki su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözümleri gerçekleştirildi. Çözülen hücreler % 10 FCS içeren DMEM medyum içerisine aktarıldı ve 5 dakika boyunca 1000 rpm de santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellet %10 FCS içeren DMEM medyum ile çözüldü. Flasklara uygun miktarlarda koyularak ekim yapıldı. Flasklar etiketlenerek 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.

2.2.3.3 Hücrelerin Büyütülmesi

75 cm² flasklarda, 0,2 mM L-Glutamine ve % 10 FCS içeren 15 ml DMEM medyumunu içerisinde bulunan hücreler belirli aralıklarla pasaj yapılarak büyütüldü.

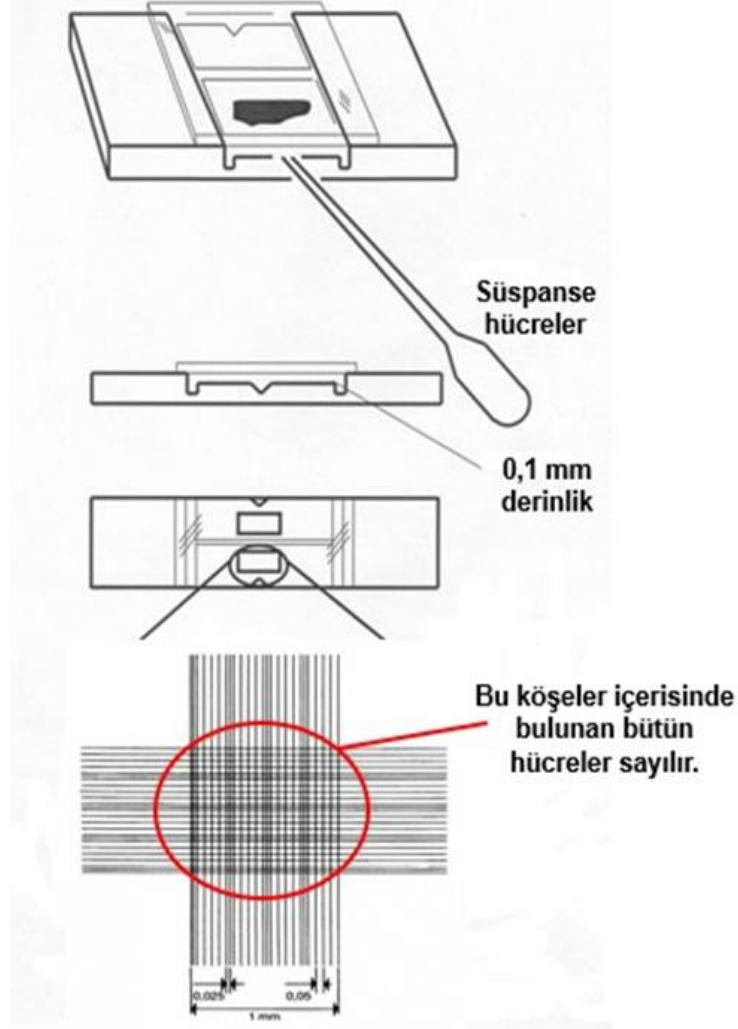
2.2.3.4 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler flask içerisinde kapladıkları alan bakımından % 80-90 oranında doluluğa ulaştıklarında ortamdaki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler steril edilmiş PBS ile yıkandı ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon basamağı gerçekleştirildi. Adherent hücreler yüzeyden kalkınca flasklara medyum ilave edildi. Hücreler falkona alınarak 5 dakika boyunca 1000 rpm' de santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pellet % 10 FCS içeren medyum ile çözüldü ve uygun miktarlarda flasklara paylaştırılarak ekim yapıldı. Flasklar etiketlenerek 37 °C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.

2.2.3.5 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı

Süspansiyon halde bulunan hücrelerin mililitresinde bulunan hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0,1 mm derinliği olan ve böylece toplam hacmin hesaplanabildiği (10⁴) thoma lamı kullanıldı (Şekil 2.6). Ölü hücreleri ayırtedebilmek için eşit miktarlarda hücre süspansiyonu ve trypan mavi boyası (1:1) 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Difüzyon sonucunda

ölen hücreler mavi renk ile boyanırken canlı hücreler içerisine boyayı almadığı için renksiz olarak kaldı. Renksiz olan canlı hücreler sayıldı.



Şekil 2.6: Hücre sayımında kullanılan Thoma lamı.

2.2.3.6 Hücrelerin -80 °C' de Saklanması

Hücreler flask içerisinde buldukları yüzeyi % 80-90 oranında kapladığında ortamdan medyum uzaklaştırıldı. Hücreler steril edilmiş PBS ile yıkandı ve 75 cm² flasklar için 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon basamağı gerçekleştirildi. Hücreler yüzeyden kalkınca medyum eklendi ve falkona alındı. 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet % 10 DMSO

içeren FCS ile dikkatli bir şekilde çözüldü ve cryovial tüplerine konularak etiketlendi. –80 °C derin dondurucuya yerleştirildi.

2.2.4 Hücre Kültüründe Kurulan Deneyler ve Analiz Yöntemleri

2.2.4.1 Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Metoduyla Geçici Transfeksiyon

Kalsiyum-fosfat presipitasyon metodu 6 kuyulu plakada yapıldı. Transfeksiyon uygulamasından 24 saat önce hücreler yaklaşık 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde plakalara yayıldı. Transfeksiyonu gerçekleştirilecek olan DNA ve 2M CaCl_2 bir ependorf içinde karıştırıldı. Karışımın üzerine 2X HEPES ortamda hava kabarcıkları oluşturarak damla damla eklendi. Presipitasyon oluşumu için oda sıcaklığında yarım saat bekletildi. DNA:Kalsiyum-fosfat presipitasyonu oluşuktan sonra karışım pipetaj yapmadan yavaş bir şekilde ve damla damla kuyucuklara ilave edildi. Plaka hafifçe sallanarak karışımın hücreler üzerine dağılması sağlandı. Uygulamadan 6 saat sonra içerisinde transfeksiyon solüsyonu olan medyum uzaklaştırıldı ve hücrelerin bulunduğu kuyulara % 10 FCS içeren DMEM medyum eklendi. 24, 48 ve 72 saat sonunda ortama salınan lüsiferaz ve SEAP aktivitesi alınan medyum kullanılarak ölçüldü.

2.2.4.2 Lüsiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Lüsiferaz ölçümleri, thermo luminoscan kullanılarak yapıldı. 384 kuyulu plaka da belirlenen kuyulara lüsiferaz enzimi içeren hücre medyumlarından 9 μl konuldu. Ardından, luminometre ayarı yapılarak, daha önce hazırlanan 1X substrat/reaksiyon tamponu kuyulara eklendi ve aktivite ölçüldü.

2.2.4.3 SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi

6 kuyulu plakalarda yapılan transfeksiyon sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik SEAP aktivite sonuçlarının okunması için şu yöntem kullanılmıştır: 384 kuyulu plakalara 5 μl hücre medyumunu eklendi. 5X dilüsyon tamponu dH_2O ile 1X' e

seyreltildi. 15 µl 1X dilüsyon tamponu medyumların üzerine ilave edildi. Plaka içine su geçmesini önleyecek şekilde streç film ve alüminyum folyo ile sarılarak 30 dakika boyunca 65 °C su banyosunda bekletildi. Süre sonunda plaka buz üzerine alınarak 2-3 dakika bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına getirildi. Her bir kuyuya 20 µl SEAP substratı eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Süre sonunda luminometre ile ölçüm alındı.

2.2.4.4 Protein ve mRNA Ekspresyon Çalışması Deneylerinin Kurulması

Protein ve RNA deneylerinin kurulması için işlem basamakları şu şekildedir; istenen hücre yoğunluğuna göre 25 cm² lik flask ya da kuyucuklu plakalara hücre ekimi gerçekleştirilerek deney kuruldu. Deney için istenilen saat aralığına ulaşıldığında medyum uzaklaştırıldı ve 500 µl Tripsin-EDTA eklendikten sonra 37 °C’ de etüvde 3 dk bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildikten sonra % 10 FCS içeren DMEM besiyerinden 5 ml eklenerek falkona alındı. 1000 rpm’ de 5 dk santrifüj edilerek üst kısımda kalan medyum dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri -80 °C’ de RNA ve protein izolasyonu için saklandı.

2.2.4.4.1 Sitokin Deneylerinin Kurulması

Hücreler medyum uzaklaştırılarak PBS ile yıkanır tripsin-EDTA uygulanarak kaldırıldı. Canlı hücreleri tespit edebilmek için hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayıldı. Ölü olan hücreler boyayı içine aldıklarından mavi renkte gözüktürler. % 10 FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25 cm² lik flasklara 2.000.000 hücre sayılarak eklendi. Adherent olan hücrelerin yüzeye yapışması için yaklaşık 24 saat beklendi. Yüzeye tutunan hücreler % 0,1 BSA içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi. 16 saat inkübasyondan sonra ilgili sitokinler uygulandı. Sitokin uygulamasının ardından belirlenen saat aralıklarına ulaşıldığında her flask çöktürülerek RNA ve protein için ayrı ayrı alınan hcre pelletleri -80 °C’ ye kaldırıldı.

2.2.4.4.2 İnhibitör Deneylerinin Kurulması

Hücreler medyum uzaklaştırılarak PBS ile yıkanır tripsin-EDTA uygulanarak kaldırıldı. Canlı hücreleri tespit edebilmek için tripan mavisi ile boyanarak sayıldı. Ölü olan hücreler boyayı içine alarak mavi renkte gözükürler. %10 FCS içeren DMEM besiyeri kullanılarak 25 cm² lik flasklara 2.000.000 hücre sayılarak eklendi. Adherent olan hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklendi. Ardından uygun görülen konsantrasyonlarda inhibitör uygulaması yapıldı. Eğer inhibisyon deneyinde sitokin uygulaması da yapılacaksa % 0,1 BSA içeren DMEM besiyeri ile değiştirildi. 24 saat sonra inhibitörlerin uygulaması uygun görülen konsantrasyonlarda yapıldı. Bir saatin sonunda sitokin uygulaması gerçekleştirildi. 6 saat muamelenin sonunda her flask çöktürülerek, RNA ve protein için ayrı ayrı alınan hücre pelletleri -80 °C' ye kaldırıldı.

2.2.5 RNA ile İlgili Teknikler

2.2.5.1 RNA İzolasyonu

Hücre kültüründe elde edilen hücre pelletlerinden ticari kit (Fermentas) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Firmanın önerdiği prosedür uygulandı.

2.2.5.2 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

RNA izole edildikten sonra miktarının ve saflığının belirlenmesi için Qubit (Invitrogen) ve spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapıldı. Qubit kullanılarak yapılan ölçümde ilk olarak boya içeren çalışma solüsyonu hazırlandı ve RNA standartları oluşturuldu. Ardından RNA örneklerine bağlanan boyanın ışımaya göre RNA'ların miktarları belirlendi. Spektrofotometrik ölçümde ise RNA dH₂O ile 40 kat sulandırıldı ve kvartz küvet kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında absorbans değerleri alındı. Spektrofotometrik ölçümler sonucu RNA miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı} = 40 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL RNA}$$

$$\text{RNA saflığı} = A_{260}/A_{280}$$

2.2.5.3 cDNA Sentezi

cDNA sentezi için tüpe öncelikle 12,5 µl son hacimde, 1 µg/mL RNA kalıbı, 200 pmol Anchored Oligo (dT)23 primer eklenir ve 65 °C' de 5 dk ön inkübasyona bırakıldı. Reaksiyona son konsantrasyonları 10U Revert Aid Reverse Transkriptaz enzimi, 1X Reaksiyon Tamponu, 20U/µl RNaz inhibitörü ve 1 mM dNTP karışımı eklenerek 20 µl' ye tamamlandı. Reaksiyon PZR makinesine konularak 37 °C' de 60 dk ve 70 °C' de 10 dk programı ayarlandı. Elde edilen cDNA -20 °C' de saklandı.

2.2.5.4 İnsan Beta 2 Mikroglobulin Primerleri ile RNA' nın PZR ile Kontrol Edilmesi

Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak cDNA' ların kontrolü ve miktarının optimizasyonu yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullandığımız insan beta 2 mikroglobulin primerlerinden son konsantrasyonu 2 µM olacak şekilde bölüm 2.2.2.3' de belirtildiği gibi PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. PZR sonuçları agaroz jelde görüntülendi ve elde edilen bantların istenilen büyüklükte olup olmadığı tespit edildi.

2.2.5.5 Gerçek Zamanlı PZR

Gerçek Zamanlı PZR çalışmaları her bir kuyuda son hacim 10 µl olacak şekilde yapıldı. 1 µl cDNA, 5 µl SYBR® Green PZR Master Mix, 100 ng/µl' lik primer stoklarından 0,5' er µl forward ve reverse primerleri ve 3 µl dH₂O kullanılarak tablo 2.9' da belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. Kullanılan primerlerin dizileri tablo 2.8' de gösterilmiştir. Sonuçlar CT değerine göre değerlendirildi. Buna göre her bir cDNA en az iki tekrarlı olarak ilgili gen ve internal kontrol için çalışıldı. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. İnternal kontrol genin Ct ortalamasından, ilgili genin Ct ortalaması çıkarıldı. Daha sonra elde edilen değer in kuvveti alındı. Elde edilen kontrol grubu kendine bölündü ve 1 sayısı elde edildi. Daha sonra ilgili saatte çalışılan deney sonucu kontrol değerine bölündü ve 1' in katı şeklinde sonuçlar elde edildi.

Tablo 2.8: Gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere tasarlanan spesifik primerlerin dizisi.

Primer	Ürün	Tm (°C)	Dizi
TSPAN8-Forward	139 bç	63 °C	TCTATGGTCCTGTATTGCCAGATC
TSPAN8-Reverse		65 °C	GACAGCTGCTCCTGACTTATATAGC
İnsan-β-2-mikroglobulin-Forward	313 bç	55 °C	TTTCTGGCCTGGAGGCTATC
İnsan-β-2-mikroglobulin-Reverse		55 °C	CATGTCTCCATCCCCTTAACT

Tablo 2.9: Gerçek Zamanlı PZR koşulları.

Basamaklar	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön ısıtma	1	95 °C	10 dakika
Çoğaltma	40	95 °C	10 saniye
		51°C	10 saniye
		72 °C	10 saniye
Erime ısısı	1	95 °C	5 saniye
		65 °C	1 dakika
		97 °C	-
Soğutma	1	40 °C	30 saniye

2.2.6 Protein ile ilgili Teknikler

2.2.6.1 Protein İzolasyonu

Hücre kültüründe protein çalışmaları için kurulan deneyin ardından elde edilen hücre pelleti 200 µl Ripa tamponu ile pipetaj yapılarak çözüldü. Daha sonra 30 ile 40

10 dakika arasında ependorflar buz üzerinde bekletildi. Hücrelerin daha iyi lizis olabilmeleri için bekleme aşamasında bir kez daha pipetaj yapıldı. Süre sonunda 12.000 rpm'de +4 °C santrifüj kullanılarak 10 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Ardından ependorf içerisinde üstte kalan kısım steril ependorflara alınarak etiketlendi. Protein örnekleri -80 °C' de muhafaza edildi.

2.2.6.2 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Qubit (İnvitrogen) kullanılarak ölçüm alındı. İlk olarak örnek sayısına göre hesaplanarak, Qubit protein tamponu ve Qubit protein boyası ile istenilen miktarda çalışma solüsyonu hazırlandı. Qubit protein standartları, 190 µl çalışma solüsyonu ve 10 µl standart olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 199 µl çalışma solüsyonu ve 1 µl örnek olacak şekilde hazırlandı. 2-3 saniye vorteks yapıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra Qubit ile ölçüm yapılarak protein miktarı belirlendi.

2.2.6.3 SDS Page

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su ve %70 etanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli bölüm 2.1.5.1' de belirtilen şekilde hazırlanarak, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü ve üzerine %90 izopropanol ilave edildi. Jelin polimerizasyonu için 30-40 dakika beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı. Üzerine yığma jeli bölüm 2.1.5.1' de belirtildiği gibi hazırlanarak ilave edildi ve örneklerin yükleneceği kuyuları oluşturabilmek için tarak yerleştirildi. Daha sonra hazırlanan jeller örneklerin yürütüleceği tankın içerisine yerleştirildi. Örneklerin yüklenmesi protein ekstraksiyonu Ripa tamponu ile yapıldığı için örnekler protein miktarları belirlendikten sonra yaklaşık 20-40 ng olacak şekilde upper buffer ve bromofenol mavisi ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi ve ilk kuyuya 5 µl protein büyüklük belirteci (Fermentas) yüklendi. Jelin yürütülmesi, 0,1 (w/v) SDS içeren 1X Running Buffer ile doldurulan tank içerisinde her jele 0,4 A gelecek şekilde yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

2.2.6.4 Western Blot

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra SDS jeldeki örneklerin PVDF membrana transferi için hazırlık işlemleri gerçekleştirildi. Transfer kasedi içerisinde sırasıyla sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde sandviç modeli oluşturularak hazırlandı. Bu aşamada her bir katman arasında oluşan hava kabarcıklarını ortadan kaldırmaya özen gösterildi. Ardından hazırlanan kaset, blot tankına yerleştirildi ve tank transfer buffer ile dolduruldu. 15 volt akımda bir gece transfer işlemi gerçekleştirildi. Transferi gerçekleşen proteinlerin bulunduğu PVDF membran ilk olarak 20 ml bloklama çözeltisi (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve % 0.1 (v/v) Tween-20 içeren 1X TBS) ile muamele edildi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldı. Bloklama işleminin ardından membran 3 kez 5'er dakika boyunca % 0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran ilgili antikorun talimatlarına göre uygun saat aralığında ve sıcaklık koşullarında primer antikor ile muamele edildi. Primer antikorun ardından yine 3 kez 5'er dakika boyunca yıkama yapıldı ve oda sıcaklığında 1 saat sekonder antikor ile inkübe edildi. Tekrar yıkamalar gerçekleştirildi. Membranlar 1-2 dakika ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edildi. ECL substratı Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1,5 ml alınarak hazırlandı ve membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı.

3. BULGULAR

3.1 Biyoinformatik Çalışmalar

NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri bankası kullanılarak NC_000012.12 erişim numaralı kromozom 12 üzerinde TSPAN8 geninin başlangıç noktası belirlendi (Şekil 3.1). Ardından promotor bölgesinin moleküler analizi çalışmalarında kullanılmak üzere genin transkripsiyonel başlangıç noktasından ileriye doğru 40 nükleotit (+41), geriye doğru ise 1540 nükleotit (-1540) içeren bölge promotor bölgesi [-1540 /+ 41] olarak belirlendi. Promotor bölgesi olarak belirlenen dizi Ökaryotik Promotor Veritabanında (EPD: Eukaryotic Promoter Database) taranarak kontrol edildi (Şekil 3.2).

TSPAN8	1	AGTGCCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCCTGGAGATAGCCTTTGCGAT	60
Kromozom 12	71521249	AGTGCCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCCTGGAGATAGCCTTTGCGAT	71521190
TSPAN8	61	ATTTAAATGT	70
Kromozom 12	71521189	ATTTAAATGT	71521180
TSPAN8	71	CCGTGGATACAGAAATCTCTGCAGGCAAGTTGCTCCAGAGCATATTGCAGGACAAGCCTG	130
Kromozom 12	71157787	CCGTGGATACAGAAATCTCTGCAGGCAAGTTGCTCCAGAGCATATTGCAGGACAAGCCTG	71157728
TSPAN8	131	TAACGAATAGTTAAATTCACGGCATCTGGATTCTAATCCTTTCCGAAATGGCAGGTGT	190
Kromozom 12	71157727	TAACGAATAGTTAAATTCACGGCATCTGGATTCTAATCCTTTCCGAAATGGCAGGTGT	71157668
TSPAN8	191	GAGTGCCTGTATAAAATATTCTATGTTTACCTTCAACTTCTTGTCTGGCTATGTG	246
Kromozom 12	71157667	GAGTGCCTGTATAAAATATTCTATGTTTACCTTCAACTTCTTGTCTGGCTAAGTG	71157612
TSPAN8	239	GCTATGTGGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAGTAAGCAATGACTCTCA	298
Kromozom 12	71144214	GCTATGTGGTATCTTGATCCTAGCATTAGCAATATGGGTACGAGTAAGCAATGACTCTCA	71144155

Şekil 3.1: TSPAN8 mRNA dizisi ile insan kromozom 12 dizisinin karşılaştırılması.

TSPAN8	299	AGCA 302	
Kromozom 12	71144154	AGCA 71144151	
TSPAN8	303	ATTTTGGTTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCCTACGTTGCTGTGGACATATTGATTGCT	362
Kromozom 12	71139848	ATTTTGGTTCTGAAGATGTAGGCTCTAGCTCCTACGTTGCTGTGGACATATTGATTGCT	71139789
TSPAN8	363	GTAGGTGCCATCATCATGATTCTGGGCTTCCTGGGATGCTGCGGTGCTATAAAAGAAAGT	422
Kromozom 12	71139788	GTAGGTGCCATCATCATGATTCTGGGCTTCCTGGGATGCTGCGGTGCTATAAAAGAAAGT	71139729
TSPAN8	423	CGCTGCATGCTTCTGTTG 440	
Kromozom 12	71139728	CGCTGCATGCTTCTGTTG 71139711	
TSPAN8	440	GTTTTTCATAGGCTTGCTTCTGATCCTGCTCCTGCAGGTGGCGACAGGTATCCTAGGAGC	499
Kromozom 12	71138231	GTTTTTCATAGGCTTGCTTCTGATCCTGCTCCTGCAGGTGGCGACAGGTATCCTAGGAGC	71138172
TSPAN8	500	TGTTTTCAAATCTAAG 515	
Kromozom 12	71138171	TGTTTTCAAATCTAAG 71138156	
TSPAN8	502	TTTTCAAATCTAAGTCTGATCGCATTGTGAATGAACTCTCTATGAAAACACAAAGCTTT	561
Kromozom 12	71138074	TTTTCAATTTTCAGTCTGATCGCATTGTGAATGAACTCTCTATGAAAACACAAAGCTTT	71138015
TSPAN8	562	TGAGCGCCACAGGGGAAAGTAAAAACAATCCAGGAAGCCATAAATTGTGTTCAAGAAG	621
Kromozom 12	71138014	TGAGCGCCACAGGGGAAAGTAAAAACAATCCAGGAAGCCATAAATTGTGTTCAAGAAG	71137955
TSPAN8	622	AG 623	
Kromozom 12	71137954	AG 71137953	
TSPAN8	622	AGTTTAAATGCTGCGGTTTGGTCAATGGAGCTGCTGATTGGGAAATAATTTCAACACT	681
Kromozom 12	71132826	AGTTTAAATGCTGCGGTTTGGTCAATGGAGCTGCTGATTGGGAAATAATTTCAACACT	71132767
TSPAN8	682	ATCCTGAATTATGTGCTGTCTAGATAAGCAGAGACCATGCCAAAGCTATAATGGAAAAC	741
Kromozom 12	71132766	ATCCTGAATTATGTGCTGTCTAGATAAGCAGAGACCATGCCAAAGCTATAATGGAAAAC	71132707

Şekil 3.1: (devam)

TSPAN8	742	AAGTTTACAAAGAG	755	
Kromozom 12	71132706	AAGTTTACAAAGAG	71132693	
TSPAN8	754	AGACCTGTATTCTTTCATAAAAGACTTCTGGCAAAAAATTTGATTATAGTTATTGGAA	813	
Kromozom 12	71129416	AGACCTGTATTCTTTCATAAAAGACTTCTGGCAAAAAATTTGATTATAGTTATTGGAA	71129357	
TSPAN8	814	TATCATTGGACTGGCAGTTATTGAGATAC	843	
Kromozom 12	71129356	TATCATTGGACTGGCAGTTATTGAGGTAC	71129327	
TSPAN8	838	AGATACTGGGTTTGGTGTCTTCTATGGTCTGTATTGCCAGATCGGGAACAAATGAATCT	897	
Kromozom 12	71125389	AGATACTGGGTTTGGTGTCTTCTATGGTCTGTATTGCCAGATCGGGAACAAATGAATCT	71125330	
TSPAN8	898	GTGGATGCATCAACCTATCGTCAGTCAAACCCCTTTAAAATGTTGCTTTGGCTTTGTAAA	957	
Kromozom 12	71125329	GTGGATGCATCAACCTATCGTCAGTCAAACCCCTTTAAAATGTTGCTTTGGCTTTGTAAA	71125270	
TSPAN8	958	TTTAAATATGTAAGTGCTATATAAGTCAGGAGCAGCTGTCTTTTAAAATGTCTCGGCTA	1017	
Kromozom 12	71125269	TTTAAATATGTAAGTGCTATATAAGTCAGGAGCAGCTGTCTTTTAAAATGTCTCGGCTA	71125210	
TSPAN8	1018	GCTAGACCACAGATATCTTCTAGACATATTGAACACATTTAAGATTTGAGGGATATAAGG	1077	
Kromozom 12	71125209	GCTAGACCACAGATATCTTCTAGACATATTGAACACATTTAAGATTTGAGGGATATAAGG	71125150	
TSPAN8	1078	GAAAATGATATGAATGTGTATTTTACTCAAATAAAAAGTAACTGTTTACGTT	1130	
Kromozom 12	71125149	GAAAATGATATGAATGTGTATTTTACTCAAATAAAAAGTAACTGTTTACGTT	71125097	

Şekil 3.1: (devam)



EPD

EUKARYOTIC PROMOTER DATABASE

Get sequence TSPAN8_1 from to bp relative to TSS

```
>FP014389 TSPAN8_1 :+U EU:NC; range -1540 to 40.
TGAATTAGACTAGGGGTTCTATTACACAGTCATTCTCCTGTACAAACACATCCATTGATT
TTTGTGTTACAGAGTTCAAGAGTGATTCAACTAAAGACTACACAGTATTCTTTTAAAGGA
TGTTCAGCATCCACCAAATATCTATTTCAAATAAAATTTGGTAGTATTCAATACATT
TTTTCAACAAAGCAGCATTAAATCTGTAATTTTTTTTTAATTTTAGCCTCTGATAAATA
ATCATTTCGGGACTATGAATCAATTTTGGTTTTCAATCTGAAATTATTCTTTTCAG
CCTTGGATTATTCTATATACAAAATATCTCAATAGAAGGTTGTGAAACTATCCATTTTCT
AGTAGGAAAGAGAACAACAACAATTTTAGTGATGATTTATATATTAAGCCATTATTTTTG
GAATTAATCCTAAATTTGGCCTTTAACGCTATATATTATTGTTGATAATGCATTAAAATA
TATTGTATTGTAGTCAGGGAGTAGAATTGTTTCAAAAACATTGTATGCCAGTGAAAATT
AGAAATAATATTTTTCTTTTGTAAAGGAGTTCATGCTTGTCTATCGTGAAAACCTTAGCAA
AGATTCTAAAGAATAATTTTTCTCAACAACCTTTTAAAGTAGAGGGTTCTTTTATTTAGGG
GGAGAAGAACTCCCTTTGAGAGGCAGGATGTGGAAACTAACATGACCCAGGCTGTTTACA
CAAAGCAGTCCACACCTCCCTGATGATGTCGGAGCATTTTGCCTTTACCTGAGACAGCTG
CCTTCTATTAGCACTAGAAACAAATAGTAAATCTATGGTCACTGATCCATGACCACCTT
CCCATTTTGAATTTTTTTGTCCGGGAGGACCTGGAATCCAGAACTGAGTTGGTGGAGAA
CAGCTGTTGTAGATACAATTTATCAGAGGAAGGAAATTACAGTGTCCACCTTAAAAACA
AACCAAGCTATCAGAATGACTACGCATTATAAAAATGAAAACAATGTTGCAGTCAGTGCCA
CTTTATGATTTCTTTCCCTTTGTATCATAAAGAAATAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTA
TCATGATAGGCAAGGCTGCCTCTCCCTCTGCAATTTCTGTGGTGTATTTACGGCAGCTCT
GGAATTCCTTTGAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAATGGTATTTT
ACTATTCTAGGTTTAAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGCTTTGATATTTTGCAGATTT
CTAAATGCATTTTATTGCATTTAGAAGGAATTTTGTAGTATTGAGAAAATGCAATGCAAAA
AATGAGTAGAGATACAATGTCCATTTAACTCAGAACAACAACCTTATTTCCCATAGT
TGAAATGGAGGGCGGGGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAGAACTTAGTAGCACT
GTGCCATTCTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGTTTACTTTAGA
GGAGGCAGTTTTTGGAAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAGTGCCCCAGGAGCTATGAC
AAGCAAAGGAACATACTTGCC
```

Şekil 3.2: 1581 [-1540 /+ 41] bç TSPAN8 promotor bölgesi.

Daha sonra bu dizi TRANSFAC (TRANSCRIPTION FACTOR DATABASE) kullanılarak analiz edildi. Bu analiz sonucunda şekil 3.3’ de gösterilen muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri belirlendi.

- 1540 TGAATTAGACTAGGGTTCTATTACACAGTCATTCTCCTGTACAAACACATCCATTGATTT - 1478

- 1479 TTGTGTTACAGAGTTCAAGAGTGATTCAACTAAAGACTACACAGTATTCTTTTTAAGGATG - 1419

- 1418 TTCAGCATCCACCAAAATATCTATTTCAAACAAAATTTGGTAGTATTCAATACATTCTTTT - 1357

- 1356 CAACAAAGCAGCATTAAATCTGTAATTTTTTTTTAATTTAGCCTCTGATAAAATAATCATT - 1294

- 1293 CTGGGACTATGAATCAATTTTGGTTTTTCATTCAATCTGAAATTATTCTTTCAGCCTTGGATTA - 1231

- 1230 TTCTATATACAAAATATCTCAATAGAAGGTTGTGAAACTATCCATTTTCTAGTAGGAAAGAG - 1169

- 1168 AACACAAACAATTTTAGTGATGATTTATATATTAAGCCATTATTTTGGAAATTAATCCTAAAT - 1106

- 1105 TTGGCCTTAAACGCTATATATTATTGTTGATAATGCATTAATAATATTGTATTGTAGTCAG - 1043

- 1042 GGAGTAGAATTGTTTCAAAAACATTGTATGCCAGTGAAAATTAGAAATAATTTTTCTTTT - 981

- 980 GTAAGGAGTTCATGCTTGCTTATCGTGTAAACTTAGCAAAGATTCTAAAGAATAATTTTCT - 919

- 918 CAACAACCTTTTAAAGTAGAGGGTCTTTTATTTAGGGGGAGAAGAACTCCCTTTGAGAGG - 858

- 857 CAGGATGTGGAACTAACATGACCCAGGCTGTTTACACAAAGCAGTCCACACCTCCCTGAT - 797

- 796 GATGTCCGAGCATTTCCTTTACCTGAGACAGCTGCCTTCTATTAGCACTAGAAACAAATA - 735

- 734 GTAAAATCTATGGTCACTGATCCATGACCACCTCCCATTTTGAATTTTTTGCCGGGAGGA - 672

- 671 CCTGGAATCCAGAACTGAGTTGGTGGGAGAACAGCTGTTGCTAGATACAATTTATCAGAGG - 611

- 610 AAGGAAATTACAGTGCCACCTTAAAAACAAACCAAGCTATCAGAATGACTACGCATTATAA - 549

- 548 AATGAAAACAATGTTGCAGTCAGTGCCACTTTATGATTTCTTCCCTTTGTATCATAAAGAAA - 486

- 485 TAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTATCATGATAGGCAAGGCTGCCTCTCCCTCTGCAATTC - 424

- 423 TGTGGTGTATTTACGGCAGCTCTGGAATCTTTTGAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCA - 362

- 361 GATACATGTAATGGTTATTTACTATTCTAGGTTAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGC - 300

- 299 TTTGATATTTGTCAGATTTCTAAATGCATTTTATTGCATTTAGAAGGAATTTGTAGTATTGA - 237

- 236 GAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTCCATTTAACTCAGAACAAAACAACC - 176

- 175 TTATTTCCCATAGTTGAAATGGAGGGCGGGGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAG - 115

- 114 AACTTAGTAGCACTGTGCCATTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGT - 51

- 50 TTACTTTAGAGGAGGCAGTTTTTGGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAAGTGCCCAAGGA + 12

+ 13 GCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC + 41

Şekil 3.3: İnsan TSPAN8 promotöründe yer alan olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi +1 (A) kırmızı, translasyonel başlangıç kodunu ATG ise yeşil renk ile yazılarak belirtilmiştir.

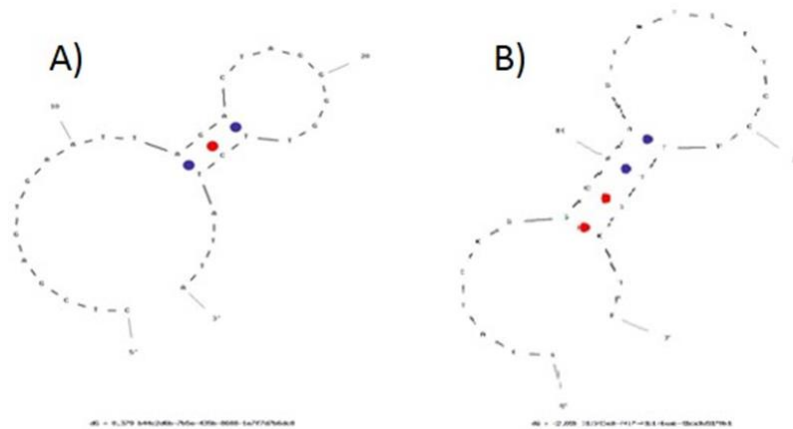
3.2 Primer Tasarımı

Primer tasarımı için öncelikle TSPAN8 promotorunun biyoinformatik olarak restriksiyon haritalaması yapıldı. Promotoru kesen ve kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlendi. Promotor diziyi kesmeyen restriksiyon enzimlerinin pMeT-Luc vektörünün klonlama bölgesindeki enzimler ile uyum gösterip göstermediği kontrol edildi. XhoI ve BamHI enzimlerinin hem promotor bölgeyi kesmediği hem de vektörün klonlama bölgesinde bulunduğu görüldü. Sonuç olarak XhoI ve BamHI enzime spesifik diziler primer dizilerine eklendi.

Promotor dizinin doğru yönde klonlanabilmesi için, XhoI kesim bölgesi forward primerlerde, BamHI kesim bölgesi reverse primerde kullanıldı (Tablo 3.1). Bunun dışında tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasına ve T_m sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına özen gösterildi.

Tablo 3.1: Tasarlanan primerlerin dizisi, T_m değeri ve uzunlukları.

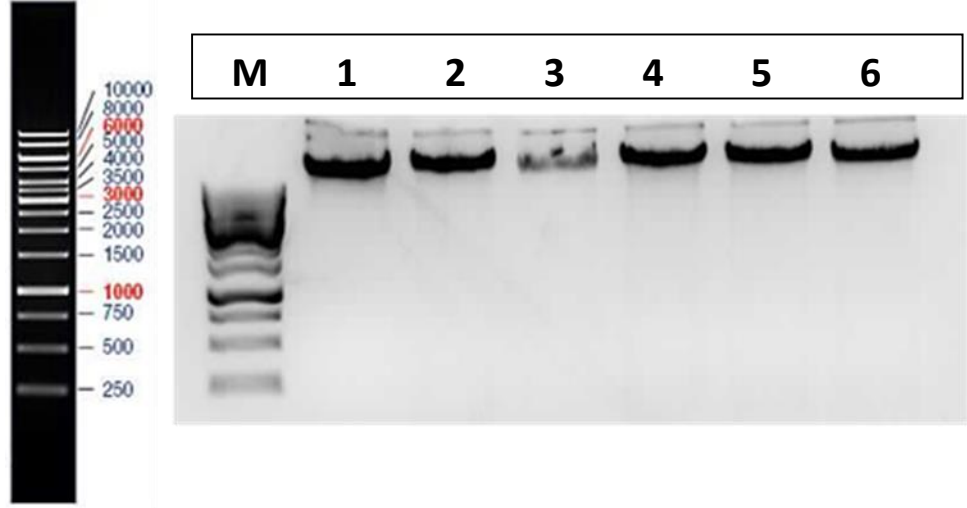
Primer	Uzunluk (bç)	T_m (°C)	Dizi
TSPAN8 Forward	29 bç	68 °C	<u>CTCGAGTGAATTAGACTAGGGGTTCTTTA</u> XhoI Kesim Bölgesi
TSPAN8 Reverse	27 bç	68,3°C	<u>GGATCCGGCAAGTATGTTCCCTTGCTT</u> BamHI Kesim Bölgesi



Şekil 3.4: TSPAN8 promotor primerlerinin saç tokası oluşturma potansiyelleri (A) Forward Primer (B) Reverse Primer.

3.3 Genomik DNA İzolasyonu

TSPAN8 geninin promotor bölgesinin klonlanması için ilk olarak kandan genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen genomik DNA % 0,8' lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Genomik DNA jel görüntüsü.

3.3.1 TSPAN8 Promotorunun Genomik DNA'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) ile Çoğaltılması

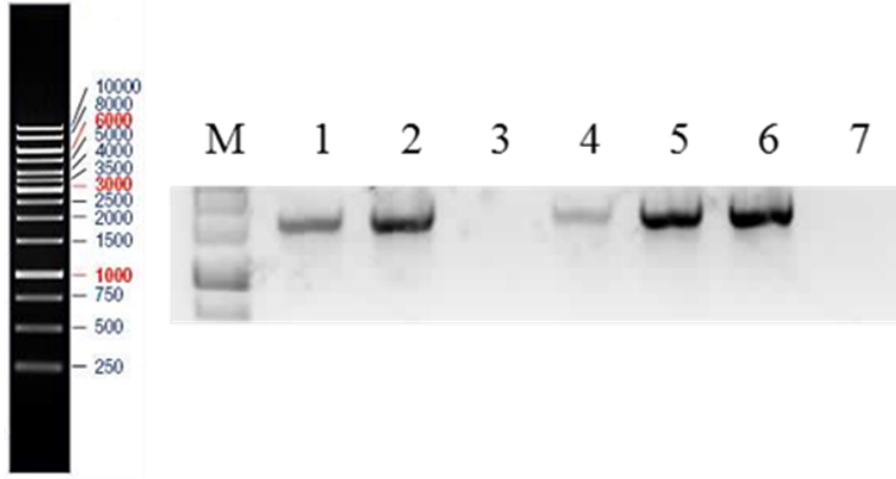
Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) reaksiyonları bölüm 2.2.2.3' de belirtildiği şekilde 50 µl hacimde yapıldı. Buna göre TSPAN8 promotorunun çoğaltılması için en uygun koşulların saptanabilmesi amacı ile MgCl₂ konsantrasyonu ve kalıp DNA miktarı değiştirilerek PZR optimizasyonu yapıldı. Tampon, distile su, dNTP karışımı, forward primer, reverse primer ve Taq DNA polimeraz miktarları sabit tutularak Tablo 3.2' deki PZR koşulları kullanıldı. PZR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 1581 [-1540 /+ 41] bp' lik TSPAN8 promotoruna ait amplifiye edilen bölge UVP Görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.6' da görüldüğü gibi 3 numaralı örnek dışında diğer tüm örneklerde tek bir bant gözlemlendi ve TSPAN8 promotoru elde edildi.

Tablo 3.2: TSPAN8 promotorunun çoğaltılması için PZR koşulları.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 °C	10 saniye
2	35	95 °C	1 dakika
		63 °C	45 saniye
		72 °C	100 saniye
3	1	72 °C	10 dakika

Tablo 3.3: TSPAN8 promotorunun çoğaltılması için PZR içerikleri.

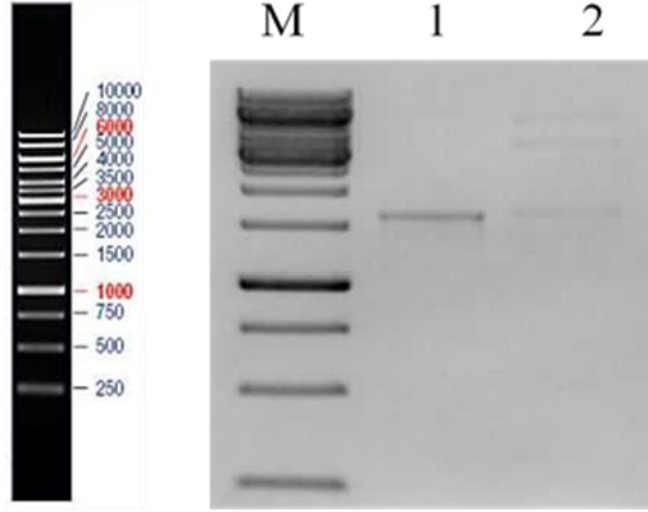
Tüp içeriği	1.tüp	Pozitif Kontrol (HB2)	Negatif Kontrol
gDNA	1 µl	2 µl	-
MgCl ₂	4 µl	4 µl	4 µl
Taq Tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP	1 µl	1 µl	1 µl
Forward Primer	1 µl	1 µl	1 µl
Reverse Primer	1 µl	1 µl	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
dH ₂ O	36,5 µl	35,5 µl	37,5 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl	50 µl



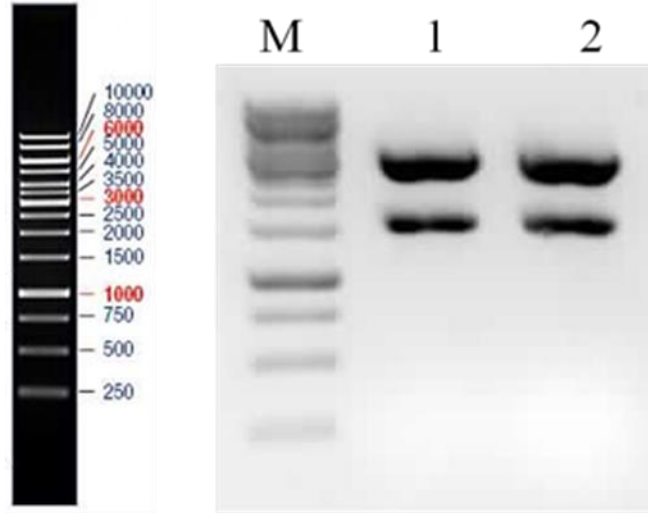
Şekil 3.6: PZR reaksiyonu sonucu jel görüntüsü M- 1 kb marker 1- 1 µl DNA- 1 mM MgCl₂, 2- 1 µl DNA-2 mM MgCl₂, 3- 1 µl DNA-3 mM MgCl₂ 4- 2 µl DNA-1 mM MgCl₂, 5- 2 µl DNA-2 mM MgCl₂, 6- 2 µl DNA-3 mM MgCl₂ 7- Negatif Kontrol.

3.3.2 TSPAN8 Promotorunun pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması ve *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

PZR ile çoğaltılan promotor bölge T:A klonlama stratejisi ile pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) kullanılarak klonlandı. Öncelikle PZR sonucu oluşan bantlar bölüm 2.2.2.5' de belirtildiği gibi agaroz jelden geri kazanılarak klonlanmaya hazır hale getirildi. Daha sonra üretici firma protokolüne göre pGEM-T Easy vektörü ve jelden kazanılan TSPAN8 promotoru bir gece +4 °C' de ligasyona bırakıldı. Ligasyon işleminin ardından ligasyon ürünü ve jelden geri kazanılan DNA agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.7). Ligasyon ürünü bölüm 2.2.2.12' de belirtildiği şekilde *E. coli* XLI-Blue kompetan hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB Agarlı petrilere mavi-beyaz koloni seçilebilmesi için X-Gal ve IPTG yayıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. Beyaz kolonilerden seçilerek LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Bölüm 2.2.2.7' de belirtildiği şekilde GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitler XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilerek rekombinant olup olmadıkları kontrol edildi. Kesim sonuçları %1' lik agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.8' de görüldüğü gibi seçilen 2 kolonide bulunan vektörlerin her biri rekombinanttır ve TSPAN8 promotor bölgesini içermektedir.



Şekil 3.7: 1581 bç insert (1) ve ligasyon ürünü (2).

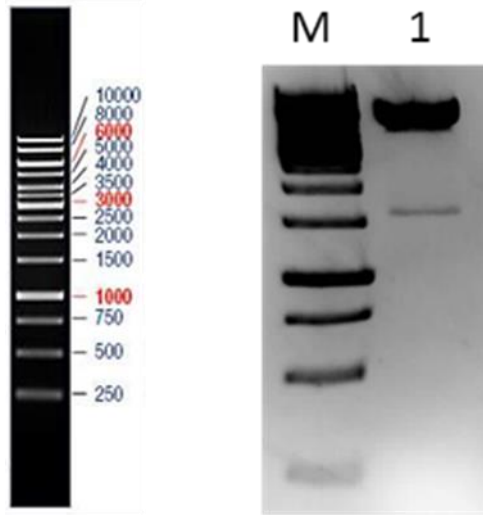


Şekil 3.8: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan TSPAN8 promotorunun kontrol kesim sonucu görüntüsü M- 1 kb marker 1- 1. koloni 2- 2. koloni.

3.3.3 TSPAN8 Promotorunun pMET-LuC Lusiferaz Haberci Vektörüne Klonlanması ve *E. coli*'ye Transformasyonu

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan TSPAN8 promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMET-LuC lüsiferaz haberci vektörüne alt klonlama ile aktarıldı (Şekil 2.2). Klonlama için öncelikle Şekil 3.8' de görülen kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Aynı şekilde pMET-LuC vektörü de XhoI ve BamHI enzimleriyle kesilerek agaroz jelde yürütüldü ve kesilen vektör jelden geri

kazandı. Jelden geri kazanılan pMET-Luc vektörü ve TSPAN8 promotörü bir gece +4 °C’ de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürününün *E. coli XLI-Blue* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon yapılmış bakterilerin seçimi için Kanamisin içeren LB agarlı petrilere ekim yapıldı ve 37 °C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. Üreyen kolonilerden bir tanesi seçilerek kanamisin içeren LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapılarak hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmit DNA XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol yapıldı. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütüldü ve görüntüledi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: pMET-LuC vektörüne klonlanan TSPAN8 promotörünün kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M- 1kb marker 1- 1. koloni.

3.3.4 Otomatik Dizi Analizi

Klonlanan 1581 bp insan TSPAN8 promotor parçasının dizisinin kontrol edilmesi amacıyla Triogene, İstanbul’ a dizilemeye gönderildi. Elde edilen dizileme sonuçları biyoinformatik olarak NCBI’ da analiz edildi ve NC_000012.12 erişim numaralı DNA veri bankasındaki TSPAN8 genini ve promotor bölgesini içeren kromozom 12 ile karşılaştırıldı. Şekilde gösterildiği gibi dizileme sonucu ve NCBI veri bankasındaki dizi karşılaştırıldığında her bir nükleotit eşleşmiştir (Şekil 3.10). Dizi analizi ile TSPAN8 genine ait promotorun doğru bir şekilde klonlandığı gösterilmiştir.

TSPAN8	-1540	TGAATTAGACTAGGGGTTCTATTACACAGTCATTCTCCTGTACAAACACA	-1491
GRCh38 .p7	71159539	TGAATTAGACTAGGGGTTCTATTACACAGTCATTCTCCTGTACAAACACA	71159490
TSPAN8	-1490	TCCAT TGATT TTTGT GTTACAGAGT TCAAGAGT GATTCAACTAAAGACTA	-1441
GRCh38 .p7	71159489	TCCAT TGATT TTTGT GTTACAGAGT TCAAGAGT GATTCAACTAAAGACTA	71159440
TSPAN8	-1440	CACAGTATTC TTTTTAAGGATGTT CAGCATCCACC AAAATATCTATT TCA	-1391
GRCh38 .p7	71159439	CACAGTATTC TTTTTAAGGATGTT CAGCATCCACC AAAATATCTATT TCA	71159390
TSPAN8	-1390	AACTAAAATTGGTAGTATTCAATACATTCTTTTCAACAAAGCAGCATT	-1341
GRCh38 .p7	71159389	AACTAAAATTGGTAGTATTCAATACATTCTTTTCAACAAAGCAGCATT	71159340
TSPAN8	-1340	AAATCTGTAA TTTTT TTTAATTTTAGCCTCTGATAAATAATCATTTCTG	-1291
GRCh38 .p7	71159339	AAATCTGTAA TTTTT TTTAATTTTAGCCTCTGATAAATAATCATTTCTG	71159290
TSPAN8	-1290	GGACTATGAATCAAT TTTGGTTTCATTCAATCTGAAATTATTCTTTCAG	-1241
GRCh38 .p7	71159289	GGACTATGAATCAAT TTTGGTTTCATTCAATCTGAAATTATTCTTTCAG	71159240
TSPAN8	-1240	CCTTGATTATTCTATATACAAAATATCTCAATAGAAGGTGTGAAACTA	-1191
GRCh38 .p7	71159239	CCTTGATTATTCTATATACAAAATATCTCAATAGAAGGTGTGAAACTA	71159190
TSPAN8	-1190	TCCAT TTTCTAGTAGGAAAGAGAACACAAA CAATTTAGTGATGATTAT	-1141
GRCh38 .p7	71159189	TCCAT TTTCTAGTAGGAAAGAGAACACAAA CAATTTAGTGATGATTAT	71159140
TSPAN8	-1140	ATATT AAGCATTAT TTTTGAATTAATCC TAAATTTGGCCTTTAACGCT	-1091
GRCh38 .p7	71159139	ATATT AAGCATTAT TTTTGAATTAATCC TAAATTTGGCCTTTAACGCT	71159090
TSPAN8	-1090	ATATA TTATTGTTGATAATGCATTAAAATA TATTGTATTTGTAGTCAGGG	-1041
GRCh38 .p7	71159089	ATATA TTATTGTTGATAATGCATTAAAATA TATTGTATTTGTAGTCAGGG	71159040
TSPAN8	-1040	AGTAGAATTGTTTCAAAAACATTGTATGCCAGTAAAATTAGAAAATAATA	-991
GRCh38 .p7	71159039	AGTAGAATTGTTTCAAAAACATTGTATGCCAGTAAAATTAGAAAATAATA	71158990

Şekil 3.10: Klonlanan 1581 bç promotor bölgesinin dizi analizi. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi +1 (A) kırmızı, translasyonel başlangıç kodonu ATG ise yeşil renk ile yazılarak belirtilmiştir.

TSPAN8	- 990	TTTTTCTTTTGTAAGGAGTTCATGCTTGCTTATCGTGTA AAAACTTAGCAA	- 941
GRCh38 .p7	71158989	TTTTTCTTTTGTAAGGAGTTCATGCTTGCTTATCGTGTA AAAACTTAGCAA	71158940
TSPAN8	- 940	AGATTCTAAAGAATAATTTTCTCAACAACCTTTTAAAGTAGAGGGTTCTT	- 891
GRCh38 .p7	71158939	AGATTCTAAAGAATAATTTTCTCAACAACCTTTTAAAGTAGAGGGTTCTT	71158890
TSPAN8	- 890	TTATTTAGGGGGAGAAGAACCCCTTTGAGAGGCAGGATGTGGAACTAA	- 841
GRCh38 .p7	71158889	TTATTTAGGGGGAGAAGAACCCCTTTGAGAGGCAGGATGTGGAACTAA	71158840
TSPAN8	- 840	CATGACCCAGGCTGTTTACACAAAGCAGTCCACACCTCCCTGATGATGTC	- 791
GRCh38 .p7	71158839	CATGACCCAGGCTGTTTACACAAAGCAGTCCACACCTCCCTGATGATGTC	71158790
TSPAN8	- 790	GGAGCATTTTGCCTTTACCTGAGACAGCTGCCTTCATTAGCAC TAGAAA	- 741
GRCh38 .p7	71158789	GGAGCATTTTGCCTTTACCTGAGACAGCTGCCTTCATTAGCAC TAGAAA	71158740
TSPAN8	- 740	CAAATAGTAAATCTATGGTCACTGATCCATGACCACCTCCCATTTTGA	- 691
GRCh38 .p7	71158739	CAAATAGTAAATCTATGGTCACTGATCCATGACCACCTCCCATTTTGA	71158690
TSPAN8	- 690	ATTTTTTTGTCCGGGAGGACCTGGAATCCAGAACTGAGTTGGTGGAGAA	- 641
GRCh38 .p7	71158689	ATTTTTTTGTCCGGGAGGACCTGGAATCCAGAACTGAGTTGGTGGAGAA	71158640
TSPAN8	- 640	CAGCTGTTGCTAGATACAATTTATCAGAGGAAGGAAATTA CAGTGTCCAC	- 591
GRCh38 .p7	71158639	CAGCTGTTGCTAGATACAATTTATCAGAGGAAGGAAATTA CAGTGTCCAC	71158590
TSPAN8	- 590	CTTAAAAACAAACCAAGCTATCAGAATGACTACGCATTATAAAA TGAAAA	- 541
GRCh38 .p7	71158589	CTTAAAAACAAACCAAGCTATCAGAATGACTACGCATTATAAAA TGAAAA	71158540
TSPAN8	- 540	CAATGTTGCAGTCAGTGCCACTTTATGATTTCCTTCCCTTTGTATCATAA	- 491
GRCh38 .p7	71158539	CAATGTTGCAGTCAGTGCCACTTTATGATTTCCTTCCCTTTGTATCATAA	71158490

Şekil 3.10: (devam).

TSPAN8	-490	AGAAA TAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTATCATGATAGGCAAGGCTGCC	-441
GRCh38 .p7	71158489	AGAAA TAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTATCATGATAGGCAAGGCTGCC	71158440
TSPAN8	-440	TCTCCCTCTGCAATTCTGTGGTGTATTTACGGCAGCTCTGGAATCTTTT	-391
GRCh38 .p7	71158439	TCTCCCTCTGCAATTCTGTGGTGTATTTACGGCAGCTCTGGAATCTTTT	71158390
TSPAN8	-390	TGAAA TAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAAATGGTTATTTT	-341
GRCh38 .p7	71158389	TGAAA TAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAAATGGTTATTTT	71158340
TSPAN8	-340	ACTATTCTAGGTTTAAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGCTTTGATATT	-291
GRCh38 .p7	71158339	ACTATTCTAGGTTTAAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGCTTTGATATT	71158290
TSPAN8	-290	TTGCAGATTTCTAAATGCATTTTATTCATTTAGAAGGAATTTTGTAGTA	-241
GRCh38 .p7	71158289	TTGCAGATTTCTAAATGCATTTTATTCATTTAGAAGGAATTTTGTAGTA	71158240
TSPAN8	-240	TTGAGAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTCCATTTAACT	-191
GRCh38 .p7	71158239	TTGAGAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTCCATTTAACT	71158190
TSPAN8	-190	CAGAACAAAACAACCTTATTTCCCCATAGTTGAAA TGGAGGGCGGGGAAG	-141
GRCh38 .p7	71158189	CAGAACAAAACAACCTTATTTCCCCATAGTTGAAA TGGAGGGCGGGGAAG	71158140
TSPAN8	-140	TCAGGCAGTGTTTC TGAAGCCAAGAAGCTTAGTAGCACTGTGCCATTCT	-91
GRCh38 .p7	71158139	TCAGGCAGTGTTTC TGAAGCCAAGAAGCTTAGTAGCACTGTGCCATTCT	71158090
TSPAN8	-90	CTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCTTCACTTGATATCTGTTTACTTTAGA	-41
GRCh38 .p7	71158089	CTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCTTCACTTGATATCTGTTTACTTTAGA	71158040
TSPAN8	-40	GGAGGCAGTTTTTGAAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAGTGC CCCAG	+10
GRCh38 .p7	71158039	GGAGGCAGTTTTTGAAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAGTGC CCCAG	71157990
TSPAN8	+9	GAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC	+41
GRCh38 .p7	71157989	GAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC	71157959

Şekil 3.10: (devam).

3.4 Farklı Uzunluklarda Promotor Parçalarının Oluşturulması

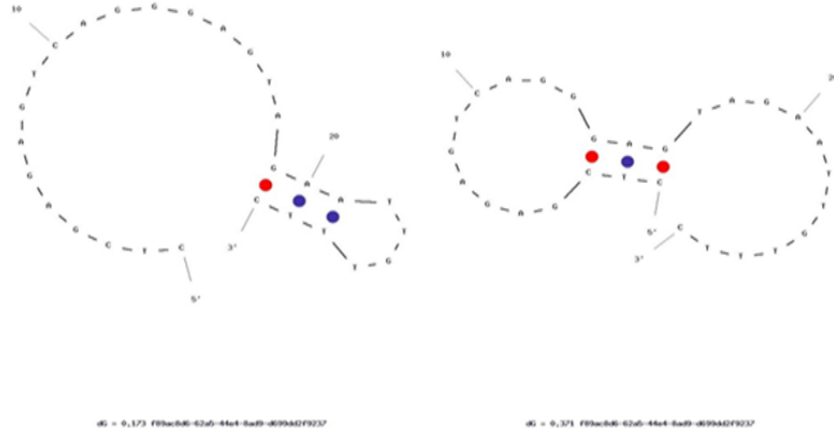
Farklı uzunluklarda TSPAN8 promotor parçalarının oluşturulması için iki yöntem kullanıldı. 1089 [-1048/+41] bç ve 186 [-145/+41] bç uzunluğundaki promotor parçaları PZR temelli teknikler ile oluşturulurken, 438 [-398/+41] bç uzunluğundaki bölge restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşturuldu.

3.4.1 1089 [-1048/+41] bç Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

1089 [-1048/+41] bç uzunluğunda promotor parçasının oluşturulması için PZR tekniği kullanıldı. Daha önce 1581 bç uzunluğundaki promotorun elde edilmesinde kullanılan reverse primer 1089 [-1048/+41] bç uzunluğunda promotor parçasının çoğaltılmasında kullanıldı. Yalnız forward primer için yeniden primer tasarımı yapıldı. Buna göre tasarlanan primerde pMET-Luc vektörüne klonlama için XhoI restriksiyon tanıma bölgesi kullanıldı (Tablo 3.4).

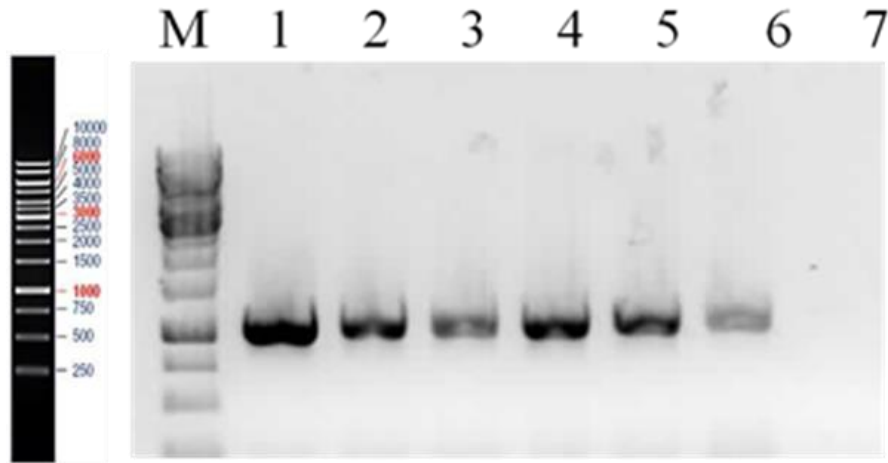
Tablo 3.4: Tasarlanan 1089 [-1048/+41] bç TSPAN8 promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, Tm değeri ve uzunluğu.

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	Dizi
1089 [-1048/+41] Forward	28 bç	68,7°C	<u>CTCGAGTGAATTAGACTAGGGGTTCTATTA</u> XhoI Kesim Bölgesi
TSPAN8-Reverse	27 bç	68,3°C	<u>GGATCCGGCAAGTATGTTTCCTTTGCTT</u> BamHI Kesim Bölgesi



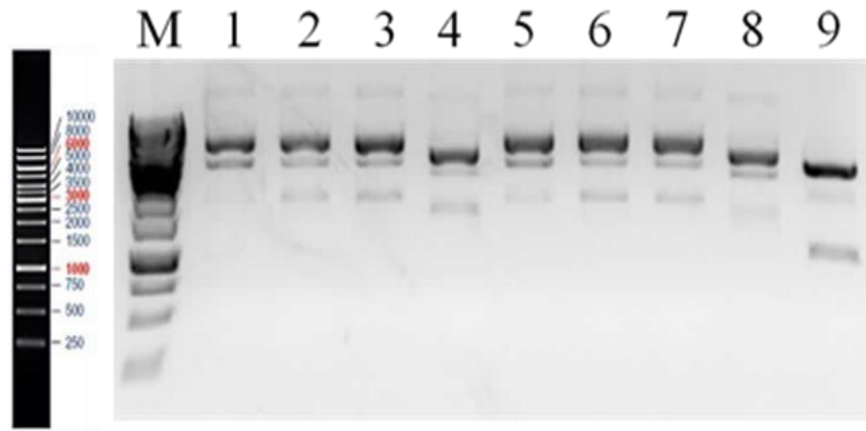
Şekil 3.11: 1089 [-1048/+41] TSPAN8 promotor bölgesine ait spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli.

PZR reaksiyonları bölüm 2.2.2.3' de belirtildiği gibi 50 µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak genomik DNA kullanıldı. Tablo 3.2' deki PZR koşulları kullanılarak dizi çoğaltıldı. PZR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 1089 [-1048/+41] bç' lik TSPAN8 promotoruna ait bant UVP görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.12' de görüldüğü gibi bütün tüplerde tek bir bant elde edildi.

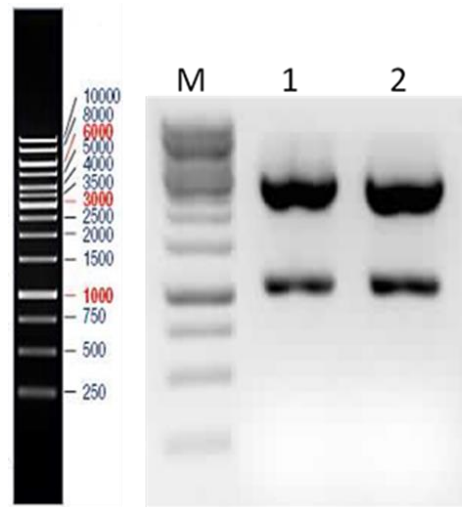


Şekil 3.12: 1089 [-1048/+41] bç uzunluğunda TSPAN8 promotor parçasının PZR sonu jel görüntüsü M- 1 kb marker 1- 1 µl DNA,1 mM MgCl₂ 2- 1 µl DNA,2 mM MgCl₂ 3- 1 µl DNA,3 mM MgCl₂ 4- 2 µl DNA,1 mM MgCl₂ 5- 2 µl DNA,2 mM MgCl₂ 6- 2 µl DNA,3 mM MgCl₂ 7- Negatif Kontrol.

PZR ile çoğaltılan 1089 [-1048/+41] bç uzunluğundaki promotor bölge T:A klonlanma stratejisi ile pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Bu amaçla elde edilen transformasyon ürünü mavi-beyaz koloni seçilebilmesi için X-Gal ve IPTG yayılmış ampisilin içeren LB Agarlı petriye ekildi. 37 °C’ de bir gece inkübasyon sonrasında oluşan beyaz kolonilerden 9 tek koloni seçilerek LB sıvı besiyerine ekimi yapıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bırakıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyonu ve ardından plazmitlerin kontrol kesimi yapıldı. Şekil 3.13’ de görüldüğü gibi seçilen 9 koloniden sadece 1 tanesi rekombinant vektörü içermektedir.

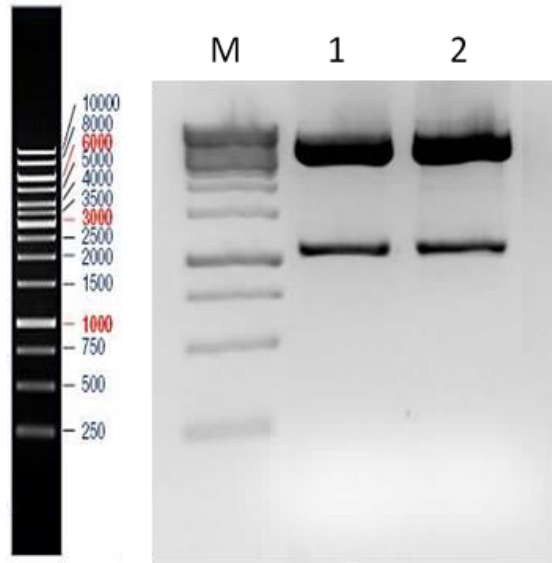


Şekil 3.13: 1089 bç promotoru içeren pGEMT-Easy kesim sonucu jel görüntüsü. 1: 1 kb marker 1: 1. koloni 2: 2. koloni 3: 3. koloni 4: 4. koloni 5: 5. koloni 6: 6. koloni 7: 7. koloni 8: 8. koloni 9: 9. koloni.



Şekil 3.14: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 1089 bç TSPAN8 promotorunun kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M: 1 kb marker 1: 1089 bç 2: 1089 bç.

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan TSPAN8 promotörü fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMet-Luc Lusiferaz haberci vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla öncelikle Şekil 3.14’ de görülen kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Daha sonra aynı şekilde XhoI ve BamHI enzimleriyle kesilen pMet-Luc vektörü ile jelden geri kazanılan insan TSPAN8 promotörü bir gece +4 °C’ de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürününün *E. coli XL1-Blue* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapmış 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 XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kontrol kesimi gerçekleştirildi. Kesim sonucu agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.15’ de görüldüğü gibi iki koloniden ikisinde de bulunan vektör rekombinanttır ve insan TSPAN8 promotörünü içermektedir.



Şekil 3.15: pMet-Luc vektörüne klonlanan 1089 bç [-1048/+41] bç uzunluğundaki promotörün kontrol kesimi sonucu jel görüntüsü M: 1 kb marker1: 1. Koloni 2: 2. Koloni.

3.4.1.1 Otomatik Dizi Analizi

Klonlanan 1089 bç insan TSPAN8 promotor parçasının dizisinin kontrol edilmesi amacıyla Triogene, İstanbul' a dizilemeye gönderildi. Elde edilen dizileme sonuçları biyoinformatik olarak NCBI' da analiz edildi ve NC_000012.12 erişim numaralı DNA veri bankasındaki TSPAN8 genini ve promotor bölgesini içeren kromozom 12 ile karşılaştırıldı. Şekilde gösterildiği gibi dizileme sonucu ve NCBI veri bankasındaki dizi karşılaştırıldığında her bir nükleotit eşleşmiştir (Şekil 3.16). Dizi analizi ile TSPAN8 genine ait promotorun doğru bir şekilde klonlandığı gösterilmiştir.

TSPAN8	-1048	AGTCAGGGAGTAGAATTGTTTCAAAAACATTGTATGCCAGTGAAAATTAG	-999
GRCh38.p7	71159047	AGTCAGGGAGTAGAATTGTTTCAAAAACATTGTATGCCAGTGAAAATTAG	71158998
TSPAN8	-998	AAATAATATTTTTCTTTTGTAAAGGAGTTCATGCTTGCTTATCGTGTAATA	-949
GRCh38.p7	71158997	AAATAATATTTTTCTTTTGTAAAGGAGTTCATGCTTGCTTATCGTGTAATA	71158948
TSPAN8	-948	CTTAGCAAAGATTCTAAAGAATAATTTTCTCAACAACCTTTTAAAGTAGA	-899
GRCh38.p7	71158947	CTTAGCAAAGATTCTAAAGAATAATTTTCTCAACAACCTTTTAAAGTAGA	71158898
TSPAN8	-898	GGGTTCTTTTATTTAGGGGGAGAAGAAGTCCCTTTGAGAGGCAGGATGTG	-849
GRCh38.p7	71158897	GGGTTCTTTTATTTAGGGGGAGAAGAAGTCCCTTTGAGAGGCAGGATGTG	71158848
TSPAN8	-848	GAAACTAACATGACCCAGGCTGTTTACACAAAGCAGTCCACACCTCCCTG	-799
GRCh38.p7	71158847	GAAACTAACATGACCCAGGCTGTTTACACAAAGCAGTCCACACCTCCCTG	71158798
TSPAN8	-798	ATGATGTCGGAGCATTTCGCTTTACCTGAGACAGCTGCCTTCTATTAGC	-749
GRCh38.p7	71158797	ATGATGTCGGAGCATTTCGCTTTACCTGAGACAGCTGCCTTCTATTAGC	71158748
TSPAN8	-748	ACTAGAAACAAATAGTAAATCTATGGTCACTGATCCATGACCACCTTCC	-699
GRCh38.p7	71158747	ACTAGAAACAAATAGTAAATCTATGGTCACTGATCCATGACCACCTTCC	71158698
TSPAN8	-698	CATTTTGAATTTTTTTGTCCGGGAGGACCTGGAATCCAGAAACTGAGTTG	-649
GRCh38.p7	71158697	CATTTTGAATTTTTTTGTCCGGGAGGACCTGGAATCCAGAAACTGAGTTG	71158648
TSPAN8	-648	GTGGAGAACAGCTGTTGCTAGATACAATTTATCAGAGGAAGGAAATTACA	-599
GRCh38.p7	71158647	GTGGAGAACAGCTGTTGCTAGATACAATTTATCAGAGGAAGGAAATTACA	71158598
TSPAN8	-598	GTGTCCACCTTAAAAACAAACCAAGCTATCAGAATGACTACGCATTATAA	-549
GRCh38.p7	71158597	GTGTCCACCTTAAAAACAAACCAAGCTATCAGAATGACTACGCATTATAA	71158548
TSPAN8	-548	AATGAAAACAATGTTGCAGTCAGTGCCACTTTATGATTTCTTCCCTTTG	-499
GRCh38.p7	71158547	AATGAAAACAATGTTGCAGTCAGTGCCACTTTATGATTTCTTCCCTTTG	71158498

Şekil 3.16: Klonlanan 1089 bç promotor bölgesinin dizi analizi. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi +1 (A) kırmızı, translasyonel başlangıç kodonu ATG ise yeşil renk ile yazılarak belirtilmiştir.

```

TSPAN8 -498      TATCATAAAGAAATAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTATCATGATAGGCA -449
|||||
GRCh38 71158497 TATCATAAAGAAATAAAGATAAAAAGCAAATGGTCTTATCATGATAGGCA 71158448

TSPAN8 -448      AGGCTGCCTCTCCCTCTGCAATTTCTGTGGTGTATTTACGGCAGCTCTGG -399
|||||
GRCh38 71158447 AGGCTGCCTCTCCCTCTGCAATTTCTGTGGTGTATTTACGGCAGCTCTGG 71158398

TSPAN8 -398      AATTCTTTTCAAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAATG -349
|||||
GRCh38 71158397 AATTCTTTTCAAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAATG 71158348

TSPAN8 -348      GTTATTTTACTATTCTAGGTTTAA TGATAACAGGTTGCTATGTC TAAGCT -299
|||||
GRCh38 71158347 GTTATTTTACTATTCTAGGTTTAA TGATAACAGGTTGCTATGTC TAAGCT 71158298

TSPAN8 -298      TTGATATTTTGAGATTTCTAAATGCATT TTATTGCATT TAGAAGGAATT -249
|||||
GRCh38 71158297 TTGATATTTTGAGATTTCTAAATGCATT TTATTGCATT TAGAAGGAATT 71158248

TSPAN8 -248      TTGTAGTATTGAGAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTCC -199
|||||
GRCh38 71158247 TTGTAGTATTGAGAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTCC 71158198

TSPAN8 -198      ATTTAACTCAGAACAAAACAACCT TATTTCCCA TAGTTGAAATGGAGGG -149
|||||
GRCh38 71158197 ATTTAACTCAGAACAAAACAACCT TATTTCCCA TAGTTGAAATGGAGGG 71158148

TSPAN8 -148      CGGGGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAGAACTTAGTAGCACTGT -99
|||||
GRCh38 71158147 CGGGGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAGAACTTAGTAGCACTGT 71158098

TSPAN8 -98       GCCATTCTCTTGCC TGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGTTT -49
|||||
GRCh38 71158097 GCCATTCTCTTGCC TGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGTTT 71158047

TSPAN8 -48       ACTTTAGAGGAGGCAGTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAG +2
|||||
GRCh38 71158048 ACTTTAGAGGAGGCAGTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAG 71157998

```

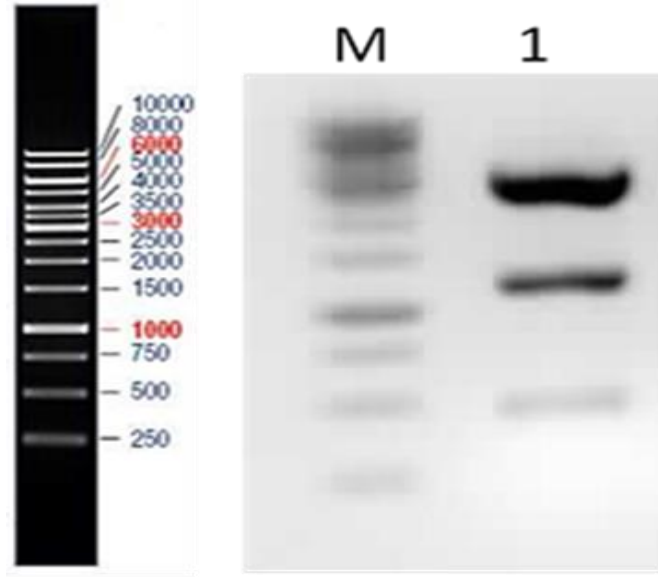
Şekil 3.16: (devam).

```
TSPAN8 +3      TGCCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC +41
                |||
GRCh38 71157997 TGCCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC 71157959
```

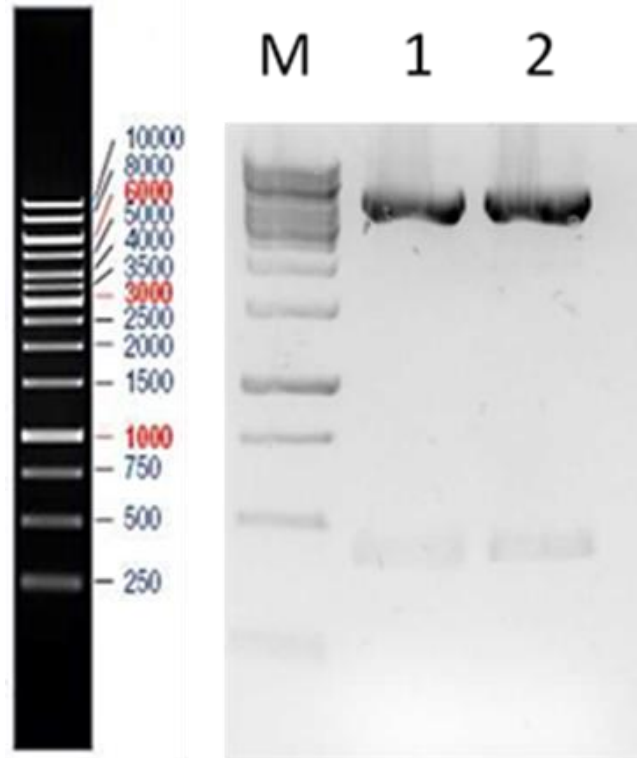
Şekil 3.16: (devam).

3.4.2 438 [-398 /+41] bç Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

1581 [-1540 /+ 41] bç insan TSPAN8 promotor dizisini içeren rekombinant pGEMT-Easy plazmiti transforme edilmiş olan *E. coli XLI-Blue* hücrelerinden tek koloni ekim yapılarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler 1581 bç uzunluğundaki promotoru -397. bazdan kesen ve yapışkan uç oluşturan EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kesilerek agaroz jelde yürütüldü. EcoRI enziminin aynı zamanda vektör üzerinde de tanıma bölgesi bulunduğundan kesim sonucunda agaroz jelde şekilde görüldüğü gibi yaklaşık 1200 bç ve 438 bç olmak üzere iki parça gözlemlendi (Şekil 3.17). Kesim sonucu oluşan 438 bç uzunluğundaki promotor parçası jelden geri kazanılarak, EcoRI ve BamHI enzimleri ile kesilmiş olan pMet-Luc haberci vektörü ile bir gece ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürünü *E. coli XLI-Blue* hücrelerine transforme edildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bir gece 37 °C' de inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerden iki tanesi LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyonu ve ardından plazmitler EcoRI ve BamHI enzimleriyle kesilerek kontrol yapıldı. Şekil 3.18' de görüldüğü gibi ekilen iki koloninin her ikisi de rekombinanttır ve insan TSPAN8 promotorunu içermektedir.



Şekil 3.17: 1581 bç TSPAN8 promotörü içeren pGEMT-Easy vektörünün kesim sonucu jel görüntüsü. M: 1 kb marker 1: 438 bçparça.



Şekil 3.18: 438 [-398 /+41] bç uzunluğunda promotör parçasını içeren pMet-Luc haberci vektörünün kesim sonucun jel görüntüsü. M: 1 kb marker 1: 1. koloni 2: 2. koloni.

3.4.2.1 Otomatik Dizi Analizi

Klonlanan 438 bç insan TSPAN8 promotor parçasının dizisinin kontrol edilmesi amacıyla Triogene, İstanbul'a dizilemeye gönderildi. Elde edilen dizileme sonuçları biyoinformatik olarak NCBI' da analiz edildi ve NC_000012.12 erişim numaralı DNA veri bankasındaki TSPAN8 genini ve promotor bölgesini içeren kromozom 12 ile karşılaştırıldı. Şekilde gösterildiği gibi dizileme sonucu ve NCBI veri bankasındaki dizi karşılaştırıldığında her bir nükleotit eşleşmiştir (Şekil 3.19). Dizi analizi ile TSPAN8 genine ait promotorun doğru bir şekilde klonlandığı gösterilmiştir.

```

TSPAN8 -399      GAATTCCTTTGAAAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAAT      -350
|||||
GRCh38 71158398 GAATTCCTTTGAAAATAAATTTAGATGTTTTGGAGGGCAGATACATGTAAT      71158349

TSPAN8 -349      GGTTATTTTACTATTCTAGGTTTAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGC      -300
|||||
GRCh38 71158348 GGTTATTTTACTATTCTAGGTTTAATGATAACAGGTTGCTATGTCTAAGC      71158299

TSPAN8 -299      TTTGATATTTTGCAAGATTTCTAAAATGCATTTTATGCATTTAGAAGGAAT      -250
|||||
GRCh38 71158298 TTTGATATTTTGCAAGATTTCTAAAATGCATTTTATGCATTTAGAAGGAAT      71158249

TSPAN8 -249      TTTGTAGTATTGAGAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTC      -200
|||||
GRCh38 71158248 TTTGTAGTATTGAGAAAATGCAATGCAAAAATGAGTAGAGATACAATGTC      71158199

TSPAN8 -199      CATTTAACTCAGAACAAAACAACCTTATTTCCCATAGTTGAAAATGGAGG      -150
|||||
GRCh38 71158198 CATTTAACTCAGAACAAAACAACCTTATTTCCCATAGTTGAAAATGGAGG      71158149

TSPAN8 -149      GCGGGGAAGTCAGGCAGTGTTTCGAAAGCCAAGAAGCTTAGTAGCACTG      -100
|||||
GRCh38 71158148 GCGGGGAAGTCAGGCAGTGTTTCGAAAGCCAAGAAGCTTAGTAGCACTG      71158099

TSPAN8 -99       TGCCATTCTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCTTCACTTGATATCTGTT      -50
|||||
GRCh38 71158098 TGCCATTCTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCTTCACTTGATATCTGTT      71158049

TSPAN8 -49       TACTTTAGAGGAGGCAGTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCA      +1
|||||
GRCh38 71158048 TACTTTAGAGGAGGCAGTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCA      71157999

TSPAN8 +2       GTGCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC      +41
|||||
GRCh38 71157998 GTGCCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC      71157959

```

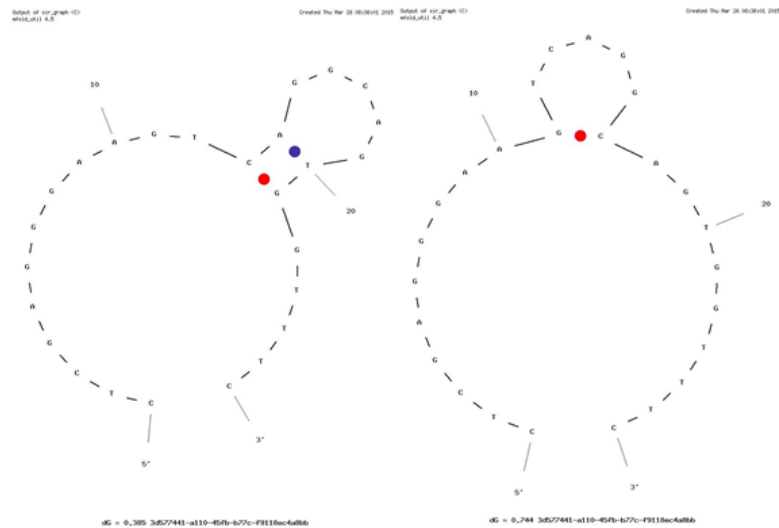
Şekil 3.19: Klonlanan 438 bç promotor bölgesinin dizi analizi. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi +1 (A) kırmızı, translasyonel başlangıç kodunu ATG ise yeşil renk ile yazılarak belirtilmiştir.

3.4.3 186 [-145 /+41] bç Uzunluğunda Promotor Parçası Oluşturulması

186 [-145 /+41] bç uzunluğunda promotor parçasının oluşturulması için PZR tekniği kullanıldı. Daha önce 186 bç uzunluğundaki promotorun elde edilmesinde kullanılan reverse primer 186 [-145 /+41] bç uzunluğunda promotor parçasının çoğaltılmasında kullanıldı. Yalnız forward primer için yeniden primer tasarımı yapıldı. Buna göre tasarlanan primerde pMET-Luc vektörüne klonlama için XhoI restriksiyon tanıma bölgesi kullanıldı (Tablo 3.5).

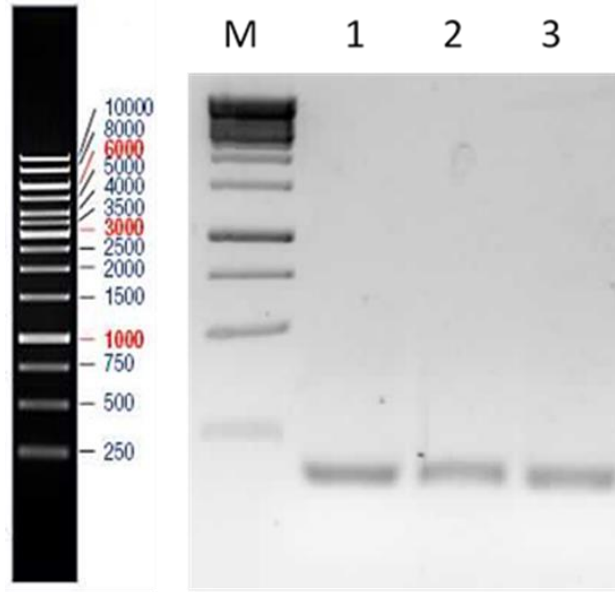
Tablo 3.5: Tasarlanan 186 [-145 /+41] bç TSPAN8 promotor bölgesine spesifik primerin dizisi, Tm değeri ve uzunluğu.

Primer	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	Dizi
186 [-145 /+41] Forward	28 bç	68,7 °C	<u>CTCGAGGGAAGTCAGGCAGTGGTTTC</u> XhoI Kesim Bölgesi
TSPAN8-Reverse	27 bç	68,3 °C	<u>GGATCCGGCAAGTATGTTTCCTTTGCTT</u> BamHI Kesim Bölgesi



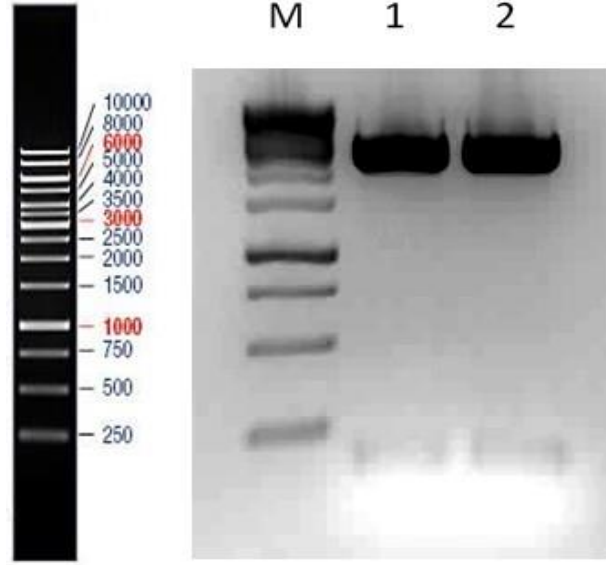
Şekil 3.20: 186 [-145 /+41] bç TSPAN8 promotor bölgesine ait spesifik forward primerin saç tokası oluşturma potansiyeli.

PZR reaksiyonları bölüm 2.2.2.3' de belirtildiği gibi 50 µl hacimde yapıldı. Kalıp olarak genomik DNA kullanıldı. Tablo 3.2' deki PZR koşulları kullanılarak dizi çoğaltıldı. PZR sonucu oluşan ürünler agaroz jelde yürütüldü ve 186 [-145 /+41] bç' lik TSPAN8 promotoruna ait bant UVP görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi. Şekil 3.21' de görüldüğü gibi bütün tüplerde tek bir bant elde edildi.



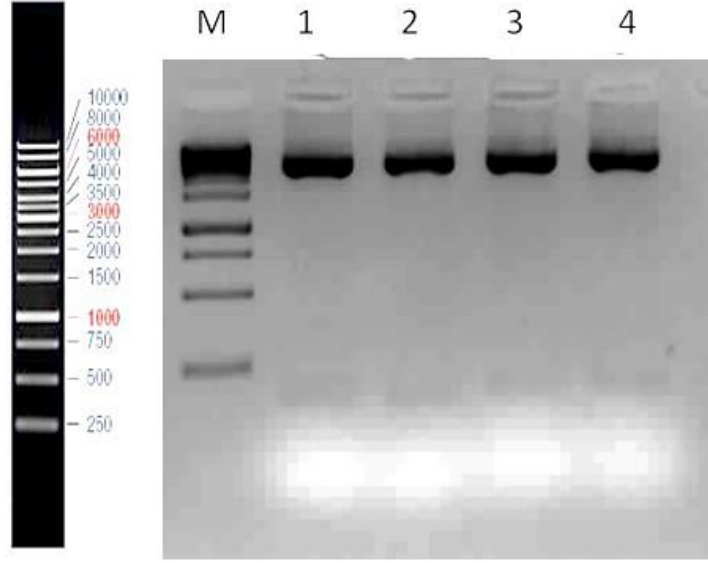
Şekil 3.21: 186 [-145 /+41] bç uzunluğunda TSPAN8 promotor parçasının PZR sonu jel görüntüsü M: 1 kb marker 1: 186 bç 2: 186 bç 3: 186 bç.

PZR ile çoğaltılan 186 [-145 /+41] bç uzunluğundaki promotor bölge T:A klonlanma stratejisi ile pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Bu amaçla elde edilen transformasyon ürünü mavi-beyaz koloni seçilebilmesi için X-Gal ve IPTG yayılmış ampisilin içeren LB Agarlı petriye ekildi. 37 °C' de bir gece inkübasyon sonrasında oluşan beyaz kolonilerden 2 tek koloni seçilerek LB sıvı besiyerine ekimi yapıldı. Bu petrilere transformasyon yapılmış bakterilerin ekimi yapılarak bırakıldı ve hücreler çoğaltıldı. Plazmit DNA izolasyonu ve ardından plazmitlerin kontrol kesimi yapıldı. Şekil 3.22' de görüldüğü gibi seçilen 2 koloniden her ikisi de rekombinant vektörü içermektedir.



Şekil 3.22: pGEM-T Easy vektörüne klonlanan 186 bç TSPAN8 promotorunun kontrol kesim sonucu jel görüntüsü M: 1 kb marker 1: 186 bç 2:186 bç.

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan insan TSPAN8 promotoru fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMet-Luc Lusiferaz haberci vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla öncelikle Şekil 3.22’ de görülen kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Daha sonra aynı şekilde XhoI ve BamHI enzimleriyle kesilen pMet-Luc vektörü ile jelden geri kazanılan insan TSPAN8 promotoru bir gece +4 °C’ de ligasyona bırakıldı. Ligasyon ürününün *E. coli XLI-Blue* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Kanamisin içeren LB agarlı petrilere transformasyon yapmış 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 XhoI ve BamHI restriksiyon enzimleriyle kontrol kesimi gerçekleştirildi. Kesim sonucu agaroz jelde yürütüldü. Şekil 3.23’ de görüldüğü gibi dört koloniden dördünde de bulunan vektör rekombinantır ve insan TSPAN8 promotorunu içermektedir.



Şekil 3.23: pMet-Luc vektörüne klonlanan 186 [-145 /+41] bç uzunluğundaki promotörün kontrol kesimi sonucu jel görüntüsü M: 1 kb marker 1: 186 bç 2: 186 bç 3: 186 bç 4: 186 bç.

3.4.3.1 Otomatik Dizi Analizi

Klonlanan 186 bç insan TSPAN8 promotör parçasının dizisinin kontrol edilmesi amacıyla Triogene, İstanbul' a dizilemeye gönderildi. Elde edilen dizileme sonuçları biyoinformatik olarak NCBI'da analiz edildi ve NC_000012.12 erişim numaralı DNA veri bankasındaki TSPAN8 genini ve promotör bölgesini içeren kromozom 12 ile karşılaştırıldı. Şekilde gösterildiği gibi dizileme sonucu ve NCBI veri bankasındaki dizi karşılaştırıldığında her bir nükleotit eşleşmiştir (Şekil 3.24). Dizi analizi ile TSPAN8 genine ait promotörün doğru bir şekilde klonlandığı gösterilmiştir.

TSPAN8	-145	GGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAGAAGCTTAGTAGCACTGTGCC	-96
GRCh38.p7	71158144	GGAAGTCAGGCAGTGGTTTCTGAAAGCCAAGAAGCTTAGTAGCACTGTGCC	71158095
TSPAN8	-95	ATTCTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGTTTACT	-46
GRCh38.p7	71158094	ATTCTCTTGCCTGATCCAGTGCCATTCCCTTCACTTGATATCTGTTTACT	71158045
TSPAN8	-45	TTAGAGGAGGCAGTTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAAGTGC	+5
GRCh38.p7	71158039	TTAGAGGAGGCAGTTTTTTGAGAAAGGATCATAAATATCCTGGCCCAAGTGC	71157990
TSPAN8	+6	CCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC	+41
GRCh38.p7	71157989	CCCAGGAGCTATGACAAGCAAAGGAACATACTTGCC	71157959

Şekil 3.24: Klonlanan 186 bç promotor bölgesinin dizi analizi. Transkripsiyonun başlangıç bölgesi +1 (A) kırmızı, translasyonel başlangıç kodonu ATG ise yeşil renk ile yazılarak belirtilmiştir.

3.5 İnsan TSPAN8 Geni Promotor Bölgesinin Fonksiyonel Analizi

İnsan TSPAN8 promotor parçalarının fonksiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için pankreas kanseri hücrelerine (MIA-PaCa-2) kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi kullanılarak geçici transfeksiyon yapıldı. Kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi, DNA'nın kalsiyum klorür ile karıştırılması ve bu karışımın fosfat içeren tampona kontrollü şekilde ilave ederek oda sıcaklığında inkübasyonunu içerir. Böylece oluşan presipitasyonlar hücreler üzerine yayılarak fagositoz ya da endositoz yoluyla hücrelerin DNA moleküllerini almalarını sağlar. Yöntem özellikle kullanılan materyallerin ucuz olması ve kolaylıkla elde edilebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Promotor aktivitesini belirlemek için haberci gen olarak *Metridia longa* (marin copepod) lüsiferaz geni içeren pMet-Luc vektör sistemi kullanılmıştır. Lüsiferaz proteini medyuma salındığından dolayı lüsiferaz aktivitesini belirlemek hassas, güvenilir ve hızlıdır. Ayrıca bu enzim hücre içinde stabil olduğundan (uzun yarı ömürlü), lüsiferaz haberci geni promotor aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır.

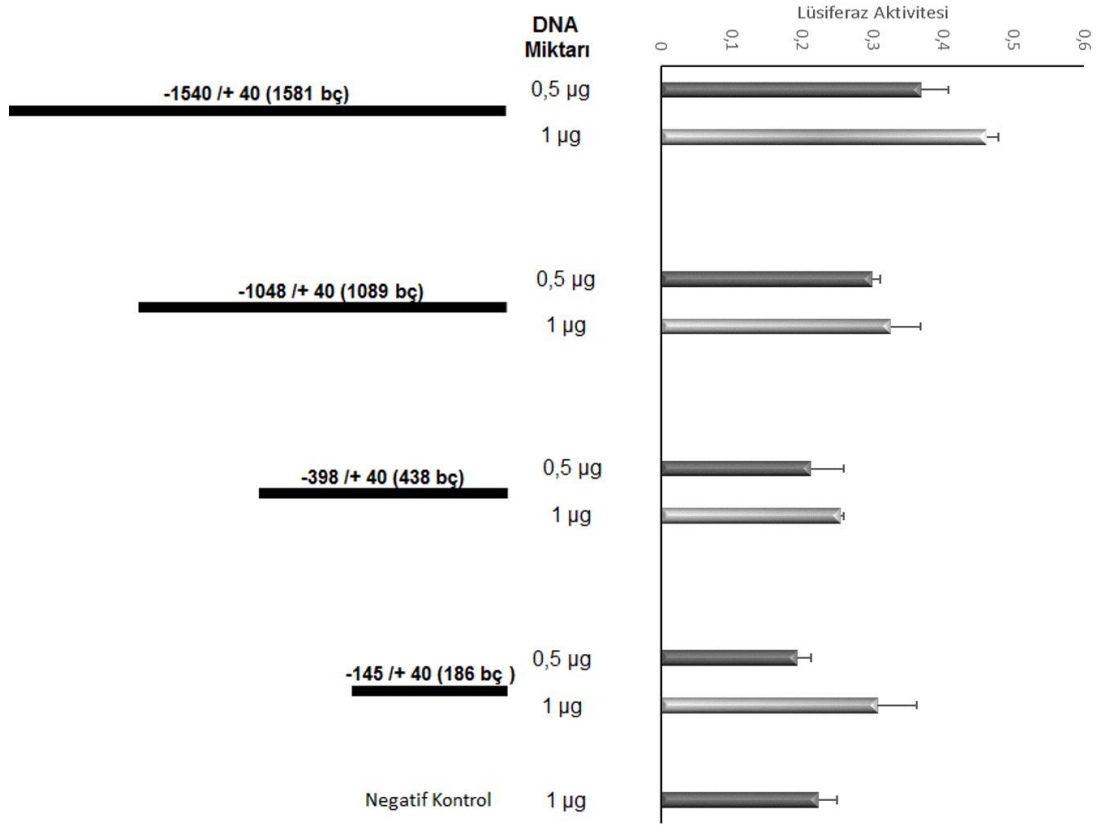
Transfeksiyon çalışmalarından önce bölüm 3.1.3 ve bölüm 3.2' de belirtildiği gibi insan TSPAN8 geni promotor parçaları pMet-Luc vektörü içerisindeki lüsiferaz

haberci geninin üst kısmına klonlandı. Promotor parçalarının dizi analizi ile kontrollerinin yapılmasının ardından endo-free maxi prep ve midi prep kiti kullanılarak saflaştırıldı ve transfeksiyonları yapıldı.

3.5.1 Bazal Promotor Aktivitesinin Belirlenmesi

İlk olarak dört farklı uzunlukta, kısaltılarak hazırlanmış insan TSPAN8 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri belirlendi. Pankreas kanseri hücre hattı olan MIA-PaCa-2 hücrelerine gen aktarımı için kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi kullanıldı ve lüsiferaz vektör sistemi ile her bir parçanın aktivitesi belirlendi. İlk olarak transfekte edilecek genin konsantrasyonunun optimizasyonu amacıyla hücreler üzerinde 0,5 µg ve 1 µg promotor parçaları kullanıldı. Lüsiferaz ölçümlerinin ve transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için pMet-Luc kontrol plazmiti transfekte edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan pMet-Luc vektörü yüksek lüsiferaz aktivitesi gösterir çünkü bu vektörde lüsiferaz geninin ön kısmında güçlü bir promotor olan insan sitomegalovirüs (CMV) promotörü bulunmaktadır. Negatif kontrol olarak ise promotor parçası içermeyen pMet-Luc vektörü hücrelere transfekte edildi.

Şekil 3.25’ de görüldüğü gibi TSPAN8 promotörüne ait analiz edilen tüm promotor parçaları transkripsiyonel aktivite göstermiştir. En yüksek transkripsiyonel aktivite en uzun promotor parçasında (1581 [-1540/+ 41] bç) görülürken, diğer promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktiviteleri birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Transkripsiyonel aktivitenin belirlenmesi için kullanılacak DNA miktarı, en yüksek lüsiferaz aktivite gösteren 1 µg olarak belirlenmiş ve bu nedenle diğer tüm transfeksiyon uygulamalarında 1 µg DNA kullanılmıştır.



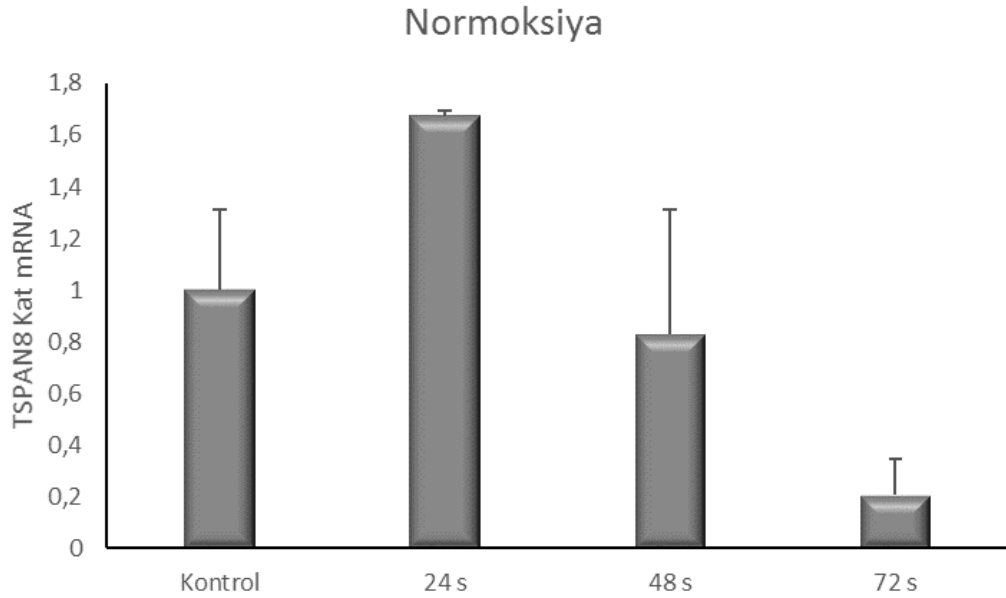
Şekil 3.25: Farklı uzunluklardaki TSPAN8 promotor parçalarının bazal transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi. DNA miktarı 0,5 µg ve 1 µg olarak kullanılmıştır.

3.6 IL-6 Sitokininin TSPAN8 Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

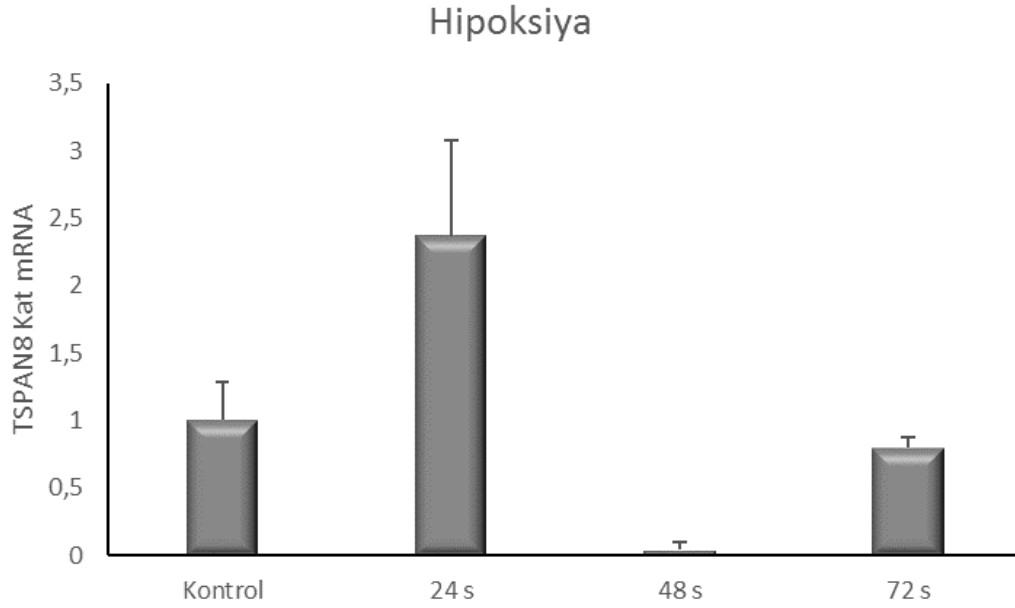
TSPAN8 ekspresyon seviyesinin pankreas kanserinde yüksek olduğu bilinmektedir. IL-6 sitokininin TSPAN8 ekspresyon seviyesine etkilerinin belirlenmesi amacıyla pankreas kanseri hücresi olan MIA-PaCa-2 hücreleri kullanılmıştır. Çalışmamızda TSPAN8'in gösterilen ifadesine ek olarak IL-6 sitokininin ekspresyon seviyesindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak IL-6 sitokininin normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda mRNA düzeyinde etkili olup olmadığı belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda yapılan analizlerin verdiği bilgiler doğrultusunda, IL-6 sitokininin transkripsiyonel aktiviteye etkilerinin belirleneceği transfeksiyon çalışmaları da yapılacaktır.

3.6.1 IL-6 Sitokininin TSPAN8 Ekspresyonu Üzerindeki Etkilerinin mRNA Seviyesinde Belirlenmesi

MIA-PaCa-2 hücreleri 6 kuyulu plakalara her kuyuda yaklaşık 500.000 hücre olacak şekilde ilave edildi. Bir gece hücrelerin plakanın yüzeyine tutunmaları için beklendi. Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda çalışmalar ekspresyon seviyesi belirleneceğinden, hücreler $CoCl_2$ ile uyarılarak oluşturulan hipoksik koşullar oluşturuldu. Hücrelerin ekilmesinden 24 saat sonra 500 U/ml olacak şekilde IL-6 sitokini eklendi. Sonuçlar 24, 48 ve 72 saat sonrasında alınarak pelletler $-80\text{ }^{\circ}C$ ' ye kaldırıldı. RNA izolasyonları bölüm 2.2.5.1' de belirtildiği gibi yapıldı. Bölüm 2.2.5.2' de belirtildiği gibi RNA'nın miktarı ve saflığı belirlendi. cDNA eldesi için bölüm 2.2.5.3' de belirtildiği gibi revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentez reaksiyonları gerçekleştirildi. Bölüm 2.2.5.5' de belirtildiği gibi TSPAN8 ve insan beta 2 mikroglobulin primerleri kullanılarak Gerçek Zamanlı PZR yapıldı. Primer bilgileri tablo 2.8 ve PZR'nin döngü koşulları tablo 2.9' da gösterilmiştir. İnsan beta 2 mikroglobulin primerleri analizleri normalize etmek amacıyla kullanılmıştır. Sonuçlar CT değerine göre bölüm 2.2.5.5' de belirtildiği şekilde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.26: Normal oksijen koşullarında 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda TSPAN8 mRNA seviyesinin belirlenmesi.



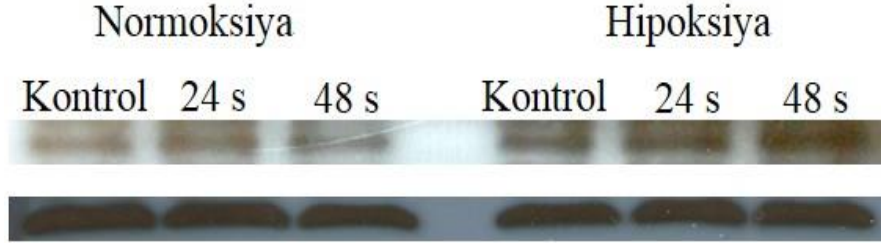
Şekil 3.27: Hipoksik koşullarda 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda TSPAN8 mRNA seviyesinin belirlenmesi.

Buna göre şekil 3.26 ve şekil 3.27’ de görüldüğü gibi 500 U/ml IL-6 uygulaması MIA-PaCa-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda 24 saatte TSPAN8 mRNA seviyesini artırmaktadır.

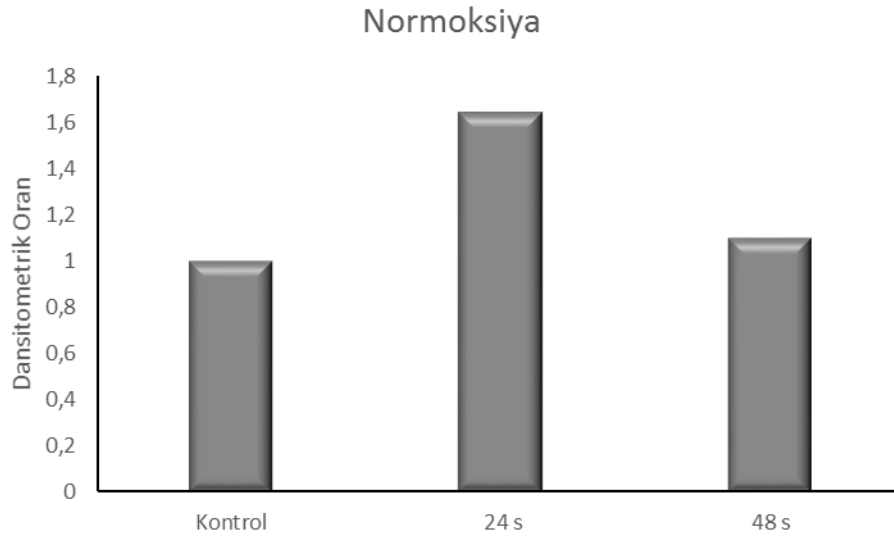
3.6.2 IL-6 Sitokininin TSPAN8 Ekspresyonu Üzerindeki Etkilerinin Protein Seviyesinde Belirlenmesi

Hücreler bölüm 2.2.4.4 ve 2.2.4.4.1’ de belirtildiği gibi hazırlandı ve eppendorflara çöktürülerek, protein için ayrılmış olarak -80 °C’ ye kaldırıldı. Deney grupları normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda oluşturuldu ve IL-6 sitokini uygulandı. Alınan örnekler bölüm 2.1.5.1’ de belirtildiği gibi hazırlanan ripa tamponu ile total protein elde edildi ve bölüm 2.2.6.2’ de açıklandığı gibi miktarı belirlendi. Proteinler bölüm 2.2.6.3’ de belirtildiği gibi SDS jel elektroforezinde yürütülerek büyüklüklerine göre ayrıldı. Bölüm 2.2.6.4’ de belirtildiği gibi western blot işlemleri gerçekleştirildi. Proteinlerin transfer edildiği membrana TSPAN8 spesifik primer antikoru ve normalizasyonun gerçekleştirilmesi içinde beta aktin antikoru ile muamele edildi. Sekonder antikor olarak TSPAN8 antikoruna spesifik Rabbit Anti-Goat HRP uygulandı. Antikorlar ile muamele işleminin ardından

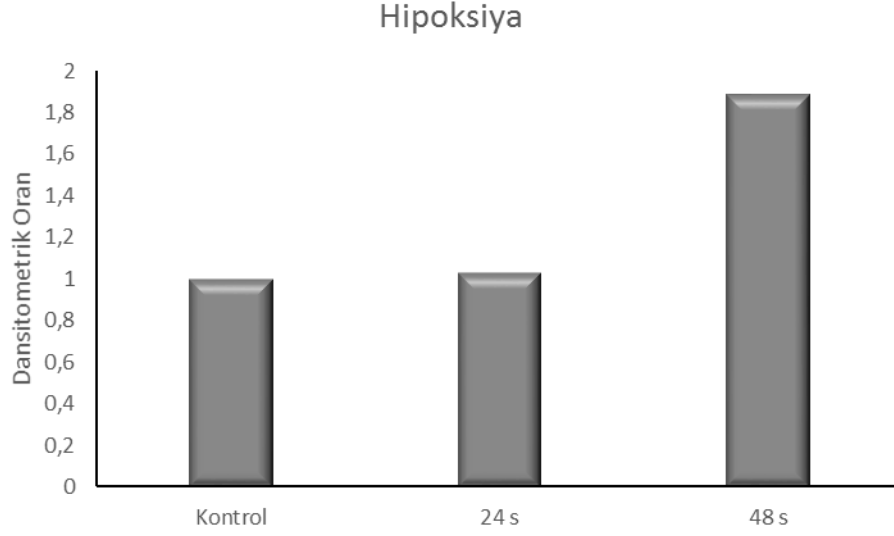
membranlar 1-2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL substratla muamele edildi. Otoradyografi ile belirlenen bantlar dansitometrik olarak İmage J programı ile analiz edildi (Şekil 3.28).



Şekil 3.28: Normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda IL-6 sitokininin TSPAN8 protein ekspresyon seviyesine etkilerini gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 3.29: Normal oksijen koşullarında 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonunda TSPAN8 protein seviyesinin belirlenmesi.



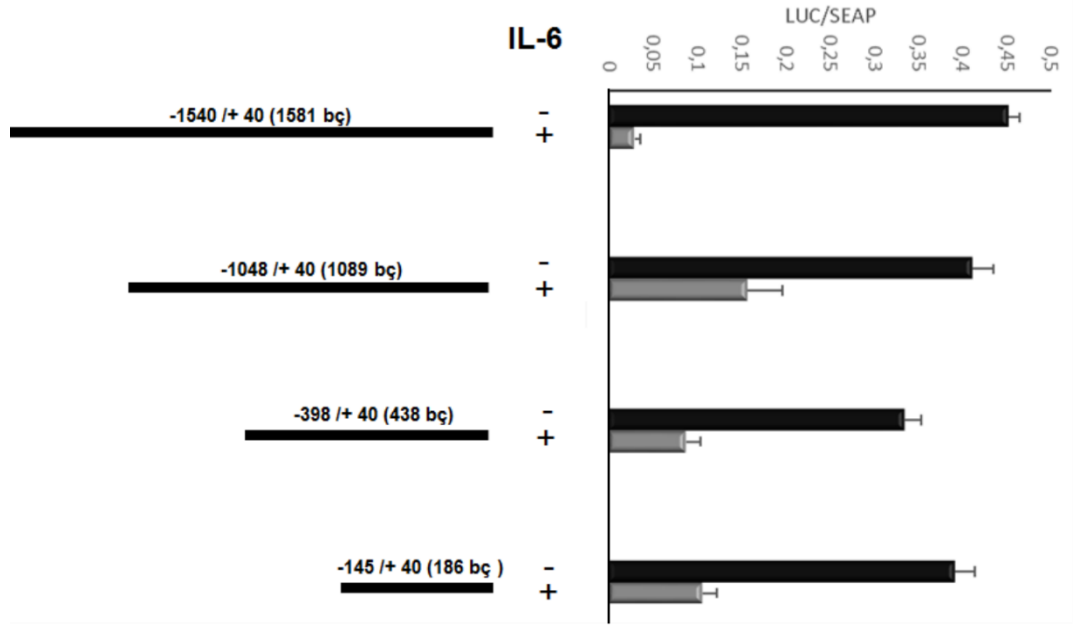
Şekil 3.30: Hipoksik koşullarda 500 U/ml IL-6 uygulanmış MIA-PaCa-2 hücrelerinde 24 ve 48 saat sonunda TSPAN8 protein seviyesinin belirlenmesi.

Değerlendirmeler sonucunda şekil 3.29 ve şekil 3.30’ da görüldüğü gibi 500 U/ml IL-6 uygulaması MIA-PaCa-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında 24 saatte, hipoksik koşullarda ise 48 saatte TSPAN8 protein seviyesini arttırmıştır. Normal oksijen koşullarında 24 saatteki protein seviyesindeki artış mRNA seviyesinde 24 saatteki artış ile korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir.

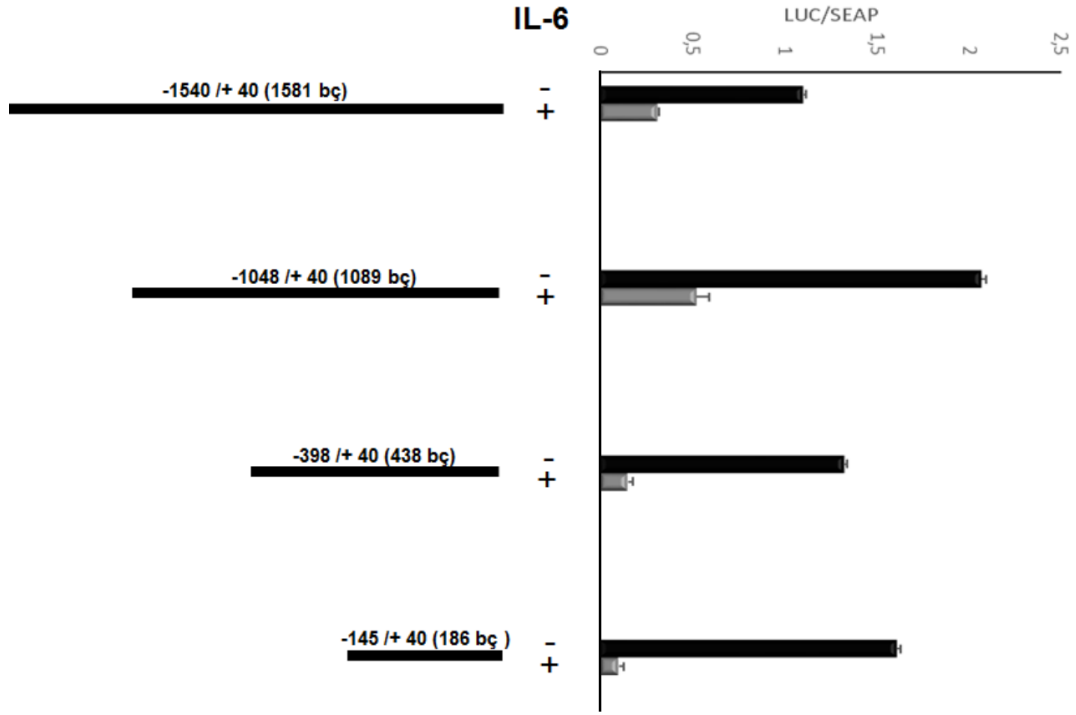
3.6.3 IL-6 Sitokininin TSPAN8 Promotor Parçaları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

TSPAN8 promotorunun dört farklı parçası geçici transfeksiyon gerçekleştirmek amacıyla kalsiyum-fosfat presipitasyon metodu kullanılarak MIA-PaCa-2 hücrelerine aktarıldı. Uygulama 6 kuyulu plakalarda yapıldı. Transfeksiyon uygulamasından 24 saat önce hücreler yaklaşık 5×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde plakalara konuldu. Transfekte edilecek DNA ve 2M CaCl₂ ayrı bir ependorf içinde hazırlandı. Üzerine 2X HEPES ortamda hava kabarcıkları oluşturarak damla damla ilave edildi. Oluşan karışımın presipitasyon oluşturması için yarım saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. DNA:Kalsiyum-fosfat presipitasyonu oluşumu gerçekleştikten sonra karışım pipetaj yapılmadan yavaş bir şekilde damlatılarak kuyucuklara ilave edildi. Plaka hafif bir şekilde sallanarak karışımın tüm hücrelere ulaşması sağlandı.

Uygulamadan 6 saat sonra içerisinde transfeksiyon solüsyonu olan medyum %10' luk BSA içeren medyum ile değiştirildi ve 1 saat sonrasında her kuyuda 500 U/ml olacak şekilde IL-6 sitokini uygulandı. Uygulamanın ardından 24, 48 ve 72 saatlerde medyum alınarak lüsiferaz ve SEAP aktiviteleri için ölçüm yapıldı.



Şekil 3.31: Normal oksijen koşullarında 500 U/ml IL-6 sitokininin farklı uzunluklardaki TSPAN8 promotor aktivitesine etkileri.



Şekil 3.32: Hipoksik koşullarda 500 U/ml IL-6 sitokininin farklı uzunluklardaki TSPAN8 promotor aktivitesine etkileri.

Buna göre hücelere şekil 3.31 ve şekil 3.32’ de görüldüğü gibi 500 U/ml IL-6 sitokininin uygulanmasının normal oksijen koşullarında ve hipoksik koşullarda her bir promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesini düşürdüğü görülmüştür.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

İntegral membran proteinlerinin büyük bir kısmını oluşturan tetraspanin proteinleri birçok dokuda yaygın ve bol miktarda ifade edilmesine rağmen biyolojik fonksiyonları kapsamlı olarak çalışılmamıştır.

Tetraspaninler migrasyon, hücre bağlantısı, hücre birleşmesi ve ilişkili süreçleri düzenlemek için integrinler, EpCaM ve heterotrimerik G proteinlerini kapsayan transmembran ve sitozolik proteinler ve diğer tetraspaninler ile etkileşerek tetraspanin-zenginleştirilmiş mikrodomanlar (TEMs) olarak ifade edilen kompleksler oluşturmaktadır. Tetraspanin ailesi üyelerinden olan TSPAN8' in tümör metastazında önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle gastrointestinal kanserlerde yüksek ekspresyon seviyesi göstermektedir. TSPAN8 ekspresyonu, tümörün tanısı ve prognozu hakkında bilgi vermesi nedeniyle bu kanserlerde biyobelirteç olarak gösterilmektedir. Literatürde TSPAN8' in tümör metastazında belirteç olması ve potansiyel tümör terapötik hedef olması ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen transkripsiyonel regülasyonu ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Birçok kanser tipinde tümör ilerlemesi ve metastaza teşvik ettiği bilinen TSPAN8'in regülasyonu aydınlatılmamış durumdadır. Tümör ilişkili TSPAN8 geninin ekspresyonunun regülasyonu ile ilgili ilk çalışma 2016 yılında Sarkar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada TSPAN8' in metastaz ve invazyona neden olduğu bilinen AEG-1 gen ekspresyonu üzerinde önemli bir role sahip olduğu savunulmuş ve bu mekanizmayı aydınlatmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda AEG-1' in TSPAN8 transkripsiyonunu regüle edip etmediğini kontrol etmek için, insan TSPAN8 geninin transkripsiyonel başlangıç noktasından yukarıya doğru yaklaşık 2000 baz çifti promotörü bulunmayan pGL4.10[luc2] lüsiferaz haberci vektörüne klonlanmış ve TSPAN8-luc lüsiferaz haberci plazmidi oluşturulmuştur. TSPAN8-luc aktivitesinin AEG-1' in siRNAlar ile knockdown edildiği HCC hücrelerine karşı AEG-1' in overekspre edildiği HCC hücrelerinde önemli derecede daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. QGY-7703, AEG-1' in yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu agresif bir HCC hücre hattıdır. QGY-7703 hücrelerinde siRNAlar ile AEG-1 geçici olarak knockdown edilmiş ve bu durumda TSPAN8-luc aktivitesinin kontrol siRNA uygulanmış hücreler ile karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür. Yine AEG-1 aracılığıyla TSPAN8' in transkripsiyonel

regülasyonunu kontrol etmek için, HEK-293 (İnsan Emriyonik Böbrek Hücre Hattı) hücreleri içerisine TSPAN8-luc plazmiti ve artan dozlarda AEG-1 ekspresyon plazmiti ko-transfekte edilmiştir. TSPAN8-luc aktivitesinin AEG-1' in overekspresyonu ile ilişkili olarak doza bağlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Son olarak sinyal yolları üzerinde bir araştırma gerçekleştirilmiştir. AEG-1' in overekspresyonu PI3K-AKT ve RAS-Raf-MAPK gibi çeşitli sinyal yollarını aktive etmektedir. AEG-1' in overekspre edildiği HCC ve HEK-293 hücrelerine MEK/ERK inhibitor U0126 ile muamale edildiğinde TSPAN8-luc aktivitesinin belirgin şekilde inhibe edildiği görülmüştür. AEG-1 tarafından MEK/ERK yolağının aktivasyonunun TSPAN8 transkripsiyonunu promote eden büyük bir mekanizma olduğunu işaret ettiği belirtilmiştir [44]. Buna rağmen TSPAN8 promotorunun daha geniş bölgelerinin detaylı analizinin eksikliği göze çarpmaktadır.

Bu yüzden bu çalışmanın amacı, TSPAN8 promotorunun klonlanması ve promotor bölgesinin detaylı analizi ile sitokinler gibi farklı hücresel belirteçlere karşı cevabının belirlenmesi ve hem mRNA hem protein düzeyinde ifadelerinin saptanmasıdır. TSPAN8 geninin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amacıyla yönelik çalışmamızda TSPAN8 promotorunun biyoinformatik analizi yapılmıştır. NCBI referans numarası NC_000012.12 olan kromozom 12 üzerinde TSPAN8 genin transkripsiyon başlangıç bölgesi ve transkripsiyonel başlangıç noktası (+1) belirlendikten sonra kromozom üzerinde +1 noktasından yukarıya doğru yaklaşık 1600 bp [-1540 /+ 41] promotor bölgesi olarak belirlendi. NCBI Blast ve IDTDNA internet siteleri kullanılarak -1540 /+ 41 bölgesine spesifik primerler tasarlandı. Aynı zaman farklı promotor parçaları oluşturmak amacıyla -145 /+41, -1048/+41 bölgelerine spesifik primerler tasarlandı ve -398 /+41 bölgesini klonlamak için kesim bölgesi belirlendi. Promotor bölgesinin klonlanması için kalıp olarak kullanılacak olan genomik DNA, kandan izole edildi. -1540 /+ 41,-1048/+41,-145 /+41 baz çiftlik TSPAN8 promotor bölgeleri PZR ile çoğaltılarak, pMet-Luc lüsiferaz haberci vektörüne klonlandı. -398 /+41 baz çiftlik bölge restriksiyon enzimleri ile kesilerek pMet-Luc lüsiferaz haberci vektörüne klonlandı. Klonlanan bölgelerin dizileme sonuçları TSPAN8 genini içeren kromozom 12 ile karşılaştırıldığında en büyük promotor parçası olan -1540 /+ 41'in veri bankasındaki dizi ile tamamen eşleştiği ve aynı dizilimi gösterdiği görülmüştür. Diğer oluşturulan promotor parçaları -1048/+41, -398 /+41 ve -145 /+41 bölgelerini içeren plazmitler dizi analizine gönderildi ve elde

edilen diziler analiz edildiğinde rekombinant plazmitlerin TSPAN8 promotor parçalarını içerdiği ve veri bankasındaki dizi ile eşleştiği görülmüştür.

Sitokinler hücrel olayların düzenlenmesinde rol almaktadırlar [45]. Tümör mikroçevresinde üretilen sitokinlerin birleşimi kanser patogeneğinde önemli bir role sahiptir. Enfeksiyon, inflamasyon ve bağışıklık sisteminde salınan sitokinler tümörün gelişimini ve ilerlemesini engelleyebilmektedirler. Bundan farklı olarak, kanser hücreleri büyümeye teşvik eden, apoptozu azaltan ve invazyon ve metastazı kolaylaştıran sitokine yanıt verebilir. Sitokin ve tümör hücre etkileşimlerini daha detaylı bir şekilde anlamak kanser immunoterapiyi geliştirmek için yeni fırsatlar sağlamaktadır [46].

İnterlökin-6 (IL-6) kanser hücreleri de dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinde birçok biyolojik aktivite için önemli olan multifonksiyonel bir sitokindir. IL-6 çeşitli tümörlerde büyüme ve farklılaşmanın düzenlenmesinin yanı sıra immun savunma mekanizmasında yer almaktadır. Bu etkiler, başta STAT3 (Signal Transducer and Transcription Activator 3) olmak üzere çeşitli sinyal yolları ile ortaya çıkmaktadır. IL-6'nın yeniden düzenlenmiş aşırı ekspresyonunun kanser hücresi apoptozunun inhibisyonu, anjiyogenezin uyarılması ve ilaç direnci sağlayarak tümör ilerlemesiyle ilişkili olduğunu gösteren bol miktarda kanıt bulunmaktadır. Klinik çalışmalar hastalarda artan IL-6 seviyesinin çeşitli kanserlerde (kolorektal kanser, renal hücreli karsinom, prostat kanseri, meme kanseri ve yumurtalık kanseri) tümörün ileri evreleriyle ve kısa süreli sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bundan dolayı, IL-6 sinyal iletiminin engellenmesi (örneğin, anti-IL-6 terapi) IL-6'nın patolojik olarak aşırı üretiminin karakterize edildiği kanserler için potansiyel bir terapötik strateji olmaktadır [47].

MIA-PaCa-2 hücrelerinde normal oksijen koşulları ve CoCl_2 uygulanarak oluşturulan hipoksi koşullarında 24, 48, 72 saat zaman aralıklarında IL-6 sitokininin mRNA ve protein seviyesinde ekspresyonları araştırılmıştır. MIA-PaCa-2 hücrelerinde normal oksijen koşullarında hem mRNA hem protein seviyesinde IL-6 sitokininin TSPAN8 ekspresyonunu artırdığı gözlemlenmiştir.

MIA-PaCa-2 hücreleri IL-6 sitokini ile uyarıldığında normal oksijen koşullarında 24 saatte, hipoksik koşullarda ise 48 saatte TSPAN8 protein seviyesini

arttırmıştır. Normal oksijen koşullarında 24 saatteki protein seviyesindeki artış mRNA seviyesinde 24 saatteki artış ile korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir.

TSPAN8 promotor parçalarının geçici transfeksiyonunun yapıldığı hücreler IL-6 sitokini ile uyarıldıktan sonra lüsiferaz ve SEAP aktiviteleri ölçülmüştür. 500 U/ml IL-6 uygulamasının hem normal oksijen koşullarında hem hipoksik koşullarda her bir promotor parçasının transkripsiyonel aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

Pankreas kanseri hastalarındaki sağ kalım oranlarının çok düşük olması, hastalığın teşhis edilmesindeki güçlükler ve teşhis edildikten sonra sağ kalım oranının çok düşük olması gibi nedenlerle pankreas kanserininin hem tanısı hem de tedavisine yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Tezimiz kapsamında TSPAN8 geninin promotor parçaları klonlanmış ve bazal transkripsiyonel aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca IL-6 sitokini uygulamasının TSPAN8 gen ekspresyonu ve transkripsiyonel regülasyonuna etkileri belirlenmiştir. Bu anlamda tezimiz kapsamında elde edilen verilerin daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Klug, W.S. ve Cummings, M.R., *Genetik Kavramlar*. 6. Baskı, Ankara: Palme yayıncılık, (2002).
- [2] Yıldırım, H., “Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [3] Latchman, D.S., *Eukaryotik Transcription Factors*. London: Academic Press, (1998).
- [4] Köçkar, F., “Characterisation of the codings and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene”, PhD Thesis, Cardiff University School of Bioscience, Cardiff, (1999).
- [5] Cooper, G.M., *The Cell, A Molecular Approach*, 2nd Edition, Sunderland (MA): Sinauer Associates, (2000).
- [6] Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., and Gelbart W.M., *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th Edition, New York: W.H. Freeman and Company, (2000).
- [7] Garcia-España, A., Chung, P., Sarkar, I.N., Stiner, E., Sun, TT. and Desalle, R., “ Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution”, *Genomiks 91*, 326-334, (2008).
- [8] Zöller, M., “Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis”, *Nature Reviews Cancer*, 9, 40-55, (2009).
- [9] Boucheix, C. and Rubinstein, E., “Tetraspanins”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1189-1205, (2001).
- [10] Rubinstein, E. and Boucheix, C., “Tetraspanins. In: Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins”, (eds) Kreis, T. and Vale, R., 321-324, (1999)
- [11] Yang, Y., Sari, I.N., Zia, M.F., Lee, S.R., Song, S.J. and Kwon, H.Y., “Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hemotologic malignancies”, *Experimental Hematology*, 44, 322-328, (2016).

- [12] Wright, M.D., Moseley, G.W. and van Spriël A.B., “Tetraspanin microdomains in immune cell signaling and malignant disease”, *Tissue Antigens*, 64, 533-542, (2004).
- [13] Tarrant, J.M., Robb, L., van Spriël A.B. and Wright, M.D., “Tetraspanins: Molecular organisers of the leukocyte surface”, *Trends Immunol*, 24, 610-617, (2003).
- [14] Hemler, M.E., “Tetraspanin functions and associated microdomains”, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6, 801-811, (2005)
- [15] Maecker, H.T., Todd, S.C. and Levy, S., “The tetraspanin superfamily: molecular facilitators”, *FASEB*, 11, 428-442, (1997).
- [16] Lapalombella, R., Yeh, Y.Y. and Wang, L., et al., “Tetraspanin CD37 directly mediates transduction of survival and apoptotic signals”, *Cancer Cell*, 21, 694-708, (2012).
- [17] Veenbergen, S. and van Spriël A.B., “Tetraspanins in the immune response against cancer” *Immunol Lett.*, 138, 129-136, (2011).
- [18] Hemler, M.E., “Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages”, *Nat Rev Cancer*, 14, 49-60, (2014).
- [19] van Spriël A.B. and Figdor C.G., “The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases”, *Microbes Infect*, 12, 106-112, (2010).
- [20] Shaw, S., “Antibodies and molecules of the 5th International Workshop of Leukocyte Differentiation antigens. In: Leukocyte typing V: White Cell Differentiation Antigens”, (eds) Schlossman, S., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J., Tedder, T. and Todd, R., *FEBS*, 384, 294-300, (1996).
- [21] Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C. and Rubinstein E., “Tetraspanins at a glance”, *The Company of Biologists Journal of Cell Science*, 127, 3641–3648, (2014).
- [22] Sincock, P.M., Fitter, S., Parton, R.G., Berndt, M.C., Gamble, J.R. and Ashman L.K., “PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localized to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells,

- associates with multiple integrins and modulates cell function”, *J Cell Sci*, 112, 833-844, (1999).
- [23] Boucheix, C., Perrot, J.Y., Mirshahi, M., Giannoni, F., Billard, M., Bernadou, A. and Rosenfeld, C., “A new set of monoclonal antibodies against acute lymphoblastic leukemia”, *Leuk Res*, 9, 597-604, (1985).
- [24] Sincock, P.M., Mayrhofer, G. and Ashman, L.K., “Localisation of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-6 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63 and alpha5beta1 integrin”, *J Histochem Cytochem*, 45, 515-525, (1997).
- [25] Sun, T.T., Zhao, H., Provet, J., Aebi, U. and Wu, X.R., “Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation”, *Mol. Biol. Rep.*, 23, 3-11, (1996).
- [26] van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P.T., Bleeker-Wagemakers, E.M. and Bergen, A.A., “Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view”, *Surv. Ophthalmol.*, 43, 321-334, (1999).
- [27] Miyazaki, T., Muller, U. and Campbell, K.S., “Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81”, *EMBO J.*, 16, 4217-4225, (1997).
- [28] Tsitsikov, E.N., Gutierrez-Ramos, J.C. and Geha, R.S., “Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice”, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94, 10844-10849, (1997).
- [29] Maecker, H.T., Do, M.S. and Levy, S., “CD81 on B cells promotes interleukin 4 secretion and antibody production during T helper type 2 immune responses”, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 2458-2462, (1998).
- [30] Kanetaka, K., Sakamoto, M., Yamamoto, Y., Yamasaki, S. Ve Lanza, F., et al. “Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma” *Journal of Hepatology*, 35, 637-642, (2001).

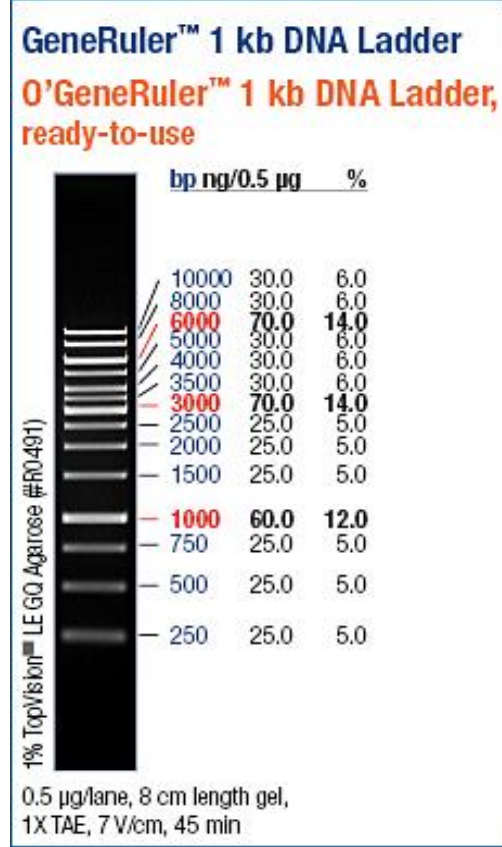
- [31] Heiler, S., Wang, Z. and Zöller, M., “Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes – the incentive push”, *World Journal of Gastroenterology*, 22, 5971-6007, (2016).
- [32] Guo, Q., Xia, B., Zhang, F., Richardson, M.M., Li, M. and Zhang J.S., “Tetraspanin CO-029 inhibits colorectal cancer cell movement by deregulating cell-matrix and cell-cell adhesions”, *PLoS ONE*, 7, (2012).
- [33] Huerta, S., Harris, D.M., Jazirehi, A., Bonavida, B. and Elashoff, D. et al., “Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis”, *Int J Oncol*, 22, 663-670, (2003).
- [34] Zhu, H., Wu, Y., Zheng, W. and Lu, S., “CO-029 is overexpressed in gastric cancer and mediates the effect of EGF on gastric cancer cell proliferation and invasion”, *International Journal of Molecular Medicine*, 35, 798-802, (2015).
- [35] Pan, S.J., Wu, Y.B., Cai, S., Pan, Y.X., Liu, W., Bian L.G., Sun, B. and Sun, Q.F., “Over-expression of tetraspanin 8 in malignant glioma regulates tumor”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458, 476-482, (2015).
- [36] Dinarello, C.A., “Historical Review of Cytokines”, *Eur J Immunol*, 37(Suppl 1), 34–45, (2007).
- [37] Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., Zhang, Z., “Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer”, *Cancer Treat Rev*, 38, 904-910, (2012).
- [38] Shaikh P.Z., “Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review”, *International Journal Of Pharmacy & Life Sciences*, 2, 1247-1263, (2011).
- [39] Pine, S.R., Mechanic, L.E., Enewold, L., Chaturvedi, A.K. and Katki, H.A., et al., “Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer”, *J Natl CancerInst*, 103, 1112–1122, (2011)
- [40] Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M.A. and Takiguchi, S., et al. “Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis”, *Clin Exp Metastasis*, 28, 13–25, (2011).
- [41] Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L., “Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp130/jak/STAT pathway”, *Biochem J*, 334, 297, (1998)

- [42] Hirano, T., Ishihara, K. and Hibi, M., "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors", *Oncogene*, 19, 2548, (2000).
- [43] http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h_il6Pathway.php
- [44] Maaged A.A., Prasanna, K.S., Rachel, G.M., Ayesha, S., Paul, B.F. and Devanand, S., "Tetraspanin 8 mediates AEG-1-induced invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma cells", *FEBS Letter*, 590, 2700-278-, (2016).
- [45] Culig, Z. and Pühr, M., "Interleukin 6: A multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer", *Molecular and Cellular Endocrinolog*, 360, 52-58, (2012).
- [46] Dranoff, G., "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy", *Nature Reviews Cancer*, 4, 11-22, (2004).
- [47] Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z. And Zhang, Z., "Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer", *Cancer Treat Rev*, 38(7), 904-910, (2012).

EKLER

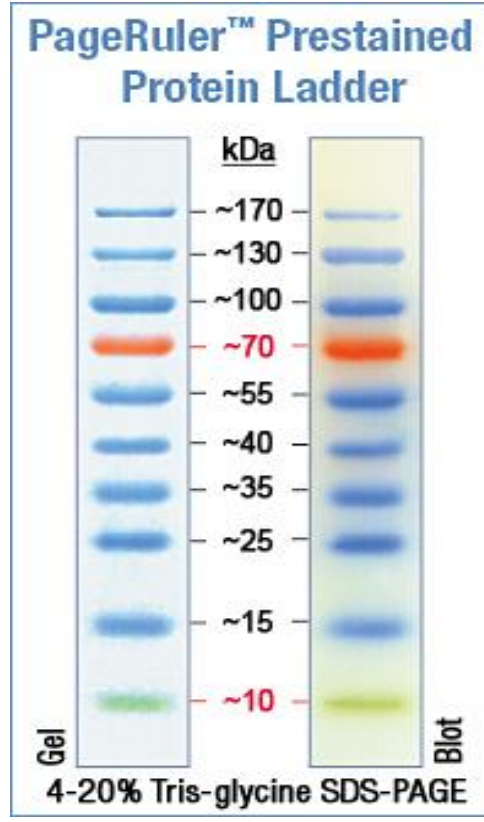
6. EKLER

EK A DNA Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



Şekil 6.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.

EK B Protein Çalışmalarında Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.