

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



**PROSTAT KANSERİNDE NORMAL VE HİPOKSİK KOŞULLARDA**  
**KLK4 GENİNİN TGF- $\beta$  İLE REGÜLASYONU**

**FATMA POYRAZLI**

**DOKTORA TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU (Tez Danışmanı)  
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışman)  
Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ  
Doç. Dr. Aylin Er

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2022**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Prostat Kanserinde Normal ve Hipoksik Koşullarda KLK4 Geninin TGF- $\beta$  ile Regülasyonu**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

**Fatma POYRAZLI**

**Bu tez çalışması TÜBİTAK (118Z369) nolu 1001 projesi ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### PROSTAT KANSERİNDE NORMAL VE HİPOKSİK KOŞULLARDA KLK4 GENİNİN TGF-B İLE REGÜLASYONU

DOKTORA TEZİ

FATMA POYRAZLI

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)

(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

BALIKESİR, TEMMUZ - 2022

KLK' lar, serin proteazların kimotripsin (S1) ailesine ait proteinlerdir ve 15 üye içermektedirler. KLK' lar prostat, meme, yumurtalık kanserlerinde biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadırlar. KLK proteinlerinden kanser biyobelirteçi olarak kullanılan en yaygın, prostata spesifik antijen (PSA- ayrıca KLK3 olarak da bilinir) dir. PSA ve diğer KLK' lar arasındaki yapısal benzerlik göz önüne alındığında, ailenin kalan üyelerinin kanser biyobelirteçleri olarak potansiyel rolü son yıllarda çokça araştırılmıştır. Prostat kanserinde KLK4' ün aşırı ekspresyonunun kemik metastazı veya ileri evre arasında korelasyon olduğu da bildirilmiştir. Kanser progresyonunda kanser hücreleri ile onların mikro çevre arasındaki karşılıklı iletişimi önemlidir. Dokudaki oksijen seviyesinin normal seviyenin altına düşmesine hipoksiya denir. Bu duruma daha çok katı tümörlerde rastlanılır. Bu tümör hücreleri yeterli oksijeni alamadığında hücre ölümüne gitmeden bir takım genetik farklılıklar yaparak oksijensiz ortama uyum sağlarlar. Yapılan birçok klinik çalışmalar hipoksik ortamın artmasıyla tümör çapının arttığını göstermektedir. Bu kapsamda hücrelerin mikro çevresinin hipoksik durumu da düşünüldüğünde, KLK4' ün hipoksiya ile regülasyonun aydınlatılması gerekliliği açıktır. Çalışmamız kapsamında Prostat kanseri hücre hatları olan PC-3 ve LNCaP hücrelerinde normal ve hipoksik koşullarda TGF- $\beta$  sitokini ve HIF transkripsiyon faktörünün KLK4 geninin regülasyonuna katkısı incelenmiştir. KLK4 gen ifadesindeki değişim mRNA, protein ve promotor aktivitesinin ölçülmesi ile değerlendirildi. Bu amaçla farklı uzunluklarda KLK4 promotor parçaları pMetLuc lusiferaz ifade vektörüne klonlandı. Çalışmamız kapsamında ilk kez prostat kanseri hücre hatlarında TGF- $\beta$  ve hipoksinin KLK4 ifadesini regüle ettiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda hipoksinin KLK4 ifadesini arttırdığı ve TGF- $\beta$ 'nin azaltıcı etkisi tespit edilmiştir. KLK4 promotor bölgesi üzerindeki olası HIF ve SMAD bağlanma bölgeleri EMSA deneyleri ile teyit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** KLK4, Prostat kanseri, Hipoksi, TGF- $\beta$ , Gen regülasyonu.

Bilim Kod / Kodları : 20316, 20606, 20610

Sayfa Sayısı :218

## ABSTRACT

### REGULATION OF KLK4 GENE BY TGF- $\beta$ IN NORMAL AND HYPOXIC CONDITIONS IN PROSTATE CANCER

PH.D THESIS

FATMA POYRAZLI

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: DOÇ. DR. SÜMEYYE AYDOĞAN TÜRKÖĞLU)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR )

BALIKESİR, JULY - 2022

KLKs are proteins belonging to the chymotrypsin (S1) family of serine proteases and contain 15 members. CLKs are used as biomarkers in prostate, breast and ovarian cancers. The most common of the KLK proteins used as a cancer biomarker is prostate-specific antigen (PSA-also known as KLK3). Given the structural similarity between PSA and other CLKs, the potential role of remaining family members as cancer biomarkers has been extensively investigated in recent years. It has also been reported that overexpression of KLK4 in prostate cancer is correlated with bone metastasis or advanced stage. The mutual communication between cancer cells and their microenvironment is important in cancer progression. A decrease in the oxygen level in the tissue below the normal level is called hypoxia. This is more common in solid tumors. When these tumor cells cannot receive enough oxygen, they adapt to an oxygen-free environment by making some genetic differences before cell death. Many clinical studies show that the tumor diameter increases with the increase in the hypoxic environment. In this context, considering the hypoxic state of the microenvironment of the cells, it is clear that the regulation of KLK4 by hypoxia should be clarified. In our study, the contribution of TGF- $\beta$  cytokine and HIF transcription factor to the regulation of the KLK4 gene in PC-3 and LNCaP cells, which are prostate cancer cell lines, under normal and hypoxic conditions was investigated. KLK4 gene expression was evaluated at different steps by measuring mRNA, protein and promoter activity. For this purpose, different lengths of KLK4 promoter fragments were cloned into the pMetLuc luciferase expression vector. In our study, it was determined for the first time that TGF- $\beta$  and hypoxia regulate KLK4 expression in prostate cancer cells. It was determined that hypoxia increased the expression of KLK4 and that TGF- $\beta$  had a reducing effect. Possible HIF and SMAD binding sites on the KLK4 promoter region were also confirmed by EMSA experiments.

**KEYWORDS:** KLK4, Prostate cancer, Hypoxia, TGF- $\beta$ , Gene regulation.

Science Code / Codes : 20316, 20606, 20610

Page Number :218

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kallikrein-Related Peptidaz (KLK) Ailesi.....	1
1.1.1 KLK1.....	4
1.1.2 KLK2, KLK3 ve KLK5 .....	4
1.1.3 KLK6.....	5
1.1.4 KLK7 ve KLK8.....	5
1.1.5 KLK9... ..	6
1.1.6 KLK10. ....	6
1.1.7 KLK11 ve KLK12.....	6
1.1.8 KLK13, KLK14 ve KLK15 .....	7
1.2 KLK4 .....	7
1.3 Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)/SF-MET Sinyalizasyonu.....	12
1.4 Pro-HGF/SF Aktivasyonunda Yer Alan Proteazlar .....	12
1.5 Hormon Bağımlı Kanserler ve KLK4.....	13
1.6 Prostat Kanseri .....	13
1.7 TGF- $\beta$ Sinyal İletim Yolu.....	17
1.8 SMAD Proteinlerinin Temel Özellikleri.....	18
1.8.1 SMAD Bağımlı TGF- $\beta$ Sinyal İletim Yolu.....	20
1.9 Hipoksik Yol.....	21
<b>2. TEZ ÇALIŞMASININ PLANI VE KAPSAMI</b> .....	<b>23</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>26</b>
3.1 Materyal .....	26
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kit, Kimyasal, Lohoratuvar Malzemeleri ve Cihazlar .....	26
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Vektörler.....	28
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları.....	29
3.1.4 Bakteriyel Kültür Ortamı .....	30
3.1.5 Antibiyotikler .....	30
3.1.6 IPTG VE X-Gal.....	30
3.1.7 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	30
3.2 Yöntemler .....	31
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu .....	31
3.2.2 Hücre Kültüründe Gerçekleştirilen Çalışmalar .....	31
3.2.2.1 Hücre Kültürü Malzeme Hazırlığı.....	31
3.2.2.1.1 Hücre Besiyerinin (Medyumunun) Hazırlanması .....	31
3.2.2.1.2 FCS (Fetal Calf Serum).....	31

3.2.2.1.1.3	PBS ( Phosphate-Buffered Salin)Tampon Çözeltisinin Hazırlanması .....	31
3.2.2.1.1.4	Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması .....	32
3.2.2.2	Çalışmada Kullanılacak Hücre Soylarının Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulması	32
3.2.2.3	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı .....	32
3.2.2.4	MTT Çalışması (TGF- $\beta$ Sitokininin ve CoCl <sub>2</sub> ' nin Sitotoksik Etkisini Test Etmek için) .....	33
3.2.3	mRNA Seviyesindeki Etkilerin Analizi ile İlgili Teknikler.....	33
3.2.3.1	Primer Dizayını .....	33
3.2.3.2	Farklı Hücre Hatlarından KLK4 mRNA İfadesi için Deney Kurulması.....	34
3.2.3.3	Deney Düzeninin Kurulması (TGF- $\beta$ ve CoCl <sub>2</sub> Uygulamaları) ve RNA İzolasyonu .....	34
3.2.3.4	RNA Miktarlarının Belirlenmesi.....	35
3.2.3.5	Formaldehit Jel Elektroforezi (RNA jeli).....	35
3.2.3.6	cDNA Sentezi (qRT- PZR Reaksiyonu) .....	36
3.2.3.7	İnsan $\beta$ 2 Mikroglobulin (H $\beta$ 2 ) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile cDNA' ların Kontrolü .....	36
3.2.3.8	Gerçek Zamanlı PZR.....	36
3.2.4	Protein ile İlgili Teknikler .....	38
3.2.4.1	Farklı Hücre Hatlarından KLK4 Protein İfadesi için Deney Düzeninin Kurulması .....	38
3.2.4.2	Deney Düzeninin Kurulması (TGF- $\beta$ ve CoCl <sub>2</sub> Uygulamaları) ve Protein Ekstraktlarının Hazırlanması.....	38
3.2.4.3	Protein Miktarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi.....	39
3.2.4.4	SDS PAGE .....	40
3.2.4.5	SDS Jelinin Blotlanması.....	41
3.2.4.6	Proteinlerin Belirlenmesi.....	41
3.2.5	İmmunofloresans Yöntemi (IFC).....	42
3.2.6	KLK4 Promotor Klonlama Çalışmaları .....	43
3.2.6.1	Primer Tasarımı .....	43
3.2.6.2	Genomik DNA İzolasyonu .....	43
3.2.6.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR).....	44
3.2.6.4	DNA Agaroz Jel Elektroforezi .....	44
3.2.6.5	Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması .....	45
3.2.6.6	DNA Miktar Tayini .....	45
3.2.6.7	PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması .....	45
3.2.7	Transformasyon.....	46
3.2.7.1	Kompetant Hücre Hazırlanması .....	46
3.2.7.2	Kompetant Hücrenin Etkinliğinin Hesaplanması .....	46
3.2.7.3	Vektörün Kompetant Hücreye Transformasyonu .....	47
3.2.8	Plazmit DNA İzolasyonu .....	47
3.2.8.1	Küçük Ölçekte Plazmit DNA (MiniPrep) İzolasyonu.....	47
3.2.8.2	Büyük Ölçekte Plazmit DNA (MidiPrep) İzolasyonu.....	47
3.2.9	DNA' nın Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi.....	47
3.2.10	Sekanslama .....	48
3.2.11	pMet-Luc Reporter (Haberci) Vektörüne Alt Klonlama .....	48
3.2.12	Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Teknikler .....	49
3.2.12.1	Plazmitlerin Geçici Transfeksiyonu .....	49
3.2.12.2	Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	50

3.2.12.3 SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi.....	50
3.2.13 İnhibisyon Çalışmaları.....	51
3.2.13.1 Protein ve RNA eldesi.....	51
3.2.13.1.1 Deney Düzeninin Kurulması.....	51
3.2.13.2 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi .....	52
3.2.13.2.1 KLK4 Promotorları olan P2 ve P3 içeren Plazmitlerin Transfeksiyonu ...	52
3.2.14 DNA- Protein Etkileşimi ile ilgili Teknikler .....	53
3.2.14.1 Deney Düzeninin Kurulması, PC-3 ve LNCaP hücrelerinden Nükleer Ekstraktların Hazırlanması. ....	53
3.2.14.2 Oligoların Etiketlenmesi.....	53
3.2.14.3 Oligonükleotidlerin Bağlanması.....	54
3.2.14.4 Bağlanma Reaksiyonu .....	54
3.2.14.5 Jelin Yürütülmesi ve Proteinlerin Membrana Transferi.....	55
<b>4. SONUÇLAR.....</b>	<b>56</b>
4.1 Kimyasal Hipoksi Modelinin Oluşturulması ve Doğrulanması.....	56
4.2 TGF- $\beta$ Sitokininin ve Kimyasal Hipoksi Ajanı Olan CoCl <sub>2</sub> ' nin PC-3 ve LNCaP Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi (MTT Testi) .....	58
4.3 mRNA ile İlgili Deneyler.....	62
4.3.1 KLK4 Ekspresyon Primer Dizaynı ve Optimizasyonu .....	62
4.3.2 Farklı Hücre Hatlarında KLK4 Geninin mRNA İfadesinin Belirlenmesi .....	68
4.3.3 Hücrelere TGF- $\beta$ ve CoCl <sub>2</sub> Uygulamaları sonrası RNA İzolasyonları.....	69
4.3.4 cDNA Eldesi ve Kontrolü .....	71
4.3.5 Gerçek Zamanlı PZR.....	73
4.4 Protein ile İlgili Deneyler.....	80
4.4.1 Farklı Hücre Hatlarında KLK4' ün Protein İfadesinin Belirlenmesi .....	80
4.4.2 Deney Düzeninin Kurulması (TGF- $\beta$ ve CoCl <sub>2</sub> Uygulaması) ve Western Blot .....	81
4.4.3 IFC ÇALIŞMALARI .....	108
4.5 İnhibisyon Çalışmaları .....	111
4.5.1 RNA ve Protein Eldesi .....	111
4.5.2 İnhibitör Uygulaması Yapılan Gruplardan RNA İzolasyonu.....	111
4.5.3 İnhibitör Çalışmalarında cDNA Eldesi ve Kontrolü.....	114
4.5.4 Gerçek Zamanlı PZR.....	115
4.5.5 İnhibisyon Çalışmalarında Western Blot ile Proteinlerin Belirlenmesi.....	119
4.6 İnsan KLK4 Promotor Parçalarının Klonlanması.....	129
4.6.1 KLK4 Promotor Biyoinformatik Analizleri.....	129
4.6.2 Genomik DNA İzolasyonu.....	135
4.6.3 İnsan KLK4 Promotorlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması .....	135
4.6.4 İnsan KLK4 Promotorlarının pGEM-T-Easy Vektörüne Klonlanması .....	141
4.6.5 İnsan KLK4 Promotorlarının pMetLuc Haberci Vektörüne Alt Klonlaması.....	145
4.6.6 Dizi Analizleri.....	149
4.7 Geçici Transfeksiyon Deneyleri .....	149
4.7.1 Büyük Ölçekli Plazmit Eldesi .....	149
4.7.2 Plazmitlerin Kontrolü.....	149
4.7.3 Geçici Transfeksiyon ile KLK4 Promotor Parçalarının Bazal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	152
4.7.4 Geçici Transfeksiyon ile Promotor Parçalarının Hipoksik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	157



4.7.5 TGF- $\beta$ ' nın Promotor Parçalarının Normoksik ve Hipoksik Aktivitelerine Etkisi..	160
4.7.6 KLK4 760 bç ve 391bç Promotor Parçalarının İnhibisyon Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	164
4.8 EMSA Çalışmaları.....	167
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>174</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>185</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>193</b>
EK A: Kullanılan Büyüklük Belirteçleri .....	193
EK B: Kullanılan Vektörler.....	195
EK C: KLK4 Promotorları Dizi Analizi Sonuçları .....	198

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Kalikreine bağlı peptidazların genleri ve ekzon / intron organizasyonu .....	2
Şekil 1.2: Kallikrein ile ilişkili peptidazlar ve kanser.....	4
Şekil 1.3: KLK4 geninin genomik ve protein yapısı .....	8
Şekil 1.4: Prostat kanserinde KLK4 ile başlatılmış çift parakrin mekanizması ve PAR1 aracılı tümör-stroma etkileşimi.....	10
Şekil 1.5: Prostat kanserinin erken evrelerinde KLK4'ün muhtemel durumu.....	15
Şekil 1.6: SMAD proteinleri (R-SMAD, Co SMAD ve I-SMAD) ve yapısal elemanları..	19
Şekil 1.7: Smad2, Smad3 ve Smad4 arasındaki yapısal farklılıklar.....	20
Şekil 1.8: SMAD bağımlı TGF- $\beta$ sinyal iletim yolu.....	21
Şekil 1.9: CoCl <sub>2</sub> ile hipoksik koşul mekanizması .....	22
Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmaya ait akış diyagramı. ....	25
Şekil 3.1: pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektörlerinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 3.2: pMET-Luc ve pSEAP2 kontrol vektörlerinin şematik gösterimi. ....	29
Şekil 3.3: PC-3 ve LNCaP hücrelerinin mikroskop 10x40' lik büyütme görüntüsü. ....	30
Şekil 3.4: Hemositometre lamı alanı.....	33
Şekil 3.5: Promega Viafect <sup>TM</sup> Transfection Reagent Kit kullanımının şematik anlatımı. ....	49
Şekil 4.1: Kimyasal hipoksi modelinde PC-3 hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ mRNA seviyesi.....	57
Şekil 4.2: Kimyasal hipoksi modelinde LNCaP hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ mRNA seviyesi ....	57
Şekil 4.3: FCS ve BSA' nın PC-3 hücre proliferasyonuna etkisi. ....	59
Şekil 4.4: FCS ve BSA' nın LNCaP hücre proliferasyonuna etkisi.....	59
Şekil 4.5: TGF- $\beta$ ve kimyasal hipoksi ajanı olan CoCl <sub>2</sub> ' nin PC-3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.....	60
Şekil 4.6: Kimyasal hipoksi ajanı olan CoCl <sub>2</sub> ' nin erken zaman dilimlerinde PC-3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi. ....	61
Şekil 4.7: TGF- $\beta$ ve kimyasal hipoksi ajanı olan CoCl <sub>2</sub> ' nin LNCaP hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.....	61
Şekil 4.8: KLK4 mRNA dizisi üzerinde sentezletilen primer dizileri. ....	63
Şekil 4.9: KLK4 ekzonları üzerinden dizayn edilen primerlerin şematize şekli.....	64
Şekil 4.10: KLK4 ekspresyon primerleri (F4-R3, F5-R3, F4-R4, F5-R4) ve H $\beta$ 2 primerleri ile PC-3 cDNA kalıp ile yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	65
Şekil 4.11: KLK4 ekspresyon primerleri ( F5-R3) ve H $\beta$ 2 primerleri ile LNCaP cDNA kalıp ile yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	66
Şekil 4.12: SMAD2, SMAD3, SMAD4, HIF-1 $\alpha$ ve H $\beta$ 2 primerleri ile farklı cDNA kaynakları ile yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. ....	67
Şekil 4.13: Farklı hücre hatlarından yapılan cDNA' ların H $\beta$ 2 PZR elektroforez jel görüntüsü. ....	68
Şekil 4.14: Farklı hücre hatlarında KLK4 mRNA ifadesi.....	69
Şekil 4.15: PC-3 hücre hattında kurulan deney sonucu elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' lar .....	70
Şekil 4.16: LNCaP hücre hattında kurulan deney sonucu elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' lar). ....	71
Şekil 4.17: PC-3 hücre hattından izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' ı elektroforez jel görüntüsü .....	72

<b>Şekil 4.18:</b> LNCaP hücre hattından izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' ı elektroforez jel görüntüsü .....	73
<b>Şekil 4.19:</b> Çalışmamızda kullandığımız kimyasal hipoksi modelinde PC-3 Hücre Hattında Normoksik ve Hipoksik Koşullarda HİF-1 $\alpha$ mRNA ifadesinin Gerçek zamanlı PZR ile doğrulanması .....	74
<b>Şekil 4.20:</b> PC-3 Hücre Hattında tüm gruplarda HİF-1 $\alpha$ mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi .....	75
<b>Şekil 4.21:</b> PC-3 Hücre Hattında KLK4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi .....	75
<b>Şekil 4.22:</b> PC-3 Hücre Hattında SMAD2 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi.....	76
<b>Şekil 4.23:</b> PC-3 Hücre Hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi.....	76
<b>Şekil 4.24:</b> Çalışmamızda kullandığımız kimyasal hipoksi modelinde LNCaP Hücre Hattında Normoksik ve Hipoksik Koşullarda HİF-1 $\alpha$ mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile doğrulanması .....	77
<b>Şekil 4.25:</b> LNCaP Hücre Hattında Tüm gruplarda HİF-1 $\alpha$ mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. ....	78
<b>Şekil 4.26:</b> (A) LNCaP hücre hattında KLK4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat). (B) LNCaP hücre hattında SMAD2 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat), (C) LNCaP hücre hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat), (D) LNCaP hücre hattında SMAD4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat).....	79
<b>Şekil 4.27:</b> Farklı hücre hatlarında KLK4' ün protein ifadesi (SW480 kolon kanseri hücre hattı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı, HEP 3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, HUVEC umbilikal ven endotel hücresi, PC-3 prostat kanseri hücre hattı, LNCaP prostat kanseri hücre hattı).....	81
<b>Şekil 4.28:</b> (A) PC-3 hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1-3 saatler. (B) PC-3 Hücre Hattında KLK4 Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6-24 saatler.....	83
<b>Şekil 4.29:</b> (A) PC-3 hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1-3 saatler. (B) PC-3 Hücre Hattında SMAD2/3 Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6-24 saatler. ....	85
<b>Şekil 4.30:</b> (A) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonuçları (B) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonuçları (C) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (D) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları.....	87
<b>Şekil 4.31:</b> (A) PC-3 hücre hattında NFK $\beta$ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonuçları (B) PC-3 hücre hattında NFK $\beta$ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonuçları (C) PC-3 hücre hattında NFK $\beta$ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (D) PC-3 hücre hattında NFK $\beta$ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları.....	89
<b>Şekil 4.32:</b> (A) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonucu. (B) PC-3 3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonucu. (C) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6	

- saat sonucu. (D) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. .... 91
- Şekil 4.33:** (A) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonucu. (B) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonucu. (C) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (D) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. .... 92
- Şekil 4.34:** (A) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonucu. (B) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonucu. (C) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (E) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. .... 94
- Şekil 4.35:** (A) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu.. (C) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (E) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu. .... 96
- Şekil 4.36:** (A) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu.(C) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (E) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu. .... 97
- Şekil 4.37:** (A) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (B) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları (C) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonuçları (D) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonuçları.99
- Şekil 4.38:** (A) LNCaP hücre hattında NFK $\beta$  protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (B) LNCaP hücre hattında NFK $\beta$  protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları (C) LNCaP hücre hattında NFK $\beta$  protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonuçları (D) LNCaP hücre hattında NFK $\beta$  protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonuçları. .... 101
- Şekil 4.39:** (A) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (D) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu. .... 103
- Şekil 4.40:** (A) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (D) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu. .... 105

<b>Şekil 4.41:</b> (A) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (E) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu. ....	107
<b>Şekil 4.42:</b> PC-3 Hücre Hattında KLK4 Proteinlerinin TGF- $\beta$ etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü. ....	108
<b>Şekil 4.43:</b> PC-3 Hücre Hattında SMAD2/3 Proteinlerinin TGF- $\beta$ etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü. ....	109
<b>Şekil 4.44:</b> PC-3 Hücre Hattında HIF-1 $\alpha$ Proteinlerinin TGF- $\beta$ etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü. ....	109
<b>Şekil 4.45:</b> LNCaP Hücre Hattında KLK4 Proteinlerinin TGF- $\beta$ etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü. ....	110
<b>Şekil 4.46:</b> LNCaP Hücre Hattında SMAD2/3 Proteinlerinin TGF- $\beta$ etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü. ....	110
<b>Şekil 4.47:</b> LNCaP Hücre Hattında HIF-1 $\alpha$ Proteinlerinin TGF- $\beta$ etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü. ....	111
<b>Şekil 4.48:</b> PC-3 hücre hattında normal oksijen koşullarında kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü ..	112
<b>Şekil 4.49:</b> PC-3 hücre hattında hipoksik koşullarda kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü.....	112
<b>Şekil 4.50:</b> LNCaP hücre hattında normal oksijen koşullarında kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü ..	113
<b>Şekil 4.51:</b> LNCaP hücre hattında hipoksik koşullarda kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü.....	113
<b>Şekil 4.52:</b> PC-3 hücre hattında normal oksijen koşullarından izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' 1 jel görüntüsü .....	114
<b>Şekil 4.53:</b> PC-3 hücre hattında hipoksik koşullarda oluşturulan deney grubundan izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' 1 jel görüntüsü. ....	114
<b>Şekil 4.54:</b> LNCaP hücre hattında normal oksijen koşullarından izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' 1 jel görüntüsü .....	115
<b>Şekil 4.55:</b> LNCaP hücre hattında hipoksik koşullarda oluşturulan deney grubundan izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' 1 jel görüntüsü .....	115
<b>Şekil 4.56:</b> PC-3 hücre hattında yolak inhibitörlerinin KLK4 mRNA seviyesine etkisi. .	116
<b>Şekil 4.57:</b> (A) PC-3 hücre hattında tüm gruplarda HIF-1 $\alpha$ mRNA ifadesinin Real Time PZR ile analizi (B) PC-3 hücre hattında yolak inhibitörlerinin SMAD2 mRNA seviyesine etkisi (C) PC-3 Hücre Hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Real Time PZR ile analizi (D) PC-3 Hücre Hattında SMAD4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. ....	117
<b>Şekil 4.58:</b> LNCaP hücre hattında yolak inhibitörlerinin KLK4 mRNA seviyesine etkisi	118
<b>Şekil 4.59:</b> (A): LNCaP Hücre Hattında tüm gruplarda HIF-1 $\alpha$ mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. (B): LNCaP hücre hattında yolak inhibitörlerinin SMAD2 mRNA seviyesine etkisi. (C): LNCaP Hücre Hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. (D): LNCaP Hücre Hattında SMAD4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. ....	119
<b>Şekil 4.60:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin KLK4 protein seviyesine etkisi. ....	120
<b>Şekil 4.61:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SMAD2/3 protein seviyesine etkisi. ....	121

<b>Şekil 4.62:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin PI3K protein seviyesine etkisi. ....	122
<b>Şekil 4.63:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin NFK $\beta$ protein seviyesine etkisi.....	122
<b>Şekil 4.64:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 46 kDa protein seviyesine etkisi. ....	123
<b>Şekil 4.65:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 54 kDa protein seviyesine etkisi. ....	123
<b>Şekil 4.66:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin p38 MAPK protein seviyesine etkisi. ....	124
<b>Şekil 4.67:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin KLK4 protein seviyesine etkisi. ....	125
<b>Şekil 4.68:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SMAD2/3 protein seviyesine etkisi.....	126
<b>Şekil 4.69:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin PI3K protein seviyesine etkisi. ....	126
<b>Şekil 4.70:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin NFK $\beta$ protein seviyesine etkisi. ....	127
<b>Şekil 4.71:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 46 kDa protein seviyesine etkisi. ....	127
<b>Şekil 4.72:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 54 kDa protein seviyesine etkisi. ....	128
<b>Şekil 4.73:</b> LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin p38 MAPK protein seviyesine etkisi.....	129
<b>Şekil 4.74:</b> KLK4 Promotor (P) Parçalarının temsili şekli; P1: 1104 bç (-447/+657), P2: 760 bç (-103/+657), P3: 391 bç (+267/+657), P4: 102bç (+555/+657). ....	130
<b>Şekil 4.75:</b> KLK4 promotor bölgesinin NCBI' dan tespiti. ....	131
<b>Şekil 4.76:</b> KLK4 gen dizisi. (Sarı renkler KLK4 promotor dizileri, pembe renkler KLK4 ekzonları, yeşil renkler KLK4 intronları ,mavi renk 3'UTR bölgelerini göstermektedir, siyah oklar forward primerleri, kırmızı ok ise tüm promotor parçalarında kullanılan ortak reverse diziyi işaret etmektedir).....	133
<b>Şekil 4.77:</b> KLK4 promotor bölgesine olası transkripsiyon bağlanma bölgeleri (Gri işaretlenen bölgeler olası bağlanan transkripsiyon faktörü bölgelerini göstermektedir, mor renkler promotor dizileri).....	133
<b>Şekil 4.78:</b> Kullanılan restriksiyon endonükleaz Enzim dizileri.....	134
<b>Şekil 4.79:</b> İzole edilen genomik DNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	135
<b>Şekil 4.80:</b> PZR No:1 Agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	137
<b>Şekil 4.81:</b> KLK4 102 bç promotor primerinin PZR No: 3 agaroz jel elektroforez görüntüsü. ....	137
<b>Şekil 4.82:</b> KLK4 Promotor Parçaları PZR No:2 Agaroz jel Elektroforezi Görüntüsü....	138
<b>Şekil 4.83:</b> Jelden geri kazanılan KLK4 promotor parçaları agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	138
<b>Şekil 4.84:</b> Jelden geri kazanılan KLK4 promotor parçası (102 bç) agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	139
<b>Şekil 4.85:</b> KLK4 Promotor Parçaları PZR No:4 Agaroz jel Elektroforezi Görüntüsü....	140
<b>Şekil 4.86:</b> Jelden geri kazanılan KLK4 promotor parçaları agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	141
<b>Şekil 4.87:</b> Ligasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	142
<b>Şekil 4.88:</b> pGEM-T-Easy vektörüne klonlanan KLK4 102 bç promotor parçasının agaroz elektroforezde kesim görüntüsü.....	143

<b>Şekil 4.89:</b> pGEM-T easy kesim sonuçları .....	144
<b>Şekil 4.90:</b> KLK4 promotor parçası içeren pGEMt-Easy ve boş pMetLuc Vektörlerinin Restriksiyon Kesimi.....	145
<b>Şekil 4.91:</b> KLK4 102 bç promotor parçası içeren pGEMt-Easy vektörlerinin restriksiyon kesim görüntüsü.....	146
<b>Şekil 4.92:</b> Kanamisin içeren LB Agar ile hazırlanan besi yerine ekilen pMetLuc Reporter+promotor parçası içeren koloniler.....	148
<b>Şekil 4.93:</b> KLK4 promotor parçası içeren pMetLuc Vektörlerinin Restriksiyon Kesimi, sıralamada ilk kuyu kesilmemiş vektör sonraki aynı vektörün kesimi.....	148
<b>Şekil 4.94:</b> 102 bç promotor parçası içeren pMetLuc vektörlerinin restriksiyon kesimi..	149
<b>Şekil 4.95:</b> Yüksek kopyalı plazmit eldesi kesim agaroz jel görüntüsü.....	151
<b>Şekil 4.96:</b> 102 bç Midi Prep. Elektroforez Jel Görüntüsü .....	152
<b>Şekil 4.97:</b> PC-3 hücre hattında 1104 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi.....	153
<b>Şekil 4.98:</b> PC-3 hücre hattında 760 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi.....	154
<b>Şekil 4.99:</b> PC-3 hücre hattında 394 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi.....	155
<b>Şekil 4.100:</b> LNCaP hücre hattında 1104 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.....	155
<b>Şekil 4.101:</b> LNCaP hücre hattında 760 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.....	156
<b>Şekil 4.102:</b> LNCaP hücre hattında 391 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti. ....	156
<b>Şekil 4.103:</b> 1104 bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler. ....	158
<b>Şekil 4.104:</b> 760 bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler. ....	158
<b>Şekil 4.105:</b> 391bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler. ....	159
<b>Şekil 4.106:</b> 102bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler. ....	159
<b>Şekil 4.107:</b> 1104bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl <sub>2</sub> ) etkisi .....	161
<b>Şekil 4.108:</b> 760bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl <sub>2</sub> ) etkisi .....	162
<b>Şekil 4.109:</b> 391bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl <sub>2</sub> ) etkisi .....	163
<b>Şekil 4.110:</b> 102bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl <sub>2</sub> ) etkisi. ....	164
<b>Şekil 4.111:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda KLK4 760bç promotorunun, yolak inhibitörleri üzerindeki transkripsiyonel aktivitesi. ....	166
<b>Şekil 4.112:</b> PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda KLK4 391bç promotorunun, yolak inhibitörleri üzerindeki transkripsiyonel aktivitesi. ....	167
<b>Şekil 4.113:</b> KLK4 promotorunda dizayn edilen EMSA primerlerinin temsili şekli.....	168
<b>Şekil 4.114:</b> KLK4 HRE bağlanma bölgesine göre dizayn edilen HİF-1α (-80/-52) bölgesinin PC-3 hücrelerinde, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu ...	169
<b>Şekil 4.115:</b> KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin PC-3 hücrelerinde normal oksijen koşullarında ve normoksik TGF-β da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu. ....	170

<b>Şekil 4.116:</b> KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin PC-3 hücrelerinde hipoksik koşullarda ve hipoksik TGF- $\beta$ da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu. ....	171
<b>Şekil 4.117:</b> KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin LNCaP hücrelerinde normal oksijen koşullarında ve normoksik TGF- $\beta$ da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu. ....	172
<b>Şekil 4.118:</b> KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin LNCaP hücrelerinde hipoksik koşullarda ve hipoksik TGF- $\beta$ da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu (C: DNA-protein kompleksi).....	173
<b>Şekil A.1</b> : Fermentas 1 kb DNA marker.....	193
<b>Şekil A.2</b> : Thermo Scientific 100 bp DNA marker.....	193
<b>Şekil A.3</b> : PageRuler Prestained Protein marker.....	194
<b>Şekil B. 1</b> : pGEM <sup>TM</sup> -T Easy vektör haritası (Promega).....	195
<b>Şekil B. 2</b> : pMetLuc-Reporter vektör haritası (Clontech).....	196
<b>Şekil B. 3</b> : SEAP-2 kontrol vektör haritası.....	197



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 3.1:</b> Çalışmanın tamamında kullanılan kitlerin listesi. ....	26
<b>Tablo 3.2:</b> Çalışmanın tamamında kullanılan kimyasal malzemelerin listesi. ....	26
<b>Tablo 3.3:</b> Çalışmanın tamamında kullanılan laboratuvar malzemelerin listesi. ....	27
<b>Tablo 3.4:</b> Çalışmanın tamamında kullanılan laboratuvar cihazlarının listesi. ....	27
<b>Tablo 3.5:</b> Formaldehit Jel Elektroforezi çözeltileri. ....	35
<b>Tablo 3.6:</b> DEPC' li dH <sub>2</sub> O. ....	36
<b>Tablo 3.7:</b> H $\beta$ 2 PZR koşulları. ....	36
<b>Tablo 3.8:</b> Gerçek Zamanlı PZR bileşenleri. ....	37
<b>Tablo 3.9:</b> Gerçek Zamanlı PZR koşulları. ....	37
<b>Tablo 3.10:</b> Gerçek Zamanlı PZR deneyinde kullanılan primer bilgileri. ....	37
<b>Tablo 3.11:</b> Ripa Buffer çözeltisinin içeriği. ....	39
<b>Tablo 3.12:</b> SDS PAGE jel solüsyonları. ....	40
<b>Tablo 3.13:</b> Western Blot çözeltileri. ....	40
<b>Tablo 3.14:</b> Primer ve Sekonder Antikor Bilgileri. ....	41
<b>Tablo 3.15:</b> DNA Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri. ....	45
<b>Tablo 3.16:</b> Kompetan Hücre için Kullanılan Çözeltiler. ....	46
<b>Tablo 3.17:</b> Lusiferaz aktivitesi için kullanılan çözeltiler. ....	50
<b>Tablo 3.18:</b> Seap aktivite ölçüm çözeltileri. ....	50
<b>Tablo 3.19:</b> Yolak inhibitörleri. ....	52
<b>Tablo 3.20:</b> Nükleer Ekstrak Solüsyonları. ....	53
<b>Tablo 3.21:</b> EMSA deneyinde kullanılan ve etiketlenen primerler. ....	54
<b>Tablo 4.1:</b> HİF-1 $\alpha$ ve H $\beta$ 2 forward ve reverse primer bilgileri. ....	56
<b>Tablo 4.2:</b> KLK4 ekspresyon primer dizileri. ....	64
<b>Tablo 4.3:</b> KLK4 (F4-R3, F5-R3, F4-R4, F5-R4) ve H $\beta$ 2 primerleri ile PC-3 sitokin (TGF- $\beta$ ) uygulanmış cDNA kalıp ile yapılan PZR içeriği. ....	65
<b>Tablo 4.4:</b> KLK4 (F4-R3, F5-R3, F4-R4, F5-R4) ve H $\beta$ 2 primerleri PC-3 cDNAsı ile yapılan PZR koşulları. ....	65
<b>Tablo 4.5:</b> SMAD2, SMAD3, SMAD4, HİF-1 $\alpha$ , ve H $\beta$ 2 primerleri ile farklı cDNA kaynakları ile yapılan PZR içeriği. ....	67
<b>Tablo 4.6:</b> SMAD2, SMAD3, SMAD4, HİF-1 $\alpha$ , KLK4 ve H $\beta$ 2 primerleri ile farklı cDNA kaynakları ile yapılan PZR koşulları. ....	67
<b>Tablo 4.7:</b> H $\beta$ 2 PZR koşulları. ....	71
<b>Tablo 4.8:</b> Kullanılan inhibitörler ve son konsantrasyonları. ....	111
<b>Tablo 4.9:</b> İnsan KLK4 promotor dizileri. ....	134
<b>Tablo 4.10:</b> KLK4 promotor çoğaltma PZR No:1 ve No:2 (One Taq.ile). ....	136
<b>Tablo 4.11:</b> KLK4 promotor çoğaltma PZR No:3 (One Taq.ile). ....	136
<b>Tablo 4.12:</b> KLK4 PZR No:1,2 ve No:3 döngü koşulları (One Taq ile). ....	136
<b>Tablo 4.13:</b> KLK4 Promotor çoğaltma Taq DNA Polimeraz ile PZR No:4 ....	139
<b>Tablo 4.14:</b> KLK4 Promotor Çoğaltma Taq ile PZR No:4 Koşulları. ....	140
<b>Tablo 4.15:</b> pGEM-T Easy vektörüne ligasyon koşulları. ....	141
<b>Tablo 4.16:</b> KLK4 promotorlarının pGEM-T Easy vektöründen kesim koşulları. ....	143
<b>Tablo 4.17:</b> KLK4 promotorlarının pGEM-T Easy vektöründen kesim koşulları. ....	145

<b>Tablo 4.18:</b> KLK4 promotorlarının pMET-Luc Reporter vektörüne ligasyon koşulları..	147
<b>Tablo 4.19:</b> KLK4 1104 bç, 760bç, 391 bç ve 102 bç için kesim koşulları. ....	150
<b>Tablo 4.20:</b> pMETLuc kontrol vektörü için kesim koşulları.....	150
<b>Tablo 4.21:</b> pSEAP2 kontrol vektörü için kesim koşulları.....	150

## SEMBOL LİSTESİ

<b>BMP</b>	: Bone morphogenic factor
<b>BT-474</b>	: Göğüs karsinoması hücre hattı
<b>CAF</b>	: Kansere bağlı fibroblast
<b>Co-SMAD</b>	: Ortak mediatör
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	: Kobalt klorür
<b>CRPC</b>	: Hormon yoksun dirençli prostat kanseri
<b>DU145</b>	: Prostat kanseri hücre hattı
<b>DEPC</b>	: Dietil pirokarbonat
<b>DFO</b>	: Demir şelatörü deforoksamin
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified eagles medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiniükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetraasetik asit
<b>ECM</b>	: Hücre dışı matris
<b>EMPS1</b>	: Enamel matris serin proteaz 1
<b>EMSA</b>	: Elektromobility sHİFt assay
<b>EMT</b>	: Epitelyal-mezenşimal geçiş
<b>EtBr</b>	: Etidyum bromür
<b>FCS</b>	: Fetal sığır serum
<b>HGF</b>	: Hepatosit büyüme faktörü
<b>HİF</b>	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
<b>HRE</b>	: Hipoksi response element
<b>H<math>\beta</math>2</b>	: Human beta-2 microglobulin
<b>IGF</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>I-SMAD</b>	: İnhibitör SMAD
<b>kb</b>	: Kilo baz çifti
<b>KLK</b>	: Kallikrein ile ilgili peptidaz
<b>LNCaP</b>	: İnsan prostat kanseri hücre hattı
<b>MET</b>	: MNNG HOS dönüştürücü gen
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>MH1</b>	: Mad-Homology 1
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorid
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NES</b>	: Nükleer sinyal taşıma
<b>NCBI</b>	: National center for biotechnology information
<b>PAR</b>	: Proteazla aktifleştirilen reseptör
<b>PBS</b>	: Fosfat buffer salin
<b>PC-3</b>	: İnsan prostat kanseri hücre hattı
<b>Pca</b>	: Prostat kanseri
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PSA</b>	: Prostata spesifik antijen
<b>R-SMAD</b>	: Regülatör SMAD
<b>RCC</b>	: Renal hücreli karsinoma

<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SAD</b>	: SMAD4 aktivasyon domaini
<b>SDS</b>	: Sodyum dodosil sülfat
<b>SF</b>	: Salınım faktörü
<b>SMAD</b>	: Transkripsiyon faktörü
<b>TE</b>	: Tripsin-EDTA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotel büyüme faktörü
<b>VEGFR</b>	: Vasküler endotel büyüme faktör reseptörü 2
<b>VHL</b>	: Tümör baskılayıcı protein
<b>WPMY1</b>	: Prostattan türetilmiş stromal hücre dizisi

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Tübitak 118Z369 nolu 1001 projesi ile desteklenmiş ve Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması sürecinde, beni destekleyen YÖK 100/2000 ve BİDEB 2211/A Genel Yurtiçi Doktora Burs programlarına sonsuz teşekkürler.

Tez çalışması sürecinde ve hayatımın her anında her zaman bana yol gösteren, ilgisini, bilgisini ve sevgisini esirgemeyen, mesleki ve hayat tecrübesiye her zaman yanımda olan, mesleki ve ahlaki yönden kendisini örnek aldığım, değerli hocam Doç. Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU' na,

Tez çalışmam süresince her çıkmaza düştüğümde yardımına koşan, sonsuz bilgisiyle her daim yanımda olan saygı değer hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR' a,

Değerli fikirleriyle ve destekleriyle tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ, Doç. Dr. Aylin ER, Prof. Dr. Rahşan ILIKÇI SAĞKAN, Doç Dr. Hatice YILDIRIM' a

Tez çalışmam boyunca yardımlarını benden esirgemeyen ve her konuda yanımda olan değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Derya OKUYAN' a

Doktora eğitimim süresince bilgilerini benimle paylaşan Uzm. Dr. Esra TOKAY, Araş. Gör. Dr. Nelin HACIOĞLU' na,

Yoğun olarak çalıştığım laboratuvar günlerimde her zaman bana yardıma koşan, ailelerimizden daha çok görüştüğümüz Aysu BOZKURT, Hanife AKTAŞ ve Uzm. Merve ERCEVAHİR' e

Laboratuvar çalışmaları sürecinde birlikte çalıştığımız Araş.Gör. Serhad ONAT, Uzm. Burcu EFE DAŞKAN, Uzm. Mesut ACAR, Dr. Kübra PASPAL, Rümeyza ŞAHİN, Aylin TÜRKOĞLU, Şevin AVŞAR, Feyza Nur SAV, Yasemin KELEŞ, Alper TACAR, Hasan ÇAPRAZ, Merve DEMİR ve Burcu DONÇ' a

Doktora yapmaya beni teşvik eden ve bu konuda beni heveslendiren, her daim yanımda elimi sımsıkı tutan canım eşim, hayat arkadaşım, birlikte tüm zorluklara maddi manevi göğüs gerdiğimiz en değerlim sayın Beytullah POYRAZLI' ya ailesine ve kendi aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2022**

**FATMA POYRAZLI**

# 1. GİRİŞ

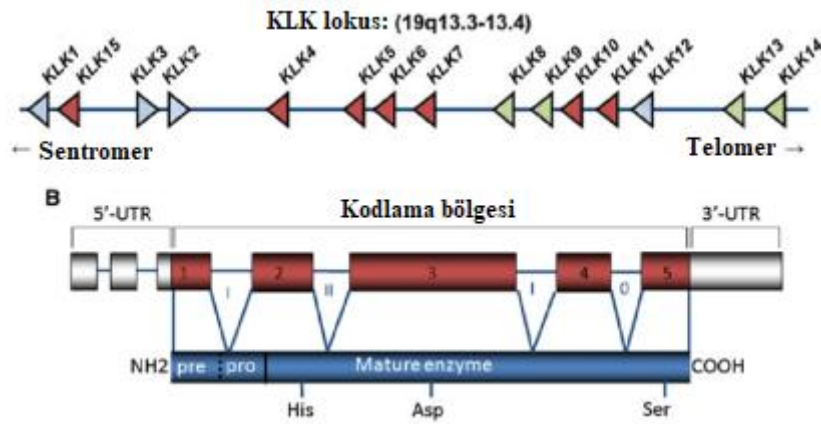
## 1.1 Kallikrein-Related Peptidaz (KLK) Ailesi

İnsan kallikrein ile ilgili peptidaz (KLK) ailesi, polipeptit öncüllerinin işlenmesinde rol oynayan ve çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rollere sahip, serin proteazların kimotripsin (S1) ailesine aittir. KLK' lar hücre dışı substratlara ve fonksiyona sahip salgılanan proteinlerdir. İnsan genomundaki en büyük proteaz geni kümesi tarafından kodlanan, yüksek oranda korunmuş 15 serin proteazdan yani üyeden oluşur. KLK ailesinin ilk üyesi, 1930' lu yıllarda Kraut, Frey ve Werle tarafından pankreasta en bol bulunan proteaz olarak tanımlanmış ve Yunanca' da pankreas (kallikreas) için "kallikrein" dokusu olarak adlandırılmıştır (Emami ve Diamendis 2008, Korkmaz vd. 2004, Xi vd. 2004). KLK ailesi, en iyi tümör işaretçisi olan prostata özgü antijen (PSA) dahil olmak üzere, değerli kanser biyobelirteçlerini kodlayan genleri içerir. Flocks, Ablin, Hara, Li ve Beling, Sensabaugh ve Wang' ın 1960 ve 1970 yıllarının sonlarında yaptıkları çalışmalarda en karakterize KLK, yani KLK3' ün (PSA) keşfedilmesine yol açtı. İlk tanımlanan üç insan kallikrein geni: pankreas / renal kallikrein (KLK1), insan glandüler kallikrein 2 (KLK2) ve prostata özgü antijen (KLK3)' dir (Emami ve Diamendis 2008, Kontos ve Scorilas vd. 2012).

Doku kallikrein ve kallikrein ile ilişkili peptidazlar (KLK), yaklaşık 25-30 kDa' lık 15 homolog, tek zincirli, salgılanmış tripsin veya kimotripsin benzeri serin proteaz ailesinden oluşur. KLK gen ailesi lokusu ~ 300 kb' lik bir alana yayılır, 19q13.3 - q13.4 kromozomal bölgesinde, kromozom 19' un uzun kolunun telomerlerinden 7.5 Mb mesafede bulunur (Diamendis vd. 2000, Kontos ve Scorilas 2012). Ayrıca, her bir KLK geni, N-terminalinde 16 ila 30 amino asitlik bir sinyal peptidi, ardından dört ile dokuz amino asit tortusu olan bir pro-peptid ve bunun içinde kalan bir katalitik alan içeren bir preproenzim olarak bulunur. Proenzim ve olgun enzim formları, sırasıyla salgılama yoluna girişteki sinyal dizisinin ve aktivasyondaki pro peptidin sıralı bölünmesinden kaynaklanmaktadır. KLK proteinlerinin proteolitik aktivitesi, zimogen aktivasyonu, endojen plazma ve doku inhibitörleri ile kompleks oluşum veya kendi kendine parçalanma yoluyla inaktivasyon dahil olmak üzere çeşitli yollarla düzenlenir (Kontos ve Scorilas 2012). KLK' lar arasında, sadece KLK1, KLK2 ve KLK3 / PSA, aktif bölge Asp' den önce konumlandırılmış 9 - 11 amino asit tortusu şeklinde karakteristik kallikrein halkasını içerir; Özellikle, KLK3 / PSA, kininojeni parçalayamamaktadır. Aktif proteazın konformasyonel sağlamlığı için, propeptidin

uzaklaştırılması, Ile / Leu16 a-amonyum grubu ile önemli olan Asp194 yan zincirinin karboksilatı arasında bir tuz köprüsünün oluşmasına neden olur. KLK3, iki farklı konformasyonun enzimatik aktivitesi olmayan olgun sağlam KLK3' e yol açan kapalı veya açık bir konformasyon elde edebilen 11-amino asit kallikrein halkası tarafından uyarlanabilmesidir (Diamendis vd. 2000, Sotiropoulou vd. 2009).

Çeşitli türlerde bugüne kadar tanımlanan tüm doku kallikrein genlerinin ortak özellikleri, beş ekzonun benzer bir genomik organizasyonunu, serin proteaz katalitik aktivitesi için korunmuş bir amino asit rezidüsü ve birinci ekzonda kodlanmış bir sinyal peptid dizisini içerir (Korkmaz vd. 2004).



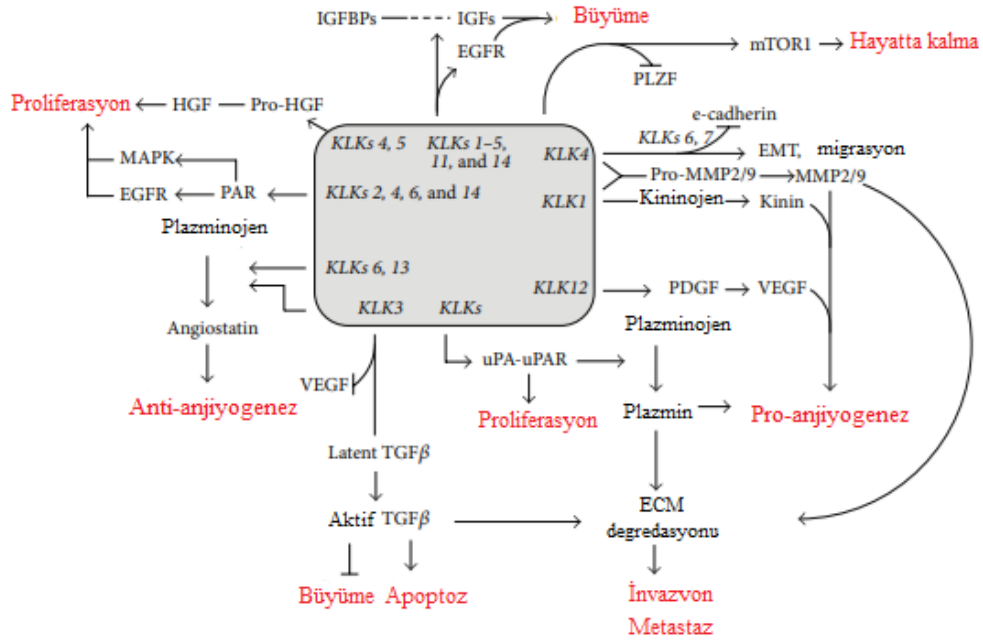
**Şekil 1.1:** Kalikreine bağlı peptidazların genleri ve ekzon / intron organizasyonu (Ohler vd. 20112' den uyarlanmıştır).

KLK' ların anormal ifadesinin, kanser gelişiminin farklı aşamalarında yer aldığı gösterilmiştir. Moleküllerin parçalanması ve hücre dışı matriksin yeniden şekillendirilmesi, hormonların ve/veya sinyal moleküllerinin aktivasyonu, artan hücre proliferasyonuna ve anjiyogeneze yol açar, bu da tümör büyümesi, istilası ve metastaz oluşumuna katkıda bulunur (Lundwall vd. 2021). Bugüne kadar, ailenin birkaç üyesi potansiyel kanser biyolojik belirteçleri olarak bildirilmiştir. Öncelikle prostat, yumurtalık ve göğüs kanserlerinde biyolojik belirteçlerinin değeri olarak değerleri tespit edilmiş, daha yakın tarihli veriler KLK' ların gastrointestinal, baş ve boyun, akciğer ve beyin maligniteleri de dahil olmak üzere diğer birçok kanserde de benzer rolü olduğunu düşündürmektedir. KLK' lar ayrıca hücre yüzeyi reseptörlerini veya diğer proteazları parçalayarak ve böylece aktive ederek sinyal iletim yollarına da katılırlar. KLK proteinlerinden kanser biyobelirteçi olarak kullanılan en yaygını, prostata spesifik antijen (PSA- ayrıca KLK3 olarak da bilinir) dir. PSA ve diğer KLK' lar arasındaki yapısal benzerlik göz önüne alındığında, ailenin kalan

üyelerinin kanser biyobelirteçleri olarak potansiyel rolü son yıllarda çokça araştırılmıştır. Biyolojik belirteç olarak kullanımlarının dışında, kanser patogenezinde bir dizi kritik işlevsel rolünün tespiti KKK' ların terapötik hedefler olarak potansiyel kullanımlarını ortaya çıkarmıştır (Emami ve Diamendis 2008, Kontos ve Scorilas 2012).

Prostat kanserinde farklı şekilde ifadeleri olan KKK1, KKK2, KKK3, KKK4, KKK8, KKK9 ve KKK14' ün prostat kanseri ilerlemesinin umut verici biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. KKK' lar, düzenlenmiş gen ekspresyonu ile tümör büyümesini ve metastazı teşvik etme veya inhibe etmede rol oynar [Büyüközer vd. 2020]. Testiküler kanserde KKK genlerinin ekspresyon profilleri karakterize edilmeye devam etmektedir. Veriler, KKK 5, 10, 11, 13 ve 14' ün malign tümörlerde aşağı regüle olabileceğini göstermektedir. KKK5 gen ekspresyonu, klinik olarak alt basamaklı tümörlerle korele olduğundan, olumlu bir prognoz tahmininde kullanılabilir. Yakın tarihli araştırmalar, KKK2 ve KKK4 dahil diğer KKK' ların testislerde üretildiğini ve dolayısıyla testis kanseri için biyolojik belirteç olarak potansiyel olabileceğini önermektedir (Kontos ve Scorilas 2012, Kryza vd. 2017). KKK6, KKK7 ve KKK10' un immünohistokimya ile tespit edildiği şekilde ekspresyonu, tümör evresi ve histolojik RCC (böbrek kanseri) tipi ile korele olurken, ileri evre RCC' den muzdarip hastalar, yüksek KKK1, KKK7 ve KKK11 seviyeleri sunar. KKK ailesi üyelerinin büyük çoğunluğu (KKK2-KKK11, KKK13-KKK15), over karsinomu dokularında ve hücre soylarında anormal biçimde eksprese edilir. Ayrıca, serumda salgılanan veya yumurtalık kanseri hastalarının asit sıvısında saptanan KKK seviyeleri, sağlıklı hastaların yani kontrollerin serum KKK düzeylerinden önemli ölçüde farklıdır. Özellikle, KKK4 ve KKK5 mRNA' larının yumurtalık kanserinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir ve her ikisinin de kötü prognoz olduğunu gösterir. Özellikle, artan KKK8, KKK9 ve KKK14 mRNA seviyeleri düşük hastalık evresi, düşük tümör derecesi, optimize edilmiş tümör hacmi ile ilişkilendirilmiştir. KKK genlerinin ekspresyon profili, rahim ağzı kanserinin biyobelirteçleri olarak birkaç KKK önerilmektedir. Hem mRNA hem de protein seviyelerinde KKK7 ve KKK8 ekspresyonu, primer rahim ağzı kanseri hücrelerinde ve rahim ağzı tümörü hücre hatlarında yukarı doğru düzenlenmiştir (Kontos ve Scorilas 2012).





**Şekil 1.2:** Kallikrein ile ilişkili peptidazlar ve kanser (Stefanini vd. 2015' den uyarlanmıştır).

KLK' lar, büyüme faktörleri yoluyla hücre çoğalmasını kolaylaştırarak ve mTOR sinyali yoluyla hücre sağkalımını modüle ederek neoplastik işleme katkıda bulunan proteolitik yollara katılırlar. Ayrıca anjiyogenez, hücre göçünü ve anjiyogenik vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) salgılanması, metaloproteinaz aktivasyonu, hücre dışı matris (ECM) degradasyonu ve epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indüksiyonunu düzenler. Bununla birlikte, KLK' ların ayrıca kansere karşı koruyucu bir etkisi vardır, apoptozu teşvik eder veya anjiyogenez ve hücre çoğalmasını önler (Stefanini vd. 2015).

### 1.1.1 KLK1

İnsanda ilk tanımlanan kallikreinlerden biridir. KLK1' in en bilinen fizyolojik fonksiyonu, düşük moleküler ağırlıklı kininojenin bölünmesidir, bu da vazodilatör kinin peptidi (bradikinin veya Lys bradikinin) salınımına yol açar. Kininler, hedef organlarındaki alıcılara bağlanır ve vazodilatasyon, kan basıncını düşürme, düz kas gevşemesi ve kasılması, ağrı indüksiyonu ve iltihaplanma gibi geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sergiler (Adamopoulos vd. 2018).

### 1.1.2 KLK2, KLK3 ve KLK5

Birçok yapısal ve fonksiyonel özellikleri paylaşan en büyük serin proteaz grubunun üyesi olan KLK2, bradikininin üretilmesi için yüksek moleküler ağırlıklı kininojeni temizler.

Bununla birlikte, KLK2 öncelikle seminal vezikül proteinlerini, seminogelin I - II ve fibronektini hidrolize ederek seminal plazma sıvılaştırmasında rol oynar (Adamopoulos vd. 2018).

KLK2 ve KLK3 gibi KLK' ların, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) bağlayıcı proteinleri (IGFBP' ler) parçaladığı ve karşılık gelen reseptörlerini bağlayan ve aktive eden, sırayla hücreyi modüle edebilen IGF' lerin mevcudiyetinin artmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. KLK3 ayrıca, TGF binding - bağlayıcı proteinleri parçalayarak hücre çoğalmasına yol açan gizli TGF aktive edebilir. Kordinatlı düzenlemeleri ve doku ko-ekspresyon kalıpları ile birlikte çok sayıda KLK, KLK' ların proteolitik kaskadlara katılabileceği hipotezine yol açar. Semen sıvılaştırması, cilt çürümesi, nörodejenerasyon ve tümör teşvik edici veya inhibe edici etkilerde rol oynarlar. KLK5 ise, öngörülen prostat kaskadının ana başlatıcı molekülü olarak önerilmiştir, çünkü kendisi ve pro-KLK2, -KLK3, -KLK6, -KLK7, -KLK11, -KLK12 ve KLK14' ü de aktive edebilmektedir (Kontos ve Scorilas 2012).

### **1.1.3 KLK6**

KLK6, epidermiste tripsin benzeri majör bir serin proteazdır ve ilk olarak 1999' da "stratum corneum triptik enzimi (SCTE)" olarak rapor edildi ve klonlandı. Desmoglein 1 (DSG1), desmocollin 1 (DSC1) ve corneodesmosin (CDSN) parçalayabilmekte ve kornea katmanlarının bozulmasına yol açmaktadır. KLK6, dolaylı olarak, epidermal tabakada eksprese edilen bir serin proteaz olan elastaz-2' nin aktive edilmesiyle (pro) filajrin işlemine katılmaktadır (Morizane vd. 2019).

### **1.1.4 KLK7 ve KLK8**

KLK7, kimotripsin benzeri bir aktiviteye sahiptir ve epidermisin en dış tabakasının dökülmesi olan, soyulmadan önce gelen hücreler arası birleşik yapıların proteolizinde rol oynar. 1994 yılında klonlanmıştır. Bu protein, kanser istilasında ve metastazında rol oynar ve bu genin artmış ekspresyonu, olumsuz prognoz ve birkaç kanser tipinin ilerlemesi ile ilişkilidir. Deride yüksek ekspresyonu bulunur. KLK7 hem granüler keratinositlerde yüksek oranda eksprese edilir hem de stratum korneumun hücre içi boşluklarında bulunur. Mide kanseri ve pankreas kanseri gibi diğer kanser türlerine kıyasla yumurtalık kanserinde KLK7 ekspresyonunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir ve bu yüksek ifadenin yaş ve kanser evresi ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. KLK8 proteini de derideki proteolitik

kaskadta yer alır ve yumurtalık kanserinde biyobelirteç olarak önerilmektedir (Bayani ve Diamendis 2011, Caubet vd. 2004, Chen vd. 2020, RefSeq 2011, RefSeq 2013). Nöropsin olarak da bilinen KLK8 ekspresyonu, epidermiste mRNA ve protein seviyelerinde tespit edilebilir. KLK8, epidermal keratinositlerin anormal proliferasyonunda veya farklılaşmasında rol oynar (Morizane vd. 2019).

### **1.1.5 KLK9**

KLK9, timus, omurilik, testis, prostat, meme ve yumurtalık gibi çeşitli dokularda eksprese edilen yeni keşfedilen bir insan kallikrein genidir. Diğer kallikreinler gibi, KLK9 geninin de kanser hücresi çizgilerinde östrojenler ve progesterinler olmak üzere steroid hormonları tarafından düzenlenir (Yousef vd. 2003).

### **1.1.6 KLK10**

İn vitro çalışmalarda, KLK10' un normal meme epitel hücrelerinde eksprese edildiği, ancak meme kanseri hücre hatlarında belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, KLK10 ekspresyonunun bu kanser hücrelerine yeniden sokulması, nude (çıplak) farelerde tümör oluşumlarını baskılayabilir. Bu nedenle KLK10' un meme kanserinde tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü kabul edildi. Meme kanserinde KLK10' un aşağı regülasyonunu düzenleyen mekanizmalar açık değildir fakat bir dizi kanser hücresi hattında gösterildiği gibi, ekson 3' ün CpG adası hipermetilasyonudur. Dikkate çekici olarak, KLK10' un ifadesi bazı steroid hormonları ve retinoid asit tarafından modüle edilir. Bununla birlikte, farklı tip tümörlerde KLK10' un paradoksal ifadesi belirsizliğini korumaktadır (Luo ve Diamendis 2007).

### **1.1.7 KLK11 ve KLK12**

KLK11, prostat kanserinde tümör agresifliğini ayırt etmek için bir biyobelirteç olarak önerilmektedir (Bi vd. 2010) . İnsan kallikrein ile ilişkili peptidaz 12 (KLK12), insan dokusu kallikrein ailesinin yeni bir üyesidir. Ön çalışmalar KLK12' nin meme kanserinde farklı şekilde eksprese edildiğini ve kanser biyobelirteç olarak potansiyel kullanımının olabileceğini göstermektedir. KLK12, enzimatik aktivite kazanmak için otomatik olarak aktive olabilen aktif olmayan bir pro-enzim olarak salgılanır. Bir florojenik ve kromojenik peptid substrat panelinin taranması yoluyla aktif KLK12' nin hem arjinin hem de lizinden sonra peptid bağlarını bozmak üzere tripsin benzeri aktiviteye sahiptir. Aktif KLK12, oto-parçalanma nedeniyle aktivitesini hızlı bir şekilde kaybeder ve aktivitesi ayrıca çinko

iyonları ve kovalent kompleks oluşumu yoluyla a2-antiplazmin tarafından inhibe edilebilir. Ayrıca, KLK12' nin KLK11 zimogenini in vitro olarak aktifleştirir (Jiang vd. 2007).

### **1.1.8 KLK13, KLK14 ve KLK15**

KLK13 meme kanseri hastalarında, olumlu prognozun bağımsız bir biyobelirteçi olabileceğini ve potansiyel olarak muhtemel hastaları tanımlamanın mümkün olabileceğini göstermiştir. Ek olarak, KLK13' ün ana prognostik yetenekleri, küçük hücreli akciğer kanserinin yanı sıra mide kanserinde de doğrulanmıştır, çünkü KLK13 aşırı ekspresyonu olan hastalar genel olarak anlamlı şekilde daha uzun (OS) ve hastalıksız hayatta kaldıkları (DFS) gösterilmiştir. İnsan malignitelerinde rol ve uygulama mekanizmaları hala uygun bir şekilde anlaşılmamıştır ve daha fazla araştırılması gerekmektedir (Adamopoulos ve Scorilas 2017).

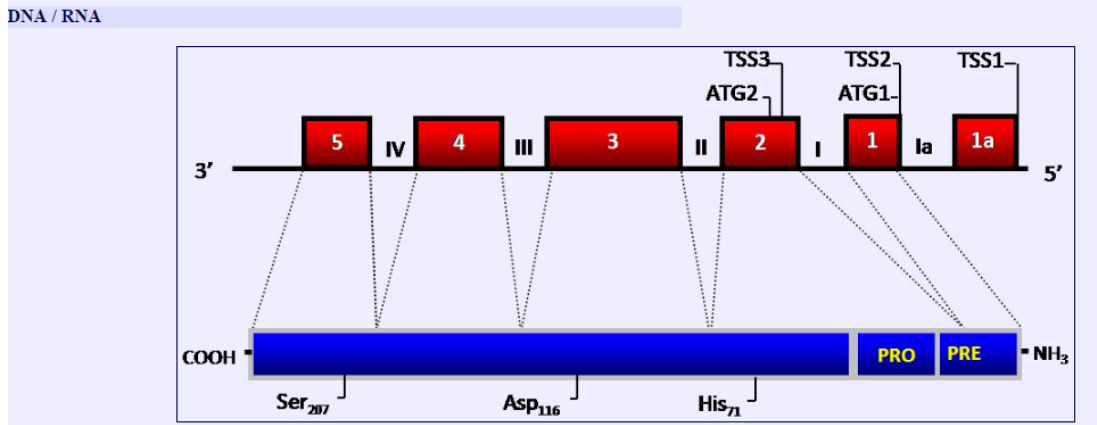
KLK14 mRNA'sı, temel olarak prostat, tükürük bezi, mide, akciğer, dalak, uterus, timus, karaciğer, ince bağırsak ve serebellumda eksprese edilirken, daha düşük ekspresyon seviyeleri diğer birçok dokuda bulunur. KLK14 mRNA ekspresyonu, malign meme, testis, prostat ve yumurtalık tümörlerinde aşağı regüle edilir. KLK14 insan protein substratları; kollajen I-IV, fibronektin, laminin, kininojen, fibrinojen, plazminojen (PLG), vitronektin (VTN) ve insülin büyüme faktörü bağlayıcı proteinler 2 ve 3 (IGFBP2 ve IGFBP3) gibi ekstraselüler matrisin ana bileşenleri de dahil olmak üzere birçok substratı bulunmaktadır (Kontos ve Scorilas 2016).

KLK15 ekspresyonunun yumurtalık kanserinde bağımsız bir prognoz belirteci olduğu bildirilmiştir. Ayrıca chromophobe renal hücre karsinomasında yukarı regüle olmaktadır (Tailor vd. 2018).

### **1.2 KLK4**

Kallikrein ile ilgili peptidaz 4 (KLK4), androjenler tarafından düzenlenen ve ekspresyonu prostat için oldukça spesifik olan ve prostat kanseri kemik metastazlarında bol miktarda bulunan serin proteazdır (Fuhrman-Luck vd. 2016, xi vd. 2004). KLK4' ün farklı isimleri; KLKL1, PRSS17, AI2A1, ARM1, EMSP, EMSP1, PSTS olarak da bilinir (Obiezu vd. 2001). 254 amino asitten oluşan 4.38 kb genomik DNA' yı kapsar. 5 ekzon ve 4 introndan oluşur. Bir salgılama sinyaline (pre-) peptite (26 amino asit), ardından bir aktivasyon (pro-) peptite (4 amino asit) ve 1 potansiyel N-bağlı glikozilasyon yerine sahip oligonükleotid zincir (224

amino asit) bulunur. His71, Asp116, Ser207 (Met = 1' e göre ve ekson 1' de ATG1 tarafından kodlanan) katalitik üçlüsü korunur ve proteolitik aktivite için gereklidir. Bir KLK4 tam uzunlukta protein olarak sentezlendikten sonra, sinyal peptidi daha sonra yarılr ve pro-KLK4 (zimogen) daha sonra hücreden salgılanır. Aktivasyon üzerine, olgun aktif enzimi üretmek için propeptit uzaklaştırılır (Lai vd. 2009).



**Şekil 1.3:** KLK4 geninin genomik ve protein yapısı (Lai vd. 2009).

KLK4 geni orijinal olarak PRSS17 geni olarak adlandırılmıştır ve EMPS1 (Enamel matrix serine protease 1) proteinini kodlayan dejenere primerler kullanılarak domuzda gelişmekte olan diş emaye epitel hücrelerinden klonlanmıştır. RT-PZR deneyleri ile meme, yumurtalık, endometriyum, tükrük bezi, akciğer, adrenal bez, kolon, trakea de ifade olduğu gösterilmiştir. Northern blot analizi ile insan dokularındaki daha sonraki çalışmalar, KLK4 mRNA ekspresyonunun prostata ağırlıklı olarak lokalize olduğunu göstermiştir; beyin, testis, omurilik, tiroid, deri ve böbrek de düşük ile orta seviyelerde KLK4 mRNA' yı ifade ettiği gösterilmiştir. KLK4 mRNA, in situ hibridizasyon deneyleriyle yağ bezlerinde, ter bezlerinde, kıl folikülleri, stratum bazale, stratum spinosum ve stratum granulosumda da tespit edilmiştir. Domuzda, KLK4 mRNA östrojen siklusunun erken evrelerinde endometriyumda eksprese edildiği de gösterilmiştir. Yüksek KLK4 seviyeleri, prostat, meme ve yumurtalık kanseri dokularında da tespit edilmiştir (Dong vd. 2001, Lai vd. 2009, Majumdar ve Diamendis 1999).

Yapılan protein homoloji çalışmaları KLK4' ün %25 KLK12 ile % 29 KLK10 ile, % 31 KLK9 ile,% 34 KLK1, 2, 3 ile, % 35 KLK8, 13 ile, % 36 KLK6, % 37 KLK15 ile, % 40 KLK14 ile, % 43 KLK7, % 45 KLK5 ile dizi homolojisi göstermektedir. KLK1, KLK2 ve KLK3' ün aksine, KLK4' te, ekzon 3' te kodlanan 11 amino asitten oluşan ve bu enzimlerin substrat özgüllüğünde önemli olduğu düşünülen "kallikrein halkası" yoktur.

KLK4, domuz EMPS1 proteinine % 72 sekans homolojisi göstermektedir. Bayes filogenetik analizleri KLK4, KLK5 ve KLK14' ün kallikrein ile ilgili peptidaz gen ailesi içinde bir alt aile oluşturabileceğini göstermektedir (Lai vd. 2009).

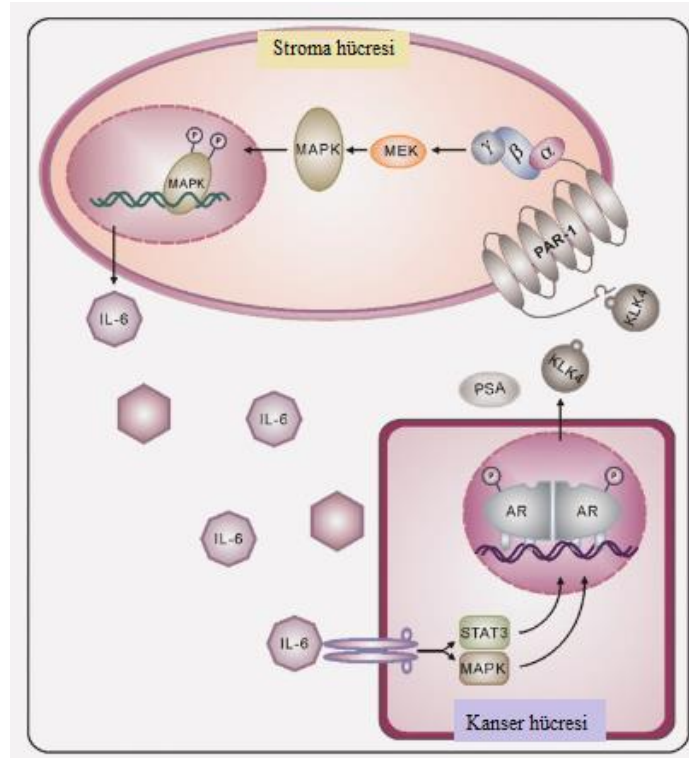
KLK4 ekspresyonu, prostat kanseri hücrelerinde çoklu hormonlar tarafından düzenlenir ve prostat kanserinin androjenden bağımsız aşamasında serbest bırakılır. Bu bulgular, KLK4' ün, prostat kanserinin ilerlemesinde rol oynayabilecek kallikrein ailesinin eşsiz bir üyesi olduğunu göstermektedir (Korkmaz vd. 2004).

KLK4, androjenler tarafından düzenlenen ve ekspresyonu prostat için oldukça spesifik olan kallikrein ailesinin yakın zamanda tanımlanmış bir üyesidir. KLK4' ün gen ürünü hK4, hücre içi olarak lokalize edilmiş KLK ailesinin ilk üyesidir. Daha önce atanmış ilk ekzonun salgılaması için hK4' ü hedefleyecek bir sinyal peptidini kodlaması öngörülen ilk ekzonun, KLK4 mRNA' nın fizyolojik olarak formunun bir parçası olmadığı gösterilmiştir. Bu durum RT-PZR, immünofloresan hem de hücre fraksiyonlama deneyleriyle belgelendirilerek hücrede hK4 proteininin nükleer lokalizasyonu ile desteklenmiştir. Ayrıca, androjenlere ek olarak, hK4 ekspresyonu, prostat kanseri hücrelerinde östrojen ve progesteron ile düzenlendiği gösterilmiştir (Xi vd.2004)..

Yapılan bir çalışmada, KLK4 ekspresyonunun, prostat kanseri kaynaklı LNCaP hücre hattında androjenler tarafından yukarı regüle edildiği gösterilmiştir ve meme karsinoması hücre hattı BT-474' te hem androjenler hem de progestinler tarafından yukarı regüle edilmiştir (Obiezu vd. 2001). Bugüne kadar, KLK4' ün en önemli biyolojik fonksiyonu domuz çalışmalarından türetilmiştir ki bu, diş geliştiren dişlerin mine matrisindeki ana protein olan amelogenin parçalayarak diş minesini mineralizasyonu için KLK4' ün önemli olduğunu göstermiştir (Lai vd. 2009).

Ortaya çıkan veriler, KLK' ların, proteazla aktive edilen reseptörlerin (PAR) aktivasyonu yoluyla endotel hücrelerinin proliferasyonunu indükleyebildiklerini göstermektedir. PAR' lar, hücre dışı alanlarının kısmi proteolitik bölünmesiyle aktive edilen G-protein-bağlı reseptör üst ailesinin üyeleridir (Kontos ve Scorilas 2012). KLK4, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasının desteklenmesinde ve genel olarak, birkaç hücre döngüsü ile ilgili genin düzenlenmesi yoluyla malign fenotip değişikliklerinde eşsiz bir role sahiptir. PAR' ların prostat malignitesindeki rolü söz konusu olduğunda, prostat kanseri

dokularında hem mRNA hem de protein seviyelerinde belirgin şekilde artmış PAR1, PAR2 ve PAR4 ekspresyonu, normal veya iyi huylu olanlar ile karşılaştırıldığında ortaya çıkmıştır. Prostat kanseri hücrelerinin büyümesini düzenlediği tespit edilen PAR1 ve PAR2' nin proteolitik aktivasyonu KLK2 ve KLK4 için onaylanmıştır. Daha doğrusu, PAR1 (KLK4) ve PAR2' nin KLK2 ve KLK4 aracılı aktivasyonu (KLK2 ve KLK4), DU145 prostat kanseri hücre hattının hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (ERK) sinyalleşmesi yoluyla çoğalmasını teşvik eder. KLK4-aracılı PAR1 ve PAR2 sinyalleri PC-3 hücrelerinde de tespit edilmiştir (Ramsay vd. 2008, Wang vd. 2010). İlginçtir ki, KLK tarafından PAR1 aktivasyonu, tümör-stroma hücrelerinin prostattaki etkileşimlerini tahrik ediyor gibi görünmektedir (Avgaris vd. 2012



**Şekil 1.4:** Prostat kanserinde KLK4 ile başlatılmış çift parakrin mekanizması ve PAR1 aracılı tümör-stroma etkileşimi (Wang vd. 2009' dan uyarlanmıştır).

2017 yılında KLK4 geninin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yapılmış olan en kapsamlı çalışmada KLK4, pro-ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü, proteazla aktive edilmiş reseptör PAR1, PAR2 ve pro-HGFA' nın bir aktivatörü olarak kanserin ilerlemesine katkı sağlamasıyla rapor edilmiştir. Buna ek olarak, prostat kanserinde KLK4' ün aşırı ekspresyonunun kemik metastazı veya ileri evre arasında korelasyon olduğu da bildirilmiştir. Aynı zamanda bu yayında, KLK4' ün kansere bağlı fibroblastların (CAF)

farklılaşmasını yönettiği tespit edilmiştir. KLK4, premalign (prostatik intraepiteliyal neoplazi) ve malign lezyonların prostat epitel hücrelerinde, özellikle de peristromal ara yüzeyde, normal prostat epitele kıyasla yüksek oranda kendini göstermektedir. KLK4, prostattan türetilmiş WPMY1 normal stromal hücre dizisinde CAF benzeri özelliklere neden olmuştur, alfa düz kas aktin, ESR1 ve SDFRP1 de artış gözlenmiştir. (Kryza vd. 2017).

Tam uzunlukta KLK4, salgılanan bir proteini kodlar ve hücre içi olarak sitoplazmada lokalizedir, ancak GFP etiketli N-terminal kısaltılmış izoformlarla yapılan çalışmalarda çoğunlukla çekirdeğe lokalize olduğu bulunmuştur. Bugüne kadar, KLK4' ün en önemli biyolojik fonksiyonu domuz çalışmalarından elde edilmiştir. Dişlerin mine matrisindeki ana protein olan amelogenin parçalayarak diş minesi mineralizasyonu için KLK4' ün önemli olduğu gösterilmiştir. Daha yakın zamanlarda, KLK4' ün diş gelişiminde önemli olan domuz enamelini de bildirilmiştir. Ayrıca, farelerde KLK4, yalnızca gelişmekte olan dişlerde ameloblastlar tarafından mine matrisini bozmak üzere işlev gören KLK4 eksprese edildiği gösterilmiştir. KLK4' ü oldukça yüksek seviyede ifade eden bir doku olan prostattaki rolü tam olarak aydınlatılamasa da, prostat kanseri progresyonundaki rolü dişlerdeki hücre dışı matris (ECM) proteinlerini parçalamadaki rolüne benzer olduğu ve ayrıca IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IGFBP6' i degrade ederek IGF düzeylerini arttırdığı düşünülmektedir. KLK4' ün ayrıca pro-HGFA' yi aktive ettiği ve dolayısıyla MET reseptörünün aktivasyonu yoluyla potansiyel olarak tümör ilerlemesine yol açtığı bildirilmiştir. Substrat özgüllüğü tarama çalışmasında, tam uzunlukta KLK4' ün tripsin benzeri spesifisiteye sahip olduğunu ve potansiyel olarak prostat spesifik antijen (PSA)/KLK3, kemik morfogenetik proteini (BMP) ailesi ve paratiroid hormonu ile ilişkili protein gibi proteinleri aktive ettiği gösterilmiştir. Normal ve neoplastik prostat patofizyolojide rol oynar. Rekombinant KLK4' ün aynı zamanda PSA ve tek zincirli ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün KLK2' ye göre daha iyi aktivatörü olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca KLK4' de dahil olduğu kallikrein ilgili peptidaz ailesinin diğer üyelerini (KLK1, KLK2, KLK3, KLK5, KLK6, KLK9, KLK11, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15) de aktive ettiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, prostat ve diğer dokularda KLK4 için kesin fizyolojik rol tanımlanamamıştır. N-terminalinden kısaltılmış KLK4' ün işlevi tanımlanmayı beklemektedir (Korkmaz vd. 2004, Lai vd. 2009).



### **1.3 Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)/SF-MET Sinyalizasyonu**

Tümör mikro ortamındaki kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimler, invazyon ve metastaz gibi kanserin agresif özelliklerinin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Gerçekten de, kanser ilerlemesiyle ilgili birçok büyüme faktörünün ifadesi ve etkinliği, bu interaksyonlara oldukça bağımlıdır; hepatosit büyüme faktörü (HGF) aktivitesinin regülasyonu kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki karşılıklı etkileşimin tipik bir örneğidir. Salınım faktörü (SF) olarak da bilinen HGF, Met proto-onkojen tarafından kodlanan MET reseptör tirozin kinaz vasıtasıyla çeşitli hücreler için bir mitojen ve morfojen olarak işlev gören çok işlevli bir büyüme faktörüdür. MET yaygın olarak epitel hücrelerinde eksprese edilir, ancak epitel dışı hücreler, endotel hücreleri ve miyoblastlarda olduğu gibi hematopoietik sistem hücrelerinde ve spinal nöronlarda da bulunur. Buna göre, çeşitli kanser hücreleri MET' i de ifade eder. Bugüne kadar çok sayıda çalışma, HGF/SF-MET sinyalizasyonunun normal gelişim, doku rejenerasyonu ve kanser progresyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. HGF/SF, mezenkimal hücreler tarafından üretilir ve tipik olarak parakrin olarak MET' yi aktive eder. HGF/SF' nin MET ile bağlanması MET' nin tirozin kinaz aktivitesini harekete geçirir ve bu da tirozin kalıntılarının otofosforilasyonu ile sonuçlanır. HGF/SF, biyolojik aktiviteye sahip olmayan aktif olmayan bir prekürsör (pro-HGF/SF) olarak sentezlenir ve salgılanmadan sonra proteolitik bölünme yoluyla bir aktif olgun heterodimere dönüştürülür. HGF/SF, N-terminal domaini, dört kring domaini ve bir serin proteaz benzeri motif, bir  $\beta$ -zincirini içeren bir  $\alpha$ -zincirinden oluşur. ProHGF/SF, MET' e bağlanabildiği halde onu aktive etmediği için, HGF/SF-MET sinyalleşmesini sağlamak için proHGF/SF' nin olgun forma dönüştürülmesi kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, bu aktivasyon adımının nasıl düzenlendiği hakkında ayrıntılı bilgi, HGF/SF' nin patofizyolojik rollerini anlamak ve HGF/SF-MET sinyalleşmesini hedefleyen yeni terapileri geliştirmek için önemlidir. Bugüne kadar, proHGF/SF' nin iki farklı aktivasyon yolu önerilmiştir. Bunlardan birincisi, HGF aktivatörü (HGFA) gibi serum serin proteazları tarafından aktivasyon iken ikincisi, matriptaz gibi membrana sabitlenen serin proteazlarını içerir (Kawaguchi ve Kataoka 2014, Zava vd. 1979).

### **1.4 Pro-HGF/SF Aktivasyonunda Yer Alan Proteazlar**

HGFA, esas olarak karaciğer tarafından sentezlenen ve salınan ve insan plazması içinde yaklaşık 40 nM konsantrasyonlarda bulunan aktif olmayan bir proform (proHGFA) olarak kanda dolaşan bir faktördür. Günümüzde, HGFA için sadece iki bilinen substrat vardır:

proHGF/SF homolog proteini ve pro-makrofaj uyarıcı protein (pro-MSP, RON reseptör tirozin kinazın spesifik bir ligandı)' dir. In vivo, proHGFA aktivasyonu doku hasarına tepki olarak oluşur ve trombin, muhtemelen, dekstran sülfat, heparin ve kondroitin sülfat gibi negatif yüklü maddelerin varlığında Arg407-Ile408 bağının etkili bölünmesiyle aktivasyona aracılık eder. Bu durum, kanser dokusunda da görülür; kanserler "iyileşmeyen yaralar" ve kanser hücreleri sıklıkla pıhtılaşma önleyici etkinliği artırır. İnsan kallikrein 1' e bağlı peptidazlar KLK4 ve KLK5, aynı zamanda, kanser hücresi mikro ortamında proHGFA' yı işleyerek aktif hale geçirir. Bugüne kadar HGF/SF dönüştürücü çeşitli proteazlar enzimler bildirilmiştir.

ProHGF/SF' yi aktif hale getiren proteazlar, membran bağımlı hücre yüzey serin proteazı matriptazdır. HGFA öncelikle karaciğer tarafından inaktif zimojen (proHGFA) formda sentezlenir. Trombin doku yaralanmasına tepki olarak proteolitik olarak aktif iki zinciri üretmek proHGFA' yı aktive eder. Bu aktivasyon ayrıca kanser dokusunda da olur. HGF/SF' nin aktivasyonunu içeren arttırılmış HGFA etkinliği çoğu kanserde rapor edilmiştir. Her ne kadar trombin bir proHGFA' nın aktivatörü olarak rapor edilse de, alternatif bir yol olarak kanser indüklü KLK4 ve KLK5 de bildirilmiştir. KLK4, insan kallikrein 1 ilgili peptidaz ailesi (KLK' lar) bağımlı bir üyedir. KLK4, pro-ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü, proteazla aktive edilmiş reseptör PAR1, PAR2 ve pro-HGFA' nın bir aktivatörü olarak kanserin ilerlemesine katkı sağlamasıyla rapor edilmiştir (Kawaguchi vd. 2014, Kryza vd. 2017, Mukai vd. 2015).

### **1.5 Hormon Bağımlı Kanserler ve KLK4**

KLK3 geni tarafından kodlanan PSA gibi KLK4 geninin de hormon bağımlı kanserler de rolü olduğu düşünülmektedir. Bunun sebeplerini şu şekilde saymak mümkündür:

- (a) endokrin hücrelerde yüksek seviyede ekspresyonu,
- (b) androjenler, östradiol ve progesterinler gibi hormonlar tarafından düzenlenmesi,
- (c) kanserde ifadesinin bozulması ve
- (d) hücre dışı matris yıkımındaki potansiyel rolü ve büyüme faktörü aktivasyonu (Lai vd. 2009).

### **1.6 Prostat Kanseri**

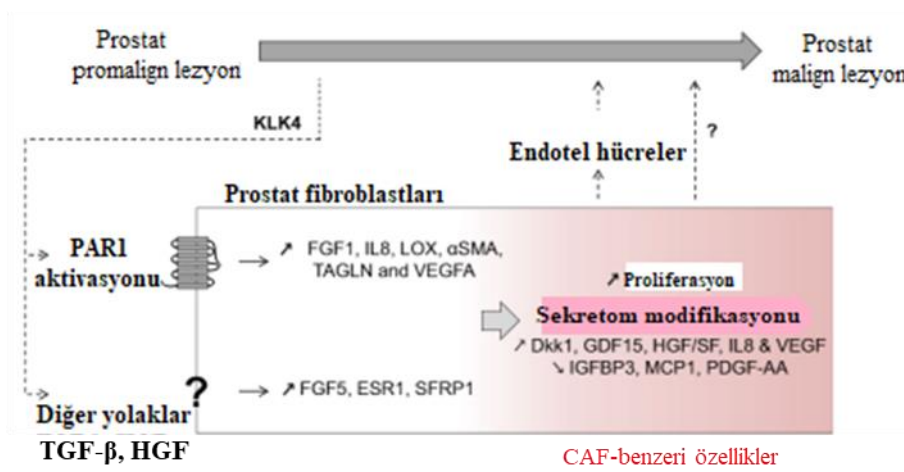
Kallikrein 4' ün hem mRNA hem de protein seviyelerinde iyi huylu prostat dokularına kıyasla kanserli ortamda daha fazla olduğu bildirilmiştir. Örneğin, 42 benign ve 207

malign prostat dokusunda gerçekleştirilen bir doku mikroarray çalışması, benign hücelere kıyasla KLK4' ün prostat kanseri hücrelerinde daha yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca KLK4' e özgü antikorların prostat kanseri hastalarının serumlarında bulunabileceği gösterilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde, KLK4' ün hem mRNA hem de protein düzeyinde androjenler tarafından yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Northern blot analizini kullanan iki ifade çalışmasında, KLK4 mRNA ekspresyonunun sırasıyla 24 ve 48 saat süreyle R1881 ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde 18 ve 1.7 kat arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, KLK4 ile transfekte edilen prostat kanseri hücrelerinde (PC-3 ve DU145) hücrel göç, proliferasyon ve koloni oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir (Dong vd. 2001, Fuhrman-Luck vd. 2016, Lai vd.2009). KLK4, pro-ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü, proteazla aktive edilmiş reseptör PAR1, PAR2 ve proHGFA' nın bir aktivatörü olarak kanserin ilerlemesine katkı sağlamasıyla rapor edilmiştir. Buna ek olarak, prostat kanserinde KLK4' ün aşırı ekspresyonunun kemik metastazı veya ileri evre arasında korelasyon olduğu da bildirilmiştir (Hollenberg 2014, Kryza vd. 2017, Ramsay vd. 2008).

Kanser progresyonunda kanser hücreleri ile onların mikro çevre arasındaki karşılıklı iletişim önemlidir. Kansere bağlı fibroblastların (CAF) kanser progresyonuna katılması uzun sürede saptanmış olmasına rağmen, normal fibroblastlardan CAF' ların farklılaşmasına yol açan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. 2017 yılında yapılan bir çalışmada KLK4' ün CAF farklılaşmasını yönettiği tespit edilmiştir. KLK4, premalign (prostatik intraepitelial neoplazi) ve malign lezyonların prostat epitel hücrelerinde, özellikle de peristromal ara yüzeyde, normal prostat epitele kıyasla yüksek oranda kendini göstermektedir. KLK4, prostattan türetilmiş WPMY1 normal stromal hücre dizisinde CAF benzeri özelliklere neden olmuştur. KLK4, proteaz ile aktive olan reseptör-1' i, WPMY1 hücrelerinde prostat kanseri progresyonunda rol oynayan çeşitli faktörlerin (FGF1, TAGLN, LOX, IL8, VEGFA) ekspresyonunu aktive etmiştir (Kryza vd. 2017).

KLK4 tarafından indüklenmiş prostat kökenli normal stromal hücre soyunda, (WPMY1) hücre proliferasyonu ve sekretom değişimleri olmuştur. Önemli bir şekilde, WPMY1 hücrelerinde KLK4 muamelesi ile dis-regüle edilen genler, aynı zamanda, hastadan türetilen CAF' lar ile habis olmayan fibroblastlarla kıyaslandığında farklı olarak eksprese olmaktadır ve sonrasında KLK4 muamelesi ile arttırılmaktadır. 2017 yılında yapılan bu çalışma ile epitelyal türevli KLK4' ün, prostat stromal mikro ortamda CAF farklılaşmasını

aktif olarak teşvik ederek tümör ilerlemesini yönlendirdiği önerilmektedir. Bu çalışmada Prostat fibroblastlarında KLK4 tarafından regüle edilen diğer muhtemel yolları (HGF, TGF- $\beta$ ) tanımlamanın gerekliliği vurgulanmıştır. Ayrıca CAF fenotipinin oluşumunda regüle edici diğer faktörlerin varlığında KLK4' ü analiz etmek, ayrıca in vivo da CAF (Cancer associated fibroblasts) fenotipinin oluşumunu kapsayan doğrulayıcı çalışmaları yapmanın gerekliliği de vurgulanmıştır. Bütün bu bilgiler ışığında prostat kanseri için moleküler düzeyde KLK4' ün etkisinin yüksek olduğu görülmüş ve eksik olan yolun aydınlatılmasına yönelik çalışmalarımız planlanmıştır.



**Şekil 1.5:** Prostat kanserinin erken evrelerinde KLK4'ün muhtemel durumu (Kryza vd. 2017' den uyarlanmıştır).

Androjen yoksunluğu tedavisinden (ADT) sonra direnç veya nüks prostat kanseri hastaları için halen önemli bir sorun olarak kalmaktadır. Birçok çalışmanın hipotezi, MET' in aşırı ifadesinin ve aktive edici prostat kanseri hücrelerinde sinyal iletim yolunun özellikle kastrasyon dirençli prostat kanseri (CRPC- castration-resistant prostate cancer) ile ilişkili olduğu üzerinedir. Öte yandan, zimojen plazma HGF aktivatörünü aktive eden insan kallikrein ile ilgili peptidaz (KLK) 4 ifadesi, Kemik metastazı bulunan prostat kanseri hastalarında veya ileri evrede bildirilmiştir (Holzhausen vd. 2006, Kawabata vd. 1999, Kryza vd. 2017, Mukai vd. 2015).

Huggins ve Hodges 1972' de androjen bağımlılığı kavramını ilk kez vurguladıklarından bu yana, Androjen yoksunluğu tedavisi (ADT) ileri veya metastatik prostat kanserinin başlangıç tedavisinde bir standart olmuştur ancak hormondan yoksun dirençli prostat

kanserine (CRPC) cevap oluşturmamıştır (Emami ve Diamendis 2008). Daha önce hormona dirençli prostat kanseri olarak tanımlanan CRPC' nin halen androjene bağımlı olduğu anlaşılmaktadır. Çoklu direniş mekanizmaları, hastalığın ilerlemesine ve nükse katkıda bulunur ve androjen reseptörü (AR) bu ilerlemede önemli bir etken olmaya devam etmektedir (Chandrasekar vd. 2015, Organ ve Tsao 2011).

İleri prostat kanserinde MET' in aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir. Ayrıca çok sayıda çalışmada MET ekspresyonu ve metastaz veya CRPC arasında güçlü ilişki de rapor edilmiştir. Gerçekten Cabozantinib (XL 184), güçlü MET, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptör (VEGFR)2 ve RET inhibitörü metastatik CRPC hastaları için bir faz II çalışmasında olumlu etkililik göstermiştir. Şimdi bu hastalar için faz III denemeleri devam etmektedir. Bu nedenle, MET ifadesi ve sinyalizasyonu, prostat kanserinin ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Fosforilasyon mekanizmasına yönelik yapılmış bir çalışmada, yüksek klinik T evresi ve yüksek Gleason skoru olan hastalarda KLK4' ün aşırı ekspresyonu bulunmuştur. Ayrıca KLK4 ifadesi, fosforilasyon ile korelasyon göstermiştir. Bu durum prostat kanserinde KLK4' ün indük-MET aktivasyonunda önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Birchmeier vd. 2003, Comoglio ve Trusolino 2002, Kryza vd. 2017, Peruzzi vd. 2006).

Prostat gelişimi sırasında, TGF- $\beta$  ailesi üyelerini ve androjen reseptörünü (AR) içeren epitelyal ve mezenkimal hücreler arasındaki parakrin sinyalleşmesi, prostat morfogenezini gösterir. Erişkinlerde, prostat epitelyal bileşeni, lüminal ve bazal hücreler olmak üzere iki ana hücre tipinden oluşan bir çift katmandan oluşur. Lüminal hücreler kolumnar (sütun şeklinde) morfoloji sergiler ve epitelin ekzokrin bileşenini temsil eder, androjen reseptörünü (AR) eksprese eder ve prostat spesifik antijeni (PSA) salgılar. Bazal hücreler, bazal membranın üzerinde yer alan, düşük veya saptanamayan AR ifade eden düzleştirilmiş hücrelerdir. Terminal olarak farklılaştıktan sonra, lüminal epitel hücreleri hücre proliferasyonuna uğramazlar. TGF- $\beta$ , bu hücrelerde hücre proliferasyonunun inhibisyonunda ve farklılaşmış fonksiyon ve morfolojinin korunmasında önemli bir rol oynar. Stromal hücreler tarafından salgılanan TGF- $\beta$  proliferasyonu inhibe eder ve homeostazı sürdürmek için epitel hücrelerinin apoptozunu indükler. TGF- $\beta$ ' nin hücre proliferasyonunun inhibisyonu üzerindeki etkilerinin kaybı, artan hücre bölünmesi ve kolumnar epitel hücrelerinin farklılaşmasının bozulması ile sonuçlanarak karsinogenez dahil çeşitli lezyonlara yol açar. Sonuç olarak TGF- $\beta$ , prostat kanserinde ikili bir rol oynar;

prostat kanserinin başlangıç evrelerinde önemli bir anti-proliferatif faktör olarak işlev görürken, prostat kanserinin ileri evrelerinde pro-onkogenik ve pro-metastatik özellikler kazanır (Thompson-Elliot vd. 2021).

### 1.7 TGF- $\beta$ Sinyal İletim Yolu

Büyüme faktörleri grubunda bulunan TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) ailesi hücre çoğalması, hücre büyümesi, apoptoz, hücre farklılaşması gibi birçok süreçte görev yapar. Ayrıca hücre dışı matriksin sentezinde anahtar bir molekül olarak hizmet eder (Aashaq vd. 2022, Massague 1998). Transforme edici büyüme faktörü ailesininin, *Drosophila* da 7, insan genomunda 42 ve *Caenorhabditis elegans* da ise 4 üyesi vardır. (Jiang vd. 2012, Massague vd. 2005).

Memelilerde TGF-  $\beta$ 1, üst ailenin asal üyesini oluşturur ve insan plasentasının mRNA' sından klonlanmıştır. TGF-  $\beta$ 1, farelerde gelişim aşamaları sırasında endokondral kemik, kıkırdak ve deride tespit edilmiştir ve bu nedenle bu dokuların büyümesine aracılık ettiği gösterilmiştir. Hücre dışı matriksin sentezinde anahtar bir molekül olarak hizmet eder (Aashaq vd. 2022).

TGF-  $\beta$ 2 insanların glioblastoma hücrelerinde bulunur ve interlökin-2 aracılı T lenfositik büyümeyi inhibe etme kabiliyetine sahiptir, dolayısıyla G-TsF (glioblastoma türevli T hücre baskılayıcı faktör) adı verilir. TGF-  $\beta$ 2' nin ekspresyonu, astroglial hücrelerde ve embriyonik sinir sisteminin nöronlarında gözlenir. TGF- $\beta$ 2, kanser hücresi proliferasyonunu teşvik etmek için otokrin bir şekilde hareket eder. TGF- $\beta$  ve TGF- $\beta$ 2, karboksi-terminal de 112 amino asitten oluşan olgun formlarında neredeyse %71 sekans homolojisi paylaşır (Aashaq vd. 2022).

TGF- $\beta$  üst ailesinin üçüncü izoformunu temsil eden TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$  ve TGF- $\beta$ 2 ile %80' lik bir amino asit dizisini paylaşır. Başlangıçta insan rabdomyosarkom (yumuşak doku sarkomu) hücre hattının cDNA kütüphanesinden izole edildi. Bu sitokin, farelerde normal akciğer ve damak morfogenezi için gereklidir ve ayrıca bu organizmalarda epitelyal-mezenkimal etkileşimi düzenler. Ayrıca göbek kordonunda önemli ölçüde yüksek seviyelerde ifade edilir (Aashaq vd. 2022).

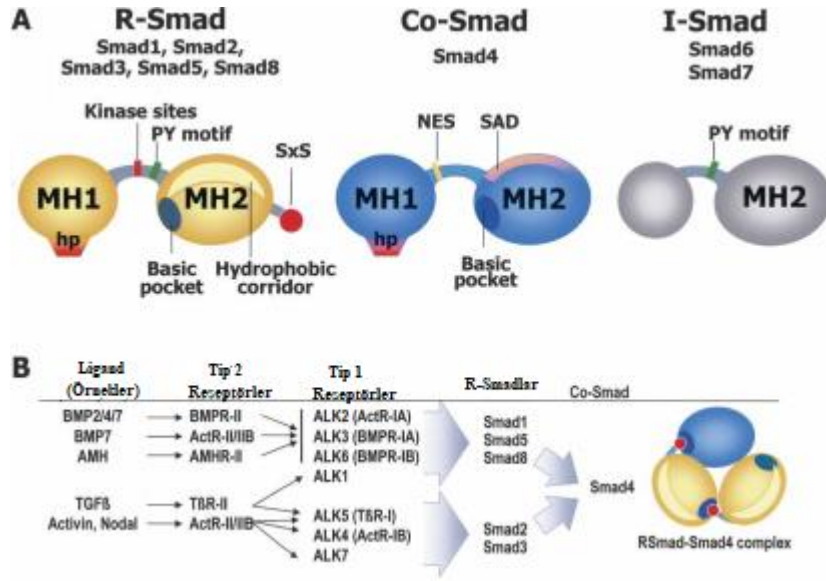
Günümüzde TGF- $\beta$  sinyal iletim mekanizmasının biyokimyasal omurgası ve hücrelerin bu sinyallere nasıl cevap verdiği aydınlatılmıştır. TGF- $\beta$  sinyal iletim yolu bu işlemi, SMAD bağımlı ve SMAD bağımsız olmak üzere iki yoldan gerçekleştirir (Massague vd. 2005). TGF- $\beta$  reseptörleri serin/treonin kinaz aktivitesine sahiptir ve bu ailenin üyeleri, TGF- $\beta$  reseptörlerine sinyallerini gönderirler. TGF- $\beta$  reseptörleri, tip I ve tip II olmak üzere 2 gruptan oluşur. Tip II reseptörünün, tip I reseptörünü uyarması ve aktive etmesi sonucu sinyal başlar. Aktif hale geçen tip I reseptörü SMAD bağımlı yoldan sinyal iletecek ise SARA gibi bazı moleküller aracılığıyla, sitoplazma ve çekirdek arasında sürekli mekik halinde bulunan SMAD proteinlerini fosforlar. Fosforlanma sonucu aktif hale geçen bu proteinler ise bu sinyali hücre çekirdeğine iletirler. Tip I reseptör kinazların ilk tanımlanmış substratları SMAD ailesi proteinleridir. Bu proteinler, reseptörden gelen sinyalleri hücre çekirdeğine ve oradanda çekirdekte bulunan ilgili genlere iletiminde görev yaparlar (Heldin vd. 1997).

### 1.8 SMAD Proteinlerinin Temel Özellikleri

SMAD proteinleri, *Caenorhabditis elegans*' ta bulunan SMA proteinleriyle, *Drosophila*' da bulunan MAD (mothers against decapentaplegic) proteinlerinin homologudur. İsminde bu iki proteinin isimlerinin kombinasyonundan almaktadır (Liu vd. 1996). Butün ailenin üyeleri iki küresel domainden oluşur. R-SMAD olarak adlandırılanlar düzenleyici proteinlerdir. Co-SMAD olarak adlandırılan protein ise ortak olarak işlev gören ve çekirdek ile sitoplazma arasında giriş çıkış yapan proteindir. I-SMAD olarak adlandırılan grup ise inhibitör proteinlerdir (Itoh vd. 2000, Massague vd 2005, Shi ve Massague 2003) (Şekil 1.6).

R-Smadlar ve Co-Smadlar, sırasıyla Mad homoloji (MH)1 ve MH2 alanları olarak adlandırılan N- ve C-terminallerinde oldukça benzer amino asit dizilerine sahiptir. Her iki alan, değişken uzunluktaki farklı prolin açısından zengin bir bağlayıcı bölge ile ayrılır. Smad2 hariç, R-Smadlar ve Co-Smadların MH1 alanı, spesifik DNA dizilerine bağlanabilir. R- ve Co-Smad' ın MH2 alanları, homomerik ve heteromerik kompleks oluşumu için vazgeçilmezdir. R-Smads' ın MH2 alanlarındaki L3 döngüsü, tip I reseptörlerle etkileşimin özgüllüğünü belirler. Smad1' in ALK-1 veya ALK-2 ile etkileşimi için sadece L3 döngüsü değil, aynı zamanda MH2 alanındaki  $\alpha$ -sarmal 1 (H1) de gereklidir. I-Smadlar, tip I reseptörler ile etkileşime giren korunmuş bir MH2 alanı içerir. I-Smad' ın

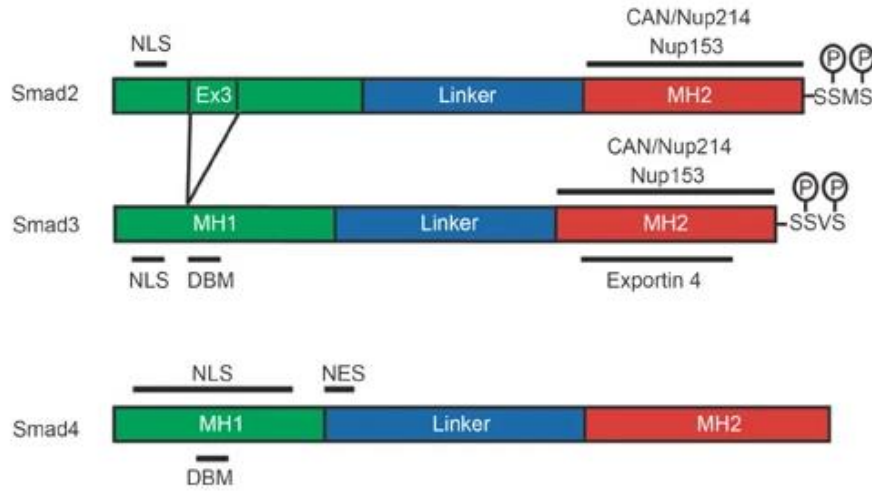
N-terminal bölgeleri, R- ve Co-Smadların MH1 alanlarına zayıf bir benzerlik gösterir ve sinyal spesifikliğini belirlemede bir rolü olabilir (Itoh vd. 2000).



**Şekil 1.6:** SMAD proteinleri (R-SMAD, Co SMAD ve I-SMAD) ve yapısal elemanları (Massague vd 2005).

Smad3 ve Smad4' ün, N-terminal MH1 alanı aracılığıyla "GTCT" ye veya tamamlayıcı "AGAC" dizisine bağlandığı gösterilmiştir. Smad2 yapısal olarak Smad3' e oldukça benzer olmasına ve hem Smad2 hem de Smad3' ün TGF-β veya aktivin tip I reseptörleri tarafından aktive edilmesine rağmen, Smad2 DNA' ya bağlanmaz. Smad2 de diğer SMAD proteinlerinde olduğu gibi Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) mevcuttur fakat bu zamana kadar işlevsel olduğu gösterilmemiştir. Bu durumun DNA bağlanmasına müdahale eden ilave ekzon 3' ün varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Smad3' ün aksine Smad2 geni kendisinin DNA' ya bağlanma kapasitesini engelleyen, DNA bağlayıcı β-hairpin kanalından hemen önce, kodlanan MH1 alanında 30 amino asit kalıntısından oluşan kısa bir bölgeye sahiptir. (Hill 2009, Miyazono 2000, Ten Dijke vd. 2002).

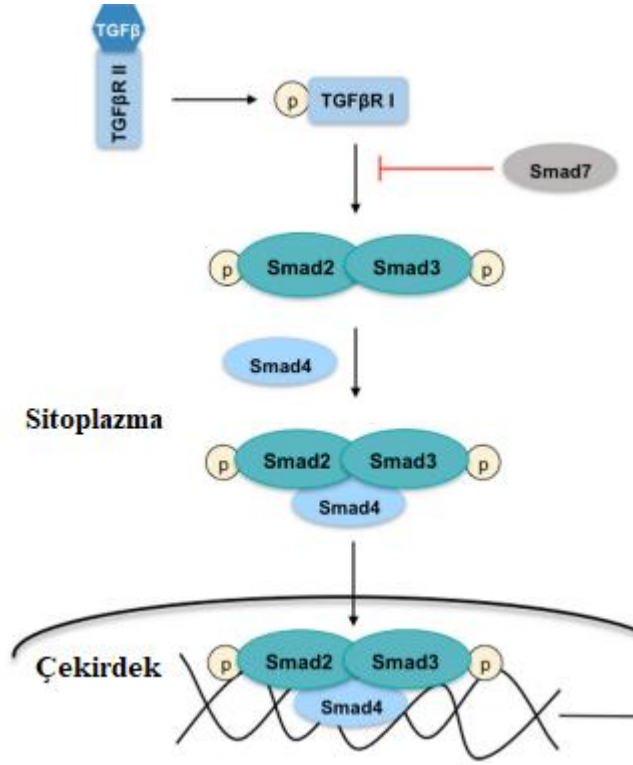




Şekil 1.7: Smad2, Smad3 ve Smad4 arasındaki yapısal farklılıklar (Hill, 2009).

### 1.8.1 SMAD Bağımlı TGF- $\beta$ Sinyal İletim Yolu

Hücre içi TGF- $\beta$ /Smad yolundaki ilk adım, Smad' ların TGF- $\beta$  reseptör kompleksine alınmasıdır. Reseptör aktivasyonu için SARA' nın, Smad2 ve Smad3' ün hücre içi dağılımını düzenlediği gösterilmiştir. SARA, fosfolipid ile etkileşime giren FYVE alanı ile iletişim kurar. Ek olarak SARA, sırasıyla Smad-bağlama alanı (SBD) ve C-terminal bölgesi aracılığıyla (aktive edilmemiş) R-Smads ve TGF- $\beta$  reseptör kompleksi ile aynı anda etkileşime girebilir. Tip I reseptör aktivasyonundan sonra, Smad2 ve Smad3' ün C-terminal sekansındaki iki serin tortusu, tip I reseptör kinaz tarafından fosforile edilir, ardından SARA ve tip I reseptörden ayrıştırılır. Aktive edilmiş Smad2 daha sonra Smad4 ile heteromerik bir kompleks oluşturur. Protein içeren başka bir FYVE alanı olan Hrs/Hgs' nin de reseptöre Smad sunumuna katıldığı ve TGF- $\beta$ /Smad sinyalini uyarda SARA ile sinerji oluşturduğu gösterilmiştir (Ten Dijke vd. 2002, Bassing vd. 1994, Norollahi vd., 2021) (Şekil 1.8). Fosforlanan SMAD proteinleri sinyali iletmek için çekirdeğe translokasyon yaparlar. Çekirdeğe translokasyondan sonra, SMAD' lar, konsensus DNA dizilerine doğrudan bağlanarak, diğer DNA bağlayıcı proteinlerle etkileşime girerek ve transkripsiyonel yardımcı aktivatörleri veya yardımcı baskılayıcılar ile hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Miyazono 2000).



**Şekil 1.8:** SMAD bağımlı TGF-β sinyal iletim yolu (Fernandez-Iglesias ve Gracia-Sancho 2017' den uyarlanmıştır).

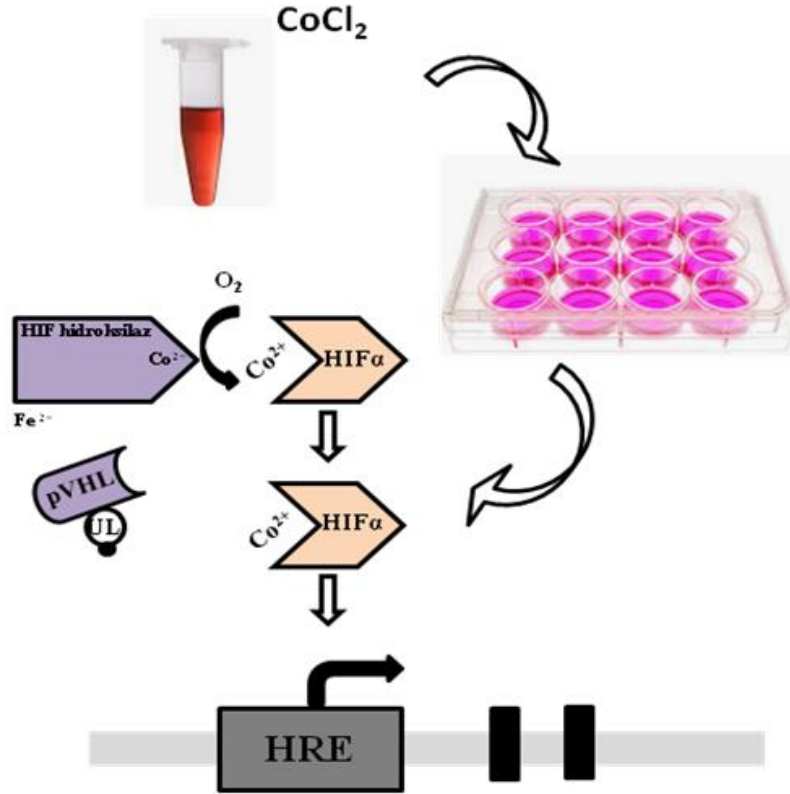
Bir diğer bağlanma şekli ise kemik morfojenetik reseptörleri ile olur. Bu bağlanma şeklinde TGF-β reseptörleri ve kemik morfojenetik reseptörleri bir kompleks oluşturarak birlikte liganda bağlanırlar (Nishitoh vd. 1996). Aktifleşen reseptörler, düzenleyici Smadları fosforiller ve ortak smad olan SMAD4 ile birlikte çekirdeğe giderler.(Gustavson vd. 2008, Heldin vd. 1997, Shi ve Massague 2003, Liu vd. 1995, Wrana vd. 1994, Yamashita vd. 1994). Sonuçta bu kompleks yapılar çekirdekte veya DNA-binding altbirimleriyle birlikte bulunabilirler ve böylece promotora bağlanarak aktive olurlar. (Miyazawa vd. 2002).

### 1.9 Hipoksik Yol

Dokudaki oksijen seviyesinin normalin altına düşmesine hipoksiya denir (Selvendiran vd. 2009). Bu duruma daha çok katı tümörlerde rastlanılır. Bu tümör hücreleri yeterli oksijeni alamadığında hücre ölümüne gitmezler ve bir takım genetik farklılıklar yaparak oksijensiz ortama uyum sağlarlar. Yapılan birçok klinik çalışma hipoksik ortamın artmasıyla tümörün de büyüdüğünü göstermektedir (Çekin 2007). Sonuç olarak tümör hücreleri, agresif hale gelirler (Selvendiran vd. 2009). Şimdiye kadar normalin altında olan oksijen koşullarına

cevap olarak HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olarak (Hipoksi indükleyici faktör) ailesi üyesi bulunmuştur. Bu ailenin üyeleri normal oksijen seviyelerinde  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerine ayrışır (Kakudo vd. 2015, Türkoğlu vd. 2021).

Kimyasal hipoksi ajanı olan  $\text{CoCl}_2$  ile çalışmamızda hipoksik model oluşturuldu. Doku kültüründe hipoksik durum oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir. ve KLK4 geninin bu koşullardaki ifadesi mRNA, protein ve promotor düzeyinde incelendi. Demir şelatörü deforoksamin (DFO) ve Kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ ) hücre kültürlerinde kullanılan, hipoksik ortam oluşturan ajanlardır. Literatüre baktığımızda bu kimyasalların kullanımının çok yaygın olduğu görülmektedir. Şekil 1.9' da gösterildiği gibi ortama  $\text{CoCl}_2$  uygulandığında, buradaki prolin hidroksilazlara bağlanır ve prolin hidroksilaz enziminin etkinliği durdurulur ve sonuçta HIF-1 $\alpha$  hidrosillenemez. Hidroksilasyon gerçekleşmediği VHL (Von Hippel-Lindau), HIF-1 $\alpha$  bağlanamaz ve HIF-1 $\alpha$  aktifleşir ve çekirdekte ilgili HRE (Hipoksi cevap elementi) bölgeleriyle bağ kurar (Yuan vd. 2003).



**Şekil 1.9:**  $\text{CoCl}_2$  ile hipoksik koşul mekanizması (Türkoğlu vd. 2021).

## 2. TEZ ÇALIŞMASININ PLANI VE KAPSAMI

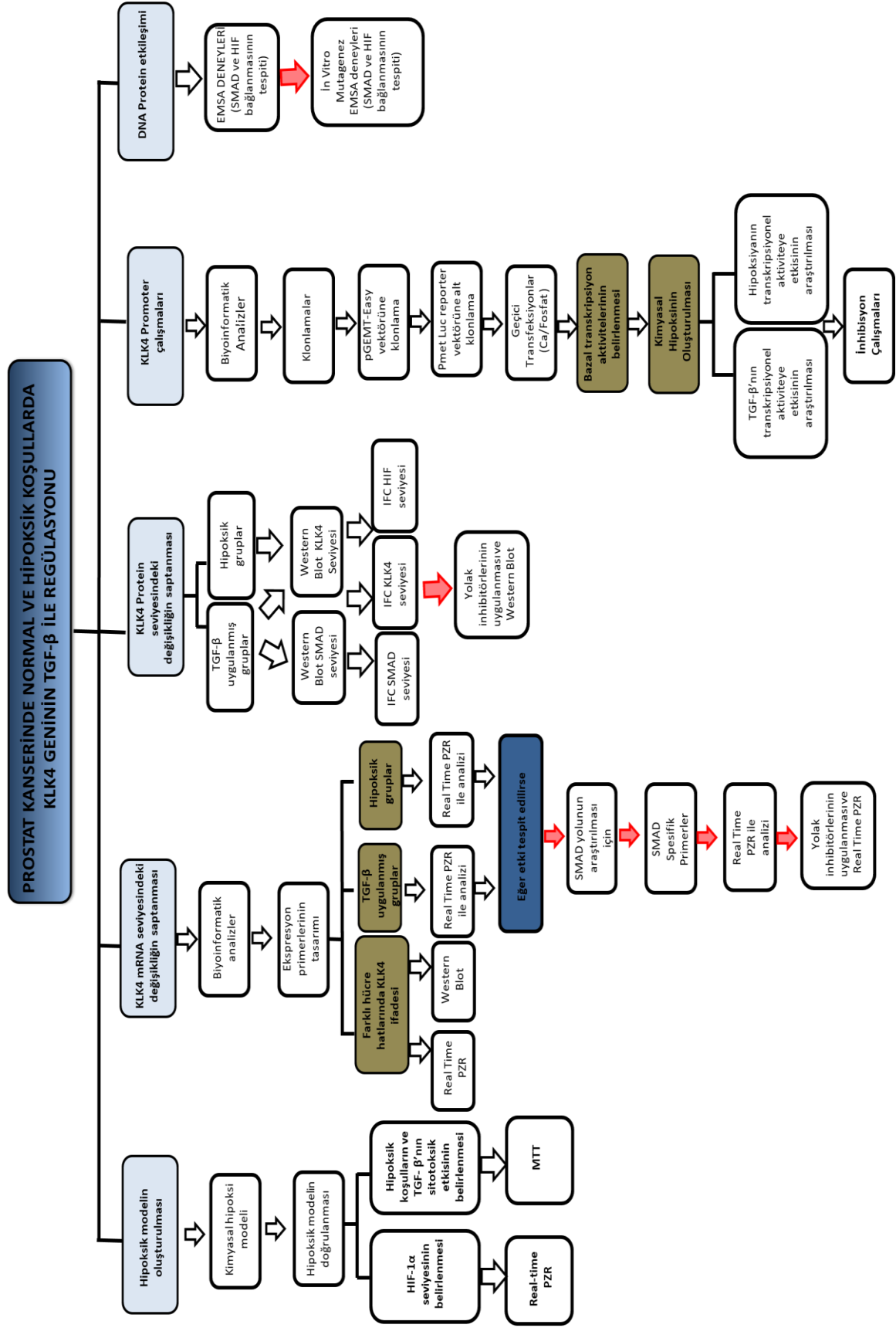
Kanser progresyonunda kanser hücreleri ile onların mikro çevre arasındaki karşılıklı iletişim önemlidir. Bu kapsamda hücrelerin mikro çevresinin hipoksik durumu da düşünüldüğünde KLK4' ün hipoksiya ile regülasyonunun aydınlatılması gerekliliği açıktır. Bütün bu bilgiler ışığında prostat kanseri için moleküler düzeyde KLK4' ün etkisinin yüksek olduğu görülmüş ve eksik olan yolun aydınlatılmasına yönelik deneylerimiz planlanmıştır. Çalışmamız kapsamında KLK4' ün hücresel düzeyde regülasyonunda TGF- $\beta$ ' nın katkısı araştırılmıştır. Çalışmalar mRNA, protein ve promotor düzeyinde gerçekleştirildi. Ayrıca izlenen cevaba göre bu cevabı SMAD bağımlı yoldan yapıp yapmadığı promotor parçalarında bulunan olası SMAD bağlanma bölgelerinin analizi ve gerçek bağlanmanın teyidi için ise EMSA deneyleri yapıldı.

- (i) CoCl<sub>2</sub> ile PC-3 ve LNCaP hücrelerinde hipoksik modelin oluşturulması ve doğrulanması
- (ii) Farklı hücre hatlarında KLK4' ün mRNA ve protein seviyesine ifadesinin belirlenmesi (REAL TİME PZR ve WESTERN BLOT).
- (iii) Hipoksiya ve TGF- $\beta$ ' nın PC-3 ve LNCaP hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi (MTT TESTİ).
- (iv) Hem normal hemde hipoksik koşula maruz bırakılan PC-3 ve LNCaP hücrelerde TGF- $\beta$ ' nın ve hipoksiyanın KLK4 mRNA seviyesine olan etkisinin belirlenmesi (REAL TİME PZR).
- (v) Hem normal hemde hipoksik koşula maruz bırakılan PC-3 ve LNCaP hücrelerinde TGF- $\beta$ ' nın ve hipoksiyanın KLK4 protein seviyesine olan etkisinin belirlenmesi (WESTERN BLOT ve IFC).
- (vi) Hem normal hemde hipoksik koşula maruz bırakılan PC-3 ve LNCaP hücrelerinde TGF- $\beta$ ' nın ve hipoksiyanın SMAD bağımsız yollardaki etkisinin belirlenmesi (WESTERN BLOT).
- (vii) İnhibitor uygulamaları sonucu yolak çalışmaları ile KLK4' ün SMAD bağımlı yada SMAD bağımsız yol tercihinin belirlenmesi. (REAL TİME PZR ve WESTERN BLOT).
- (viii) Biyoinformatik analizler, 5' kısaltılmış farklı KLK4 promotor konstraktlarının oluşturulması ve bazal aktivitesinin belirlenmesi (LUSİFERAZ/SEAP AKTİVİTE TAYİNLERİ).

(ix) Geçici transkripsiyon deneyleri ve haberci deneyler ile promotor parçalarının hipoksik koşullardaki ve TGF- $\beta$  muamelesi sonrası aktivitelerinin belirlenmesi (LUSİFERAZ/SEAP AKTİVİTE TAYİNLERİ).

(x) 5' bölgesi kısaltılmış en yüksek aktivite gösteren KLK4 promotor parçalarının inhibitör uygulamaları ile aktivitelerinin belirlenmesi (LUSİFERAZ/SEAP AKTİVİTE TAYİNLERİ).

(xi) En aktif parçaların yeniden biyoinformatik olarak değerlendirilmesi, muhtemel HİF-1 $\alpha$  (HRE- hipoksi cevap element) ve SMAD (TGF- $\beta$  sinyal yolundaki transkripsiyon faktörleri) bağlanma bölgelerinin analizi ve tam bağlanmanın ispatı için EMSA deneylerinin yapılması (ELEKTRO MOBİLİTY SHİFT ASSAY).



Şekil 2.1: Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel çalışmaya ait akış diyagramı.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kit, Kimyasal, Laboratuvar Malzemeleri ve Cihazlar

Tüm deneysel çalışmalarımız süresince kullanılan RNA, DNA, promotor, hücre kültürü, protein ve DNA-protein etkileşimli tekniklerde kullanılmış olan kitler, kimyasal maddeler, laboratuvar malzemeleri ve cihazları aşağıda verilen Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3 de listelenmiştir.

**Tablo 3.1:** Çalışmanın tamamında kullanılan kitlerin listesi.

<b>İlgili Kit</b>	<b>Üretici Firma</b>
Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module	Thermo Scientific
GeneJET RNA Pürifikasyon Kit	Thermo Scientific
GeneJET DNA Pürifikasyon Kit	Thermo Scientific
MidiPrep Plazmit DNA İzolasyon Kiti	Macherey-Nagel
MiniPrep Plazmit DNA İzolasyon Kiti	Macherey-Nagel
NücleoBond Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel
Oligo DT	Thermo Scientific
Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter Assay	Takara
Ribolock RNAase İnhibitör	Thermo Scientific
Reverse Transkriptaz	Thermo Scientific
RealQ Plus 2X Master Mix	Ampliqon
Pierce™ ECL	Thermo Scientific
ViaFect™ Transfeksiyon Kit	Promega

**Tablo 3.2:** Çalışmanın tamamında kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.

<b>İlgili Kimyasal</b>	<b>Üretici Firma</b>
Agaroz	Sigma
Akrilamid- Bisakrilamid	Merck
Ampicilin	Sigma
Antibiyotik-Antimikotik Solüsyon	Gibco
APS (Amonyum persülfat)	Fisher Chemicals
β- Merkaptoetanol	Merck
CaCl <sub>2</sub> (Kalsiyum Klorid)	Sigma
DEPC (Dietyl Pirokarbonat)	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) F12 Mix	EuroClone
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Sigma
dNTP	Thermo Scientific
EDTA (Etilendiaminetetraasetik asit)	Merck
Etanol	Sigma
Et- Br (Etidyum Bromür)	Sigma

FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
Formaldehid	Sigma
Gliserol	Merck
Hepes	Sigma
MOPS (Asitsiz)	Merck
MgCl <sub>2</sub> (Magnezyum klorür)	Thermo Scientific
NaCl <sub>2</sub> (Sodyum klorid)	Sigma
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma
One Taq Master Mix	Bio Labs New England
PBS	Sigma
Page Ruler Prest	Thermo Scientific
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu	HyQ
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma
Sığır Serum Albümini (BSA)	Sigma
RPMI Medium	Euro Clone
Yağsız Süt Tozu	Santa Cruz
Taq Buffer (5X)	Thermo Scientific
Taq Polimeraz	Thermo Scientific
Tripsin	Sigma
Trizma Base	Sigma
Tween 20	Sigma
TEMED	Sigma
Tripan Blue	Sigma
2X RNA Yükleme Boyası	Thermo Scientific
6X DNA Yükleme Boyası	Thermo Scientific
1 kb DNA Marker	Thermo Scientific

**Tablo 3.3:** Çalışmanın tamamında kullanılan laboratuvar malzemelerin listesi.

<b>İlgili Malzeme</b>	<b>Üretici Firma</b>
25-75 cm <sup>2</sup> Hücre Flaskı	Sarstedt, Germany
6 Kuyulu Hücre Plakası	SPL Life Sciences
96 Kuyulu Hücre Plakası	SPL Life Sciences
3 ml Steril Pastör Pipeti	IsoLab
Filtre 0.20µm	Sarstedt, Germany
15-50 ml Falcon	IsoLab
Eppendorf	IsoLab
İnsülin Enjektörü	Bd Micro-Fine
96 Kuyulu plaka	LightCycler 480
96 Kuyulu plaka Seal	Thermo Scientific
PVDF Membran	Millipore

**Tablo 3.4:** Çalışmanın tamamında kullanılan laboratuvar cihazlarının listesi.

<b>İlgili Malzeme</b>	<b>Üretici Firma</b>
Buz Makinesi	F. Frigoriferi Scientifici
+4 °C ve -20 °C Buzdolabı	Arçelik, Türkiye



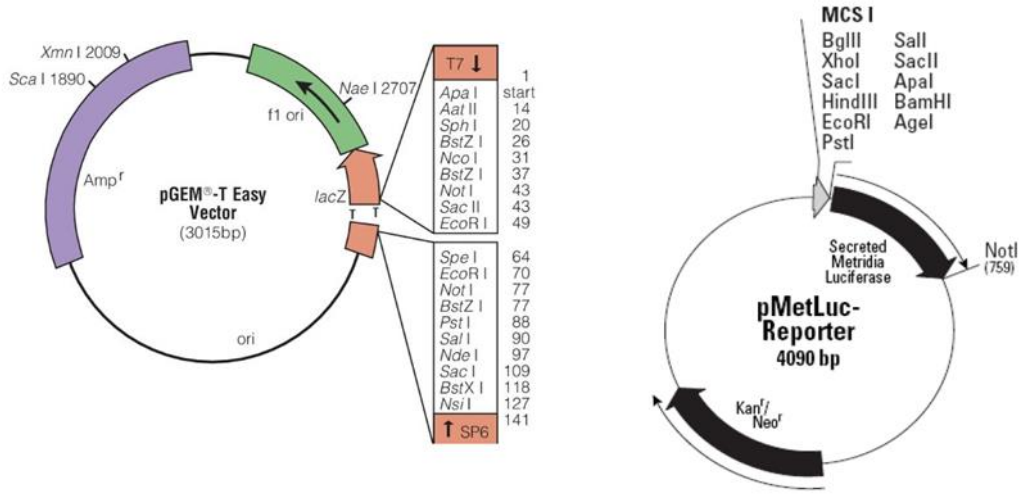
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo
-80 °C Derin Dondurucu	Wise Cryo
DNA Elektroferez Sistemi	Minicell Primo
Döner Hareketli Çalkalayıcı	Thermo Scientific
Elektroferez Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Elektronik Pipet	IsoLab
Hassas Terazî	Sartorius
Isıtıcı Blok	Major Science
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Inverted Mikroskop	Nikon
İnkübatör	Memmert
İnkübatör	WTB, German, Nüve
Laminar Air Flow	Telstar BIOII
Light-Cycler 480 Real-Time PZR	Roche Life Science
Luminometre	Thermo
Masa tipi pH Metre	Hanna
Manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica
Otomatik Pipetler	Thermo
Otoklav	Hirayama
PZR Cihazı	Bio-Rad
PZR Cihazı Thermocycler	Thermo
RNA Elektroferez Sistemi	Apelex
SDS-PAGE Aparatları	Bio-Rad
Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific
	Multiskango
Tank Blot Sistemi	Bio-Rad
Ultrasonik Su Banyosu	PlusLab
UVP Jel Görüntüleme Sistemi	BioSpectrum
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Vorteks	Elektromag
µDrop™ Plate	Thermo Fisher Scientifici
	Multiskango

---

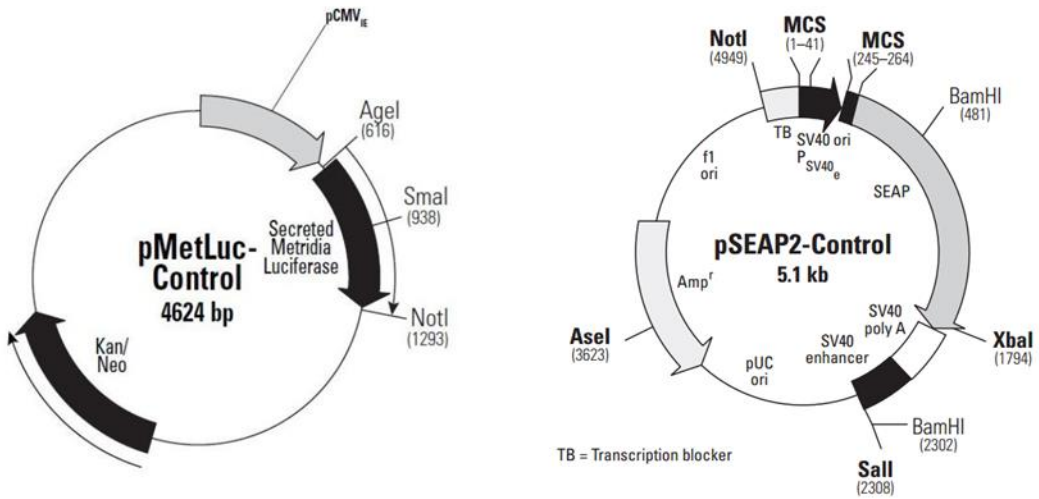
### 3.1.2 Çalışmada Kullanılan Vektörler

Çalışmamızda KLK4 promotorlarını klonlanma amacıyla pGEM-T Easy ve pMET-Luc Reporter vektör sistemleri kullanıldı.

pSEAP2 ve pMET-Luc kontrol vektör sistemleri ise transfeksiyon deneylerinin etkinliğinde kullanıldı.



Şekil 3.1: pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektörlerinin şematik gösterimi.



Şekil 3.2: pMET-Luc ve pSEAP2 kontrol vektörlerinin şematik gösterimi.

### 3.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyları

KLK4 promotorlarının klonlanması aşamasında, *E.coli* XLI-blue (Genotip: endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)) ve *E.coli* JM109 bakteri soyları (Genotip: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ( lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15] kullanıldı.

### 3.1.4 Bakteriyel Kültür Ortamı

KLK4 promotor klonlama çalışmalarında ve *E. coli* soylarını çoğaltma aşamasında besi yeri olarak LB Broth ve LB Agar kullanıldı. Bu bakteriyel besi yeri toz olarak temin edilmektedir. Kullanmadan önce dH<sub>2</sub>O ile talimatlara uygun hazırlandı ve 121 °C de otoklavlandı, ılıyınca +4 °C de muhafaza edildi.

### 3.1.5 Antibiyotikler

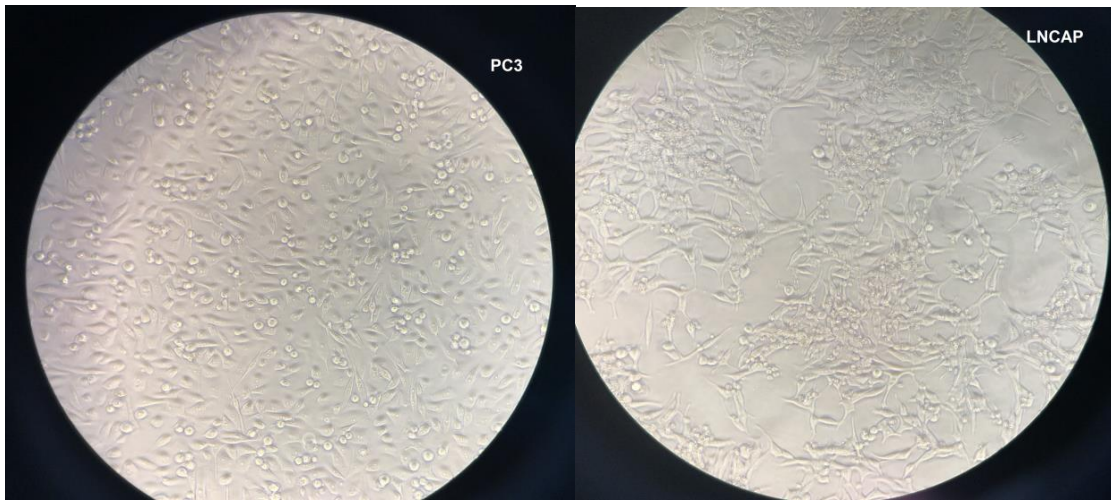
KLK4 promotor klonlama basamaklarında kullanılan Ampisilin ve Kanamisin stok olarak 100 mg/ml olarak hazırlanarak, 0,22 µm por içeren filtrelerden geçirilerek -20 °C de muhafaza edildi. Hücre kültürü çalışmalarında hücre büyütme aşamasında kullanılan 100X antibiyotik-antimikotik son konsantrasyonu 1X olacak şekilde hücrelere uygulandı.

### 3.1.6 IPTG VE X-Gal

Bu kimyasallar KLK4 promotor klonlama aşamasında, promotorların pGEM-T Easy vektörüne T:A klonlama aşamasında kullanıldı. 100 µL IPTG (100 mM stok) ve 20 µL X-Gal (stok 50 mg/ml), LB Agar içeren petrilere yayıldı.

### 3.1.7 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmada prostat kanseri hücre hatları olan PC-3 ve LNCaP hücreleri kullanıldı.



**şekil 3.3:** PC-3 ve LNCaP hücrelerinin mikroskop 10x40' lik büyütme görüntüsü (Nikon Eclipse TE2000-S).

## **3.2 Yöntemler**

### **3.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu**

Her farklı deney basamağında, deneyin yapılacağı alan alkol ile silinerek temizlendi. Deneysel çalışma için kullanılacak olan bütün malzemeler; 30 dakika (1,02 atm basınçta) 121 °C' de otoklavda önceden steril edilerek ve etüvde kurutularak kullanıldı. Manuel olarak hazırlanan tüm bakteri kültür ortamları, kimyasal solüsyonlar ve dH<sub>2</sub>O gibi malzemeler 121 °C' de yarım saat (1,02 atm basınçta ) temiz otoklavında önceden steril edilerek deneysel aşamalarda kullanıldı. Otoklava giremeyen solüsyonlar ise 0.20µm pora sahip filtreden geçirildikten sonra kullanıldı.

### **3.2.2 Hücre Kültüründe Gerçekleştirilen Çalışmalar**

#### **3.2.2.1 Hücre Kültürü Malzeme Hazırlığı**

##### **3.2.2.1.1.1 Hücre Besiyerinin (Medyumunun) Hazırlanması**

Hücreleri büyütmeye kullanılan medyum PC-3 (prostat kanseri hücre hattı) hücresi için DMEM F12 Mix (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine bazı zamanlarda (sadece hücre büyütmeye aşamasında) 100X Antibiyotik-Antimikotik son konsantrasyonu 1X olacak şekilde ve her zaman FCS (Fetal Calf Serum) oranı toplam hacimde %10 olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca LNCaP (androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı) hücreleri için RPMI (Revolution Per Minutes) içine yine bazı zamanlarda (sadece hücre büyütmeye aşamasında) 100X Antibiyotik-Antimikotik son konsantrasyonu 1X olacak şekilde ve her zaman FCS (Fetal Calf Serum) oranı toplam hacimde %10 olarak hazırlandı.

##### **3.2.2.1.1.2 FCS (Fetal Calf Serum)**

Firmalardan temin edilen FCS uzun dönem için -20 °C' de saklandı. Her zaman ilk kullanımdan önce +4 °C de buzların erimesi için bekletildi. Buzları eriyen FCS, 56 °C de yarım saat ısı ile inaktivasyon gerçekleştirilerek kullanıldı.

##### **3.2.2.1.1.3 PBS ( Phosphate-Buffered Salin) Tampon Çözeltisinin Hazırlanması**

Tablet şeklinde temin edilecek PBS, her tableti 500 ml ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanıp, otoklavlanarak +4 °C de saklandı.

#### **3.2.2.1.1.4 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması**

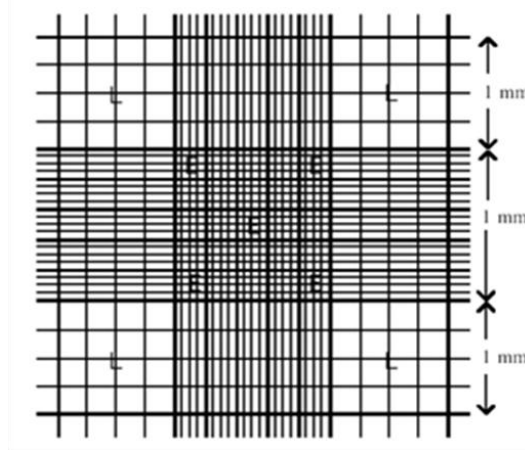
0,5 mM EDTA, % 0,05 Tripsin tartılarak, steril PBS içerisine eklendi ve çözüldü. Ardından kullanılmak üzere 0,22 µm' lik porlara sahip olan filtrelerden geçirilerek kullanıldı.

#### **3.2.2.2 Çalışmada Kullanılacak Hücre Soylarının Kültürü, Pasajlanması ve Dondurulması**

Hücreler uzun süreliğine -80 °C' de saklandı. Hücreleri büyütmek amacıyla daha önce stoklanan -80 °C' den çıkarılarak çözdürüldü. Bu sırada FCS içeren medyum hazırlandı ve hücrelere eklenerek santrifüj işlemi ile hücreler çöktürüldü. Çöktürülen pellete taze besi yeri eklenerek 75cm<sup>2</sup>' lik flasklara büyümeleri için ekildi. Flasklar % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C' de inkübatörlerde büyütüldü. Flask yüzeyini dolduran hücreler, içerisindeki besi yeri uzaklaştırılarak flask yüzeyinden kaldırmak amacıyla Tripsin-EDTA eklendi ve inkübatörde 3 dk inkübasyon yapılarak hücreler flasklardan falkonlara toplandı. Ardından santrifüj ile çöktürme işlemi uygulanarak hücrelerin bulunduğu Tripsin-EDTA' dan kurtulmaları sağlandı. Daha sonra pelletlere taze besi yeri eklenerek çözüldü ve yeni flasklara aktarım yapıldı. LNCaP hücreleri için RPMI medyumu PC-3 hücreleri için ise DMEM F12 Mix kullanıldı.

#### **3.2.2.3 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi ve Hücre Sayımı**

Hücre kültüründe büyüyen hücrelerden aynı koşullarda ve eşit sayıda hücre ile deney kurabilmek için hücrelerin sayılması gerekiyor ve bunun için tripan mavisi kullanıldı. Flasklardan kaldırılıp çöktürülen hücrelere temiz besi yeri eklenerek falkonlar içerisinde çözdürüldü ve birebir oranında üzerine tripan mavisi eklenerek bir süre inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bu karışımdan alınarak 1 ml deki hücre sayısını belirleyebilmek için hemositometre lamında sayım yapıldı. En az iki kez sayım sonucu bu sayımın ortaması alındı ve toplam hücre sayısı, Hemositometre sayım sonucunun 2 x 10<sup>4</sup> ile çarpılması ile bulundu.



Şekil 3.4: Hemositometre lamı alanı.

### 3.2.2.4 MTT Çalışması (TGF- $\beta$ Sitokinininin ve CoCl<sub>2</sub>' nin Sitotoksik Etkisini Test Etmek için)

MTT metodu canlı hücrelerin mitokondrilerinin reaksiyon oluşturması ile, hücre mitokondrilerinde var olan dehidrogenaz enzimleri tarafından MTT solüsyonunda bulunan tetrazolium halkası parçalanır ve ortaya formazan kristalleri çıkar. MTT sarı renkli bir formazan tuzdur. Proliferasyona uğrayan hücreler artan mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesi ile MTT' yi mor renkli suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürür (Erkekoğlu ve Baydar 2021, Oh ve Hong 2022). Deneyden 1 gün önce, yapılan hücre sayımının ardından, 96 kuyucuklu plakalara hücreler 10.000 hücre olacak şekilde yayıldı. Bu test hem PC-3 hemde LNCaP hücrelerinde gerçekleştirildi. Hücreler yayıldıktan sonra bir gece inkübatörde inkübasyona bırakıldı, Ertesi gün % 0,1 BSA' lı (Bovine Serum Albumin) medyuma (DMEM F12 Mix veya RPMI) alındı ve 1 saat aralıklarla son konsantrasyonu 150  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> eklendi ve hücreler hipoksik koşullar için uyarıldıktan sonra 500Ü/ml (20ng/ml) TGF- $\beta$  sitokini eklendi. Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonrasında son konsantrasyonu 0.5 mg/ml olarak, hazırlanan MTT solüsyonu kuyulara eklendi. 4 saat 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi. İşlem sonunda ortamdaki medyum atıldı ve izopropanol (0,004 M HCl içeren) ile kristaller çözüldü (bu kristaller suda çözünmezler) ve 550 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.

### 3.2.3 mRNA Seviyesindeki Etkilerin Analizi ile İlgili Teknikler

#### 3.2.3.1 Primer Dizaynı

KLK4 genine ait ekspresyon primerlerinin tasarlanması amacıyla öncelikle genin, mRNA transkriptine ait dizi NCBI' dan bulundu. NCBI Gene ID: 9622 kayıtlı dizi ile çalışıldı.

KLK4 geni 5 ekzon, 4 intron bölgesi içermektedir. Bu dizinin ekzon bölgeleri işaretlendi ve primerlerin farklı ekzonlardan olmasına dikkat edildi. Primer dizaynında, dizayn edilen primerlerin Blastta hedef geni %100 vermesine, sonrasındaki çakışma gösteren bölgelerin % benzerliklerinin % 70' den az olmasına, spesifikliğı arttırmak için farklı ekzonları içermesine, forward (ileri) ve reverse (geri) primerlerin Tm değerlerinin yakın olmasına, primer uzunluklarının 20-25 bazı geçmemesine, ürün büyüklüğünün 300 baz çiftini geçmemesine dikkat edildi. Primerler Macro Gen firmasından temin edildi.

### **3.2.3.2 Farklı Hücre Hatlarından KLK4 mRNA İfadesi için Deney Kurulması**

KLK4 geninin mRNA ifadesini belirlemek amacıyla, PC-3/LNCaP (insan prostat kanseri hücre hatları), HT-29/SW480 (insan kolon kanseri hücre hatları), HEP 3B (insan hepatoselüler kanseri hücre hattı) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücre hattı) hücreleri 75 cm<sup>2</sup>' lik flasklarda büyütüldükten sonra, bölüm 3.2.2.3 de anlatıldığı şekilde hücreler kaldırılıp sayıldı. Daha sonra her bir hücre hattı 25cm<sup>2</sup> flasklara 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler flasklardan tripsinizasyon ile kazanarak ependorflara alındı ve 2 kez PBS ile yıkamaları gerçekleştirilerek kuru hale getirilen pelletlerden Thermo Scientific-GeneJET RNA purification kiti (Ref K0731 Lot 00683657) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

### **3.2.3.3 Deney Düzeninin Kurulması (TGF-β ve CoCl<sub>2</sub> Uygulamaları) ve RNA**

#### **İzolasyonu**

PC-3 ve LNCaP hücreleri rutin pasajlama ile uygun sayıya ulaştıklarında tripan mavisi ile sayımı yapıldıktan sonra PC-3 hücreleri 5 ml hacimde %10 FCS + DMEMF12 Mix, LNCaP hücreleri ise %10 FCS + RPMI içeren besiyerinde 25 cm<sup>2</sup>' lik flasklara 2.000.000 hücre olarak yayıldı. Hücreler 1 gece inkübe edildi. Daha sonra medyum hücrelerden uzaklaştırılarak % 0,1 BSA (Bovine Serum Albumin) içeren besi yeri (PC-3 hücreleri için DMEMF12 Mixi, LNCaP hücreleri için RPMI) hücrelere eklendi. 1 saatlik inkübasyon sonunda 1' er saat arayla, 150 µM CoCl<sub>2</sub> ve 500 Ü/ml (20ng/ml) TGF-β ayrı ayrı ve birlikte 500 Ü/ml (20ng/ml) TGF-β + 150 µM CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Bu gruplar dışında ayrıca kontrol grupları da oluşturuldu. PC-3 hücrelerinde 1, 3, 6 ve 24 saat olarak LNCaP hücreleri için ise 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman dilimlerinde gruplar oluşturuldu. Kontrol ve deney grupları bu saatler sonunda kaldırılarak çöktürüldü ve PBS ile 2 kez pellet yıkandı. Deney gruplarından toplanan tüm pelletlerden dondurulmadan aynı gün içinde RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Thermo Scientific Gene Jet RNA Purification

Kit firmasının kitinde bulunan talimatlar doğrultusunda RNA izolasyonları yapıldı. Tüm aşamalarda sterilizasyona dikkat edildi ve özellikle DEPC' li dH<sub>2</sub>O ile tüm yüzeyler temizlendi. Elde edilen RNA' lar -80 °C dondurucuda uzun dönemde saklandı.

### 3.2.3.4 RNA Miktarlarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA' ların mikrodropta 260 nm ve 280 nm'de absorbanları alındı. A260/A280 değerleri oranlanarak RNA' ların saflıkları belirlendi. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. RNA' lar uzun dönemde -80 °C' de muhafaza edildi.

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

### 3.2.3.5 Formaldehit Jel Elektroforezi (RNA jeli)

Formaldehit Jel Elektroforezi yapmadan önce kullanılan malzemeler RNaz enzimlerinden etkilenmemesi için elektroforez tankı, aparatları, cam malzemeler ve kullanılan tüm aparatlar, jel hazırlanmadan önce steril edildi. Bunun için tüm malzemeler SDS ile temizlendikten sonra DEPC' li su ve etanol ile de yıkandı ve sonra temiz bir ortamda bekletildi. Kaset hacmine göre agaroz, DEPC' li su ve 10 X FA tamponu kaynatılarak soğumaya bırakıldı. Daha sonra etidyum bromür ve formaldehit eklendi ve karışım kasete yayıldı. Donan jel içerisi 1 XFA jel ile dolu olan tanka konuldu. RNA örnekleri üzerine 2 X yükleme boyası konularak 65 °C' de 10 dakika denatürasyon gerçekleştirildi ve süre sonunda soğutulan örnekler jele yüklendi. RNA' ların kalitesi UVP de görüntülendikten sonra diğer basamaklara geçildi.

**Tablo 3.5:** Formaldehit Jel Elektroforezi çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
10 X FA Jel Tamponu	6,8 g Na-asetat, 41,9 g MOPS (asitsiz), 20 ml 0,5 M EDTA eklendi. pH 7,00,2' ye ayarlandı.
FA Jel Yürütme Tamponu	100 ml 10 X FA Jel tampon stoğundan, 20 ml %37' lik (12,3 M) formaldehit, 880 ml DEPC' li su ile 1 litreye tamamlandı.



**Tablo 3.6:** DEPC' li dH<sub>2</sub>O.

<b>Çözelti</b>	<b>İçeriği</b>
1 lt DEPC' li H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC, 1 lt dH <sub>2</sub> O' ya eklendi ve 37 °C' de 1 gece bekletildi.

### **3.2.3.6 cDNA Sentezi (qRT- PZR Reaksiyonu)**

İzolasyonları yapılan ve miktar tayini yapılan RNA' lardan cDNA sentezi yapmak için 1 µg kullanıldı. Bunun için 1 µL Oligo dT eklenerek dH<sub>2</sub>O ile 12,5 µl' ye tamamlandı ve 65 °C' de 5 dakika PZR cihazında inkübe edildi. Daha sonra 2 µL dNTP, 4 µL Buffer RT, 0,5 µL Ribolock ve 1 µL Revers Transkriptaz enzimi ile bir karışım hazırlanarak tüplere 7,5 µL olarak paylaştırıldı. Daha sonra örnekler 42 °C de 1 saat ve 72 °C 10 dakika PZR cihazında inkübe edildi. PZR cihazından alınan cDNA' lar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' de kullanılmak üzere saklandı.

### **3.2.3.7 İnsan β2 Mikroglobulin (Hβ2 ) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile cDNA' ların Kontrolü**

Yapılan cDNA sentezinden sonra Hβ2 ile tablo 3.7' deki koşullarda PZR gerçekleştirildi. PZR reaksiyonları 50 µL hacimde yapıldı. Kalıp olarak 1 µL cDNA kullanıldı. 2 ng ileri ve geri primerden, 200 mM her bir dNTP' den, 1 X Tampon, 2.5 ünite Taq DNA polimeraz ve 1 mM MgCl<sub>2</sub> kullanıldı. PZR sonuçları agaroz jel elektroforezi yapılarak görüntülendi.

**Tablo 3.7:** Hβ2 PZR koşulları.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü</b>
94°C	2 dk	1
94°C	2 dk	35
60°C	30 sn	35
72°C	45 sn	35
72°C	5 dk	1

### **3.2.3.8 Gerçek Zamanlı PZR**

Bu çalışma için 'LightCycler 480 SSB Green I MasterMix kiti kullanıldı. 96 kuyusu olan plakada her örnek 3 tekrarlı olacak şekilde dizayn edilip çalışıldı. Kitin önerdiği şekilde (tablo 3.8) örnekler ve master mix paylaştırılarak Roche Gerçek Zamanlı PZR cihazına tablo 3.9' daki koşullar ile ve tablo 3.10' daki primerler kullanılarak işlem

gerçekleştirildi. Tamamlanan döngü sonunda cihazdan Ct değerleri alınarak excelde aşağıdaki formül kullanılarak analiz edildi.

$$Ct_{H\beta 2} - Ct_{\text{çalışılan gen}} = \Delta Ct$$

$$\text{Hedef ct değeri} = 2^{-\Delta Ct}$$

**Tablo 3.8:** Gerçek Zamanlı PZR bileşenleri.

BİLEŞENLER	MİKTAR
cDNA	1 µL
Primer-Forward	0,5 µL
Primer-Reverse	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	4,25 µL
Master Mix	6,25 µL
Son Hacim	12,5 µL

**Tablo 3.9:** Gerçek Zamanlı PZR koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	10 dk	1
95°C	30 sn	35
55°C	30 sn	35
72°C	30 sn	35
95°C	5 sn	1
65°C	1 dk	

**Tablo 3.10:** Gerçek Zamanlı PZR deneyinde kullanılan primer bilgileri.

KLK4				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- CACTGGTCATGGA AAACGAATT-3'	5'- ATGAGGTCGTTAG CGAGCAAG-3'	NM_00491 7 XM_00113 4318	214bp	55°C
Hβ2				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'TTTCTGGCCTGG AGGCTATC '3	5'CATGTCTCCATC CCACTTAACT '3	NM_00404 8	314 bp	55°C

<b>SMAD 2</b>				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- CGCCAGTTGTGAA GAGACTGCTGG - 3'	5'- GGGATACCTGGAG ACGACCATCAA-3'	XM_00672 2451.1	330bp	55°C
<b>SMAD 3</b>				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- GTGAAGCGCCTG CTGGGCTGGAA 3'	5'- ATTGAAGGCGAAC TCACACAGCTcc -3'	NM_00590 2.3	309bp	55°C
<b>SMAD 4</b>				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- TGAAAGTTTGGTA AAGAAGCTGAAG -3'	5'- TCACCATCATACT TGATGGAGCAT -3'	NM_00535 9.5	356bp	55°C
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>				
Forward	Reverse	Accession Number	Product Size	Annealing sıcaklığı
5'- CCACCTATGACCT GCTTGGT-3'	5'- TGTCCTGTGGTGA CTTGTCC-3'	NM_00124 3084	302bp	55°C

### 3.2.4 Protein ile İlgili Teknikler

#### 3.2.4.1 Farklı Hücre Hatlarından KLK4 Protein İfadesi için Deney Düzeninin

##### Kurulması

Kültürde HT29/SW480, HUVEC ve HEP 3B hücreleri DMEM High Glukoz içeren besiyerinde, PC-3 DMEM F12 Mix, LNCaP hücreleri ise RPMI içeren besi yerinde büyütüldükten sonra, 25 cm<sup>2</sup> flasklara, 2x10<sup>6</sup> olarak ekildi ve hücrelerden 24 saat sonunda KLK4 geninin protein ifadesini belirlemek amacıyla, RIPA Buffer ile protein izolasyonu gerçekleştirildi. Her bir hücre hattına ait proteinden 35µg örnek kullanıldı.

#### 3.2.4.2 Deney Düzeninin Kurulması (TGF- $\beta$ ve CoCl<sub>2</sub> Uygulamaları) ve Protein

##### Ekstraktlarının Hazırlanması

Hücre kültüründe büyütülen PC-3 hücreleri, % 10 FCS içeren DMEM F12 Mix, LNCaP hücreleri RPMI ortamında ve son konsantrasyonu 1X olacak şekilde Antibiyotik-

Antimikotik içeren besiyeri içerisine 6 well plakalara her bir kuyuya yaklaşık 500.000 hücre olacak şekilde yayıldı. 24 saat sonunda tüm flasklar antibiyotiksiz besiyerine alındı. Sitokin içeren gruplar ise, yine antibiyotik içermeyen % 0,1' lik BSA içeren medyumlu ortama alındı. Bu işlemden sonra PC-3 hücre grubuna; 1 saat sonra, 24 saatlik deney gruplarına ait hipoksik flasklara 150 µM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 1 saat sonra ise ilgili flasklara 500Ü/ml (20ng/ml) human TGF-β sitokini uygulandı. PC-3 deney grubu için bir sonraki gün aynı uygulamalar sırasıyla 6 saat, 3 saat ve 1 saat deney grupları için de tekrarlandı. 24 saat sonunda 1 saat, 3 saat, 6 saat ve 24 saatlik tüm deney gruplarındaki her bir flask PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra, buz üzerinde 250' şer µL Ripa Buffer (tablo 3.11) eklendi ve flasklardan hücreler bir kazıyıcı spatula yardımıyla kazınarak kaldırılıp soğuk ependorflarda ayrı ayrı toplandı. LNCaP deney grubu için ise 72 saat' lik hipoksik flasklara 150 µM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 1 saat sonra ise ilgili flasklara 500Ü/ml (20ng/ml) human TGF-β sitokini uygulandı ve bir sonraki gün 48 saatlik gruplara, diğer gün ise 24 saatlik ve 6 saatlik gruplara uygulama yapıldı ve 72 saat sonunda hücreler toplandı. Her iki deney grubundan da alınan örnekler 45 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi ve her 10 dakika da bir pipetaj yapıldı. +4 °C soğutmalı santrifüjde 135000 rpm' de 15 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant (sıvı kısım) soğutulmuş ependorfa alındı.

**Tablo 3.11:** Ripa Buffer çözeltisinin içeriği.

<b>Bileşenler (Son Konstrasyon)</b>	<b>Alınan miktar</b>
10 mM TrisCl (pH:8)	500 µl
%1 Triton X100	500 µl
%0,1 SDS	10 ml
%0,1 Sodyum deoxycholate	0,05 g
1 mM EDTA	100 µl
1 mM EGTA	500 µl
140 mM NaCl	7 ml
Proteaz İnhibitörü	2 tablet

### 3.2.4.3 Protein Miktarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Protein miktarını belirlemek amacıyla kullandığımız çözelti Bradford çözeltisidir. Ölçüm için kullanılan 96 well plakanın herbir kuyusuna 250 µL Bradford çözeltisi konuldu ve üzerine 3 µL protein örneğinden ve 2 µL de dH<sub>2</sub>O eklenerek 15 dk karanlıkta inkübe edildi. Ardından 595 nm de spektrofotometrede absorbans alındı. Standart eğri grafiğine göre hesaplama yapıldı ve aşağıdaki formül kullanılarak x değerleri yani protein miktarları hesaplandı.

$$Y(\text{Absorbans değeri-kör}) = 0,0005X+0,0559x5/3$$

### 3.2.4.4 SDS PAGE

Bu deney içerisinde kullanılacak tüm malzemeler deneye başlamadan önce temizlendi. 1mm olan camlar aparatlara yerleştirilerek ilk olarak lower buffer ile alt kısım yani proteinlerin ayrılacağı jel döküldü ve jelin donması için bir süre beklendi. Daha sonra proteinlerin kuyulara yüklenebilmesi için upper buffer (tablo 3.12) kullanarak üst jel dökülerek taraklar yerleştirildi. Donan jeller tank içine yerleştirildi.

Miktarları hesaplanan proteinlerden PC-3 hücrelerine ait deney grubu proteinleri 50 µg, LNCaP hücrelerine ait deney grubundan ise 25 µg, olacak hacimde alındı. Protein örneklerini üzerine 4X Sample Buffer ve β-merkapt etanol ile oluşturulan karışımdan kondu. Örnekler 95 °C' de 5 dakika denatüre edildi ve proteinler soğuduğunda kuyulara yüklenerek yürütme işlemine geçildi. Jelin yürütülmesi için, tank içerisine gerekli bölgeye kadar 1 X Running Buffer dolduruldu 90 voltta yaklaşık 120 dakika yürütüldü.

**Tablo 3.12:** SDS PAGE jel solüsyonları.

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığıma Jeli
Üst Jel Buffer	-	2.5 ml
Alt Jel Tamponu	2.5 ml	-
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH <sub>2</sub> O	5 ml	6.25 ml
% 10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

**Tablo 3.13:** Western Blot çözeltileri.

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

### 3.2.4.5 SDS Jelinin Blotlanması

Yürütmeden alınan örnekler soğuk transfer buffer içine bırakıldı. Transfer işlemine geçmeden önce kullanılacak olan naylon membranları aktif hale getirmek için metanol içerisinde 5 dakika tutuldu. Transfer sistemi aparatları, süngerlerde aynı transfer buffer içine bırakıldı. Kurutma kağıtları ve PVDF membran jel boyutlarında kesilerek hazırlandı. Kurutma kağıtlarında soğuk transfer bufferda ıslatıldı. Cam levhalar arasındaki jel çıkartıldı, yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı.

Daha sonra transfer işlemine geçildi. Membranı transfer tankına yerleştirebilmek için öncelikle kaset üzerine süngerler konuldu, üzerine kurutma kağıtları yerleştirildi ve bunların üzerine proteinlerin yürütüldüğü jel konuldu. Jel üzerine naylon membran yerleştirilerek aynı işlem içten dışa doğru gerçekleştirilerek yapıldı. Tank içerisine önceden soğutulmuş transfer buffer konularak bir gece +4 °C’ de transfere bırakıldı.

### 3.2.4.6 Proteinlerin Belirlenmesi

Transfer sisteminden alınan membranlar yağsız süt tozu ile hazırlanan bloklama çözeltisinde içerisinde 1 saat oda ısısında çalkalamaya bırakıldı. Süre sonunda 3 kez 1X TBS tamponu ile 5’ er dakika arayla yıkandı. Membranlar primer antikolarla (1 gece) muamele edildikten sonra, 5 dakikalık sürelerle 3 kez tekrar yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra sekonder antikolarla (1-1,5 saat) inkübe edildi. Membranlar ECL kitinin Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 100’ er µL alınarak karıştırıldı ve membrana uygulandı. Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında sonuçlar görüntülendi.

**Tablo 3.14:** Primer ve Sekonder Antikor Bilgileri.

Antikor ismi	Antikor Bilgisi	Tipi	Bloklama Isısı	Bloklama Süresi	Antikor Oranı	Büyükklük (KDa)
KLK4	PA5-72768 rabbit IgG polyclonal antibody	Primer	+4°C	1 gece	1/1000 (1µg)	29 kDA
β-aktin	A2228- Monoclonal Anti β- aktin	Primer	oda sıcaklığı	1 saat	1/7000	42 kDA

Smad2/3	mouse Sc-133098 lot#j0112 mouse monoclonal IgG2	Primer	oda sıcaklığı	1-1,5 saat	1/500	55-60 kDA
P38 MAPK	Cell signaling #8690 rabbit Antibody	Primer	+4°C	1 gece	1/1000	40kDA
SAPK/JNK	Cell signaling #9252 rabbit mAb	Primer	+4°C	1 gece	1/1000	46-54 kDA
NF-K $\beta$ p65	Cell signaling #4764 rabbit mAb	Primer	+4°C	1 gece	1/1000	65 kDA
PI3 Kinase p85	Cell signaling #4257 rabbit mAb	Primer	+4°C	1 gece	1/1000	85 kDA
Sekonder Antibody	Sc-2004 Goat anti- Rabbit IgG (H+L) HRP	Sekonder	oda sıcaklığı	1 saat	1/5000	-
Sekonder Antibody	Sc-516102 m-IgGk BP-HRP	Sekonder	oda sıcaklığı	1 saat	1/5000	-

### 3.2.5 İmmunofloresans Yöntemi (IFC)

Hücre kültüründe deneyden önce büyütülen PC-3 ve LNCaP hücreleri deney için sayıldı. Daha sonra 24 kuyulu plakaların yüzeyine yuvarlak lameller yerleştirilerek üzerlerine 125.000 hücre ekildi. Hücreler bir gece bekletildi. Bir sonraki gün ortamda FCS' li medyum içeren besiyeri atıldı ve hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Hipoksik ve normoksik şartlar altında TGF- $\beta$  sitokini etkili KLK4 protein ifadesini belirlemek üzere hipoksik model için deney planı dahilindeki kuyulara 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> eklendi. 1 saat sonra TGF- $\beta$  çalışılacak kuyulara 500Ü/ml (20ng/ml) olacak şekilde TGF- $\beta$  eklenerek 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kuyulardaki medyum uzaklaştırılarak her kuyu PBS ile tekrar yıkandı. Daha sonra kuyulara % 4' lük paraformaldehit uygulanarak 15 dk bekletildi. Süre sonunda bu solüsyon yüzeyden uzaklaştırıldı ve PBS ile tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi. Uygulayacağımız antikorların hücreye etki edebilmesi için hücre zarında bulunan porların açılması gerekiyor ve bunun içinde Triton X-100 ve PBS karışımı

hücrelere eklendi. Bu işlem 5 dk sürdü ve süre sonunda yine yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra her bir kuyuya içerisinde % 10 BSA bulunan PBS den eklenerek bloklama işlemi yapıldı. 30dk sonunda yine yıkama yapıldı ve KLK4 çalışılacak kuyulara PBS içerisinde 1/50 oranında seyreltilmiş % 1 BSA içeren KLK4 primer antikoru kuyulara uygulandı. Aynı oranda SMAD ve HIF antikoru da hazırlanarak ilgili kuyulara primer antikolar konularak eklendi. 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra primer antikolar ortamdan uzaklaştırıldı ve tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi. 1/100 oranında seyreltilmiş sekonder antikor primer antikolar gibi hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Uygulamadan sonra tekrar yıkama yapıldı ve çekirdeklerin boyanması amacıyla 1 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) eklendi ve tekrar ortamdan uzaklaştırılarak yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya 'Mounting Medyum' antifade damlatılarak sinyalin solması önlenildi ve yuvarlak lameller 96 kuyulu plakalardan çıkartılarak lamalar üzerine ters olarak kapatıldı ve Balıkesir Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne ait laboratuvarında bulunan "ED200" floresans ataçmanlı "Olympus BX51" marka mikroskopla floresans görüntülemelerinde kullanıldı. Elde edilen görüntülerin çekimleri "Olympus DP72" ile yapıldı.

### **3.2.6 KLK4 Promotor Klonlama Çalışmaları**

#### **3.2.6.1 Primer Tasarımı**

KLK4 genine ait promotorları klonlayabilmek amacıyla öncelikle primer tasarımı için <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com) ve [www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org) sitelerinden yararlanıldı. Tasarlanacak olan primerlerin Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına, saç tokası yapısı oluşturmamasına dikkat edildi. KLK4 geni için hazırlanan primerler son olarak databanklardaki DNA sekansları ile blast yapıldı. Tasarlanan primerlere klonlama yapılacak olan pGEM-T Easy ve pMetLuc-Reporter vektörlerine aktarılacak stratejide uç bölgelerine Xho1 ve HindIII restriksiyon enzimleri eklendi. Ayrıca KLK4 promotor bölgesi MatInspector programında analiz edilerek TF (transkripsiyon faktörü) bağlanma bölgeleri belirlenerek primerler tasarlandı. Primerler Macro Gen firmasından sipariş edildi.

#### **3.2.6.2 Genomik DNA İzolasyonu**

PC-3 hücrelerinden genomik DNA izolasyonu için Analytik jena innuprep DNA Mini Kitin talimatlarına uygun şekilde izolasyon gerçekleştirildi. Hücre pelletleri 10 dk 5000 rpm de santrifüj yapıldı. Sıvı kısım atılarak 400 µL Lysis solution TLS eklendi. Üzerine 25



$\mu\text{L}$  Proteinaz K eklenip 5sn' ye vorteks yapıldı. 50 °C örnekler konuldu. Üzerine 400  $\mu\text{L}$  Binding solution eklenerek vorteks yapıldı. Örnekler kit kolonuna aktarıldı. 11.000 rpm de 2 dk santrifüj yapıldı. Örnekler bitene kadar bu işlem tekrarlandı. Daha sonra 500  $\mu\text{L}$  Washing solution HS ile yıkama işlemi yapılarak 11.000 rpm de 1 dk santrifüj yapıldı. Ardından 750  $\mu\text{L}$  Washing solution MS eklendi ve tekrar 11.000 rpm de 1 dk santrifüj yapıldı. Etanoldan kurtulmak için 11.000 rpm de 3 dk daha santrifüj yapıldı. Ardından Elüsyon Buffer ile 11.000 rpm de 1 dk santrifüj yapılarak DNA elüe edildi.

### **3.2.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)**

gDNA izolasyonundan sonra PZR çalışmalarına geçildi. PZR işlemi her bir tüp için 50  $\mu\text{L}$  son hacimde gerçekleştirildi 1000-1500 ng gDNA, primerler için 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 200 mM her bir dNTP, 1X Tampon ve 0,5 $\mu\text{l}$  (2,5 Ü) Taq DNA polimeraz kullanıldı. Ayrıca aynı PZR denemeleri One Taq Master Mix kullanılarak gerçekleştirildi. One Taq Master Mix kullanılarak yapılan PZR çalışmalarında her bir tüpe sadece, Forward ve Reverse primerlerden son konsantrasyonu 2ng/ $\mu\text{L}$  olacak şekilde eklendi ve üzerine 1000-1500 ng gDNA konuldu. Yine son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 50  $\mu\text{L}$ ' ye tamamlandı. PZR cihazına yerleştirildi süre sonunda alınan örnekler agaroz jelde yürütülerek UVP de görüntülendi.

### **3.2.6.4 DNA Agaroz Jel Elektrofrez**

PZR örnekleri için, % 0,8-1 (bu oran DNA' nın büyüklüğüne göre değişir) konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Kaset büyüklüğüne göre hassas terazide ölçülen agaroz üzerine 0,5 X TBE (Tris Borik Asit EDTA) eklenerek kaynatıldı. Soğuyan bu karışıma DNA' yı UV de görünür hale getirebilmek için etidyum bromür konuldu. Ardından jel kasete döküldü. Donan jel elektrofrez tankına yerleştirildi ve elektrofrez cihazı 0,5 X TBE ( Tablo 3.15) ile dolduruldu. DNA örnekleri üzerine bromfenol mavisini kullanarak agaroz jelde yürüyen DNA parçaları görünür hale getirildi. Jelde yürüyen DNA' ları takip edebilmek için 1 kb veya 100 bç DNA markerları kullanıldı. Ardından 90 volt elektrik akımında 90 dakika örnekler yürütüldü. Elektrofrez sonuçları UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

**Tablo 3.15:** DNA Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri.

<b>Solüsyon</b>	<b>İçeriği</b>
5 X TBE (pH:8,00)	27,5 g Borik Asit tartılır, 54 g Tris Base ve 20 ml 0,5 M EDTA eklenir. pH 8,00 ayarlanır (1 litre hacim için miktar).
0,5 X TBE (Tris Borik Asit EDTA)	Hazırlanan 5 X TBE' den 100 ml alınarak dH <sub>2</sub> O ile tamamlanır (1 litre hacim için miktar).

### 3.2.6.5 Agaroz Jelden DNA Saflaştırılması

UVP jel görüntüleme sisteminde görüntülenen doğru büyüklükteki örnekler UV cihazı üzerine konularak kesildi ve ependorflara alındı. DNA' yı jelden geri kazanmak için kullanılan kit (Thermo Scientific) talimatlarına uyuldu ve DNA elde edildi. Bu DNA' nın bir miktarı tekrar agaroz jele yüklenerek kontrolü yapıldı. Spektrofotometre ile ölçüm yapılarak DNA temizliği kontrol edildi.

### 3.2.6.6 DNA Miktar Tayini

Agaroz jelden geri kazanılarak izole edilen örneklerin saflıkları 260 nm ve 280 nm' de absorpsiyonları alınarak belirlendi. Bunun için kuvartz küvet veya mikrodrop kullanıldı.

$$\text{DNA miktarı} = \text{Sulandırma Katsayısı} \times A_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

### 3.2.6.7 PZR Ürünlerinin T:A Klonlaması

Hem Taq polimeraz hem de One Taq Master Mix kullanılarak yapılan PZR sonucu elde edilen örnekler pGEM-T easy vektörüne (Promega) T:A klonlama yöntemiyle aktarıldı. Bunun için ANZA T4 DNA Ligase Master Mix, 3:1 oranında 20  $\mu\text{L}$  son hacimde kullanılarak 15dk oda ısısında inkübe edildi ve hemen ardından +4 °C de 1 gece bekletildi. Ligasyon ürünleri *E.coli* suşları olan *XL1blue* ve *JM109* kompetanlarına transforme (1-5 $\mu\text{L}$ ) edildi. Süre sonunda alınan örnekler petrilere ekildi ve mavi-beyaz koloni seçimi yapıldı. Bunun için petrilere stok 50 mg/ml den 20  $\mu\text{L}$  ve 100 mM stok IPTG den 100  $\mu\text{L}$  alınarak petrilere yayıldı. 37 °C bir gece inkübatörde petrilere ters çevrilerek bekletildi. Ertesi gün inkübatörden alınan petrilere mavi beyaz koloni seçimi yapıldı. Beyaz olarak seçilen aday rekombinant koloniler dizi analizine gönderilerek kesin olarak belirlendi.

### 3.2.7 Transformasyon

#### 3.2.7.1 Kompetant Hücre Hazırlanması

Kompetant hale getirilen *E.coli* hücreleri LB agar içeren petrilerde tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı ve 37 °C de bir gece inkübe edildi. 10 ml LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapıp (ön kültür), 37 °C de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. Steril erlene 100 ml LB besiyeri konuldu. Bu besiyerine önkültürden 5 ml inoküle edildi. 37 °C de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı ve belirli zaman aralıklarında absorbans alınarak OD600' nin 0,5 ile 0,6 arasında olması beklendi. İstenilen aralığa gelen bakteri süspansiyonu 50 ml' lik steril falkonlara konularak +4 °C' soğutmalı santrifüj cihazında 3000 rpm de 5 dakika boyunca çöktürüldü. Süpernatant kısım alınarak atıldı. 0,1 M CaCl<sub>2</sub> solusyonundan, başlangıç hacminin yarısı kadar eklenerek pipetaj ile pelletler çözüldü. Ardından falkon içerisindeki pelletler buz üzerine konuldu (25 dakika). Süre sonunda falkonlar +4 °C soğutmalı santrifüj cihazında tekrar santrifüj yapıldı (3000 rpm 5 dk). Tekrar çöktürülen örneklerden süpernatant yani sıvı kısımları atılarak başlangıç hacminin 10 da bir kadar 0,1 M CaCl<sub>2</sub> eklendi ve pelletler tekrar çözüldü. Çözülen pelletler 4 saat boyunca buz üzerine bırakıldı. Eşit hacimde % 40 steril gliserol ilave edilerek karıştırıldı ve bu karışımdan 200' er µL ependorflara alikot edilerek -80 °C dondurucuya uzun süre için stoklandı.

**Tablo 3.16:** Kompetan Hücre için Kullanılan Çözeltiler.

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
1 M CaCl <sub>2</sub>	100 mM
% 99 Gliserol	% 40

#### 3.2.7.2 Kompetant Hücrenin Etkinliğinin Hesaplanması

Etkinliği önceden iyi olan 0,1, 10 ve 100 ng miktarında bir plazmit yeni yapılan kompetant hücrelere transformasyonu yapıldı. Ardından transformasyon protokolü uygulandı. Son olarak petrilerdeki koloniler sayılarak aşağıdaki formüle göre etkinlikleri belirlendi.

$$\frac{\text{petrideki koloni sayısı (cfu)}}{\text{petriye ekilen kontrol DNA konsantrasyonu}} \times \frac{1 \times 10^3}{\mu\text{g}}$$

### **3.2.7.3 Vektörün Kompetant Hücreye Transformasyonu**

Kompetant hücreye 5 µL KLK4 promotörü içeren plazmitler ilave edildi ardından ependorflar 40 dakika boyunca buzda bekletildi. 40 dk sonunda hücreler 42 °C' de 2 dk boyunca ısı şoku maruz bırakıldı ve tekrardan buza konularak 2dk da orada bekletildi. Üzerlerine 800 µL LB Broth konuldu ve 1,5 saat 37 °C' de çalkalamaya bırakıldı. Süre sonunda santrifüj ile çöktürme yapıldı ve taze 100 µL besiyeri ile çözülüp, 50 µg ampisilin (pGEMT easy vektör) içeren LB agar besiyerine veya 30 µg kanamisin (pMetLuc reporter vektör) içeren LB agar besiyerine örnekler yayılarak 37 °C' de petriyeler 1 gece boyunca ters şekilde bırakıldı.

### **3.2.8 Plazmit DNA İzolasyonu**

#### **3.2.8.1 Küçük Ölçekte Plazmit DNA (MiniPrep) İzolasyonu**

Küçük ölçekli DNA izolasyonu için Macherey-Nagel Plasmid DNA Purification Kiti kullanıldı. Bir gün önceden transformasyonu yapılmış olan petriden tek bir koloni alınarak sıvı besiyerine ekim yapıldı. 37 °C çalkalamalı etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, kültür kit protokolüne göre santrifüj yapıp çöktürüldü ve kit talimatlarına göre plazmitler elde edildi. Ardından plazmit' in miktarı ve saflığı spektrofotometrede ölçülerek belirlendi.

#### **3.2.8.2 Büyük Ölçekte Plazmit DNA (MidiPrep) İzolasyonu**

Büyük ölçekte plazmit DNA izolasyonu için Endo-free Macherey-Nagel Plasmid DNA Purification Kit kullanıldı. Antibiyotik içeren LB besiyeri tek bir koloni ekilerek 37 °C de çalkalamaya bırakıldı. Başlangıç kültürünü 1/1000 seyrelterek, uygun selektif antibiyotiği de içeren 100 ml LB besiyerine inoküle edildi. Kültür gece boyunca 37 °C de ve yaklaşık 300 rpm' de 12-16 saat boyunca bakterilerin büyümesi için bekletildi. OD600 değeri yaklaşık olarak 4' e geldiğinde yani yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra +4 °C' de 4,500-6,000 x g de 10 dakika santrifüj yapılarak protokolün diğer basamakları uygun şekilde gerçekleştirildi. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta plazmit elde edildi ve miktar tayini yapıldı.

### **3.2.9 DNA'nın Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi**

KLK4 geninin promotörünün klonlanması amacıyla dizayn edilen primerleri önüne XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimlerinin dizileri eklenmişti. Plazmit izolasyonları gerçekleştirilen örnekler, Fast Digest protokolüne uygun olarak son hacimde 20 µl' ye

ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak 37 °C’ de 15 dk kesime bırakıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek UVP altında görüntülendi.

### **3.2.10 Sekanslama**

Promotorlar 80ng/mikrolitre olacak şekilde hazırlandı ve SENTEBİOLAB’ a dizileme için promotorların kendi klonlama aşamasında kullanılan primerleri ile gönderildi ve gelen sekanslama sonuçlarının BioEdit programında analizlerini gerçekleştirerek NCBI BLAST da KLK4 genine bağlanıp bağlanmadığı kontrol edildi.

### **3.2.11 pMet-Luc Reporter (Haberci) Vektörüne Alt Klonlama**

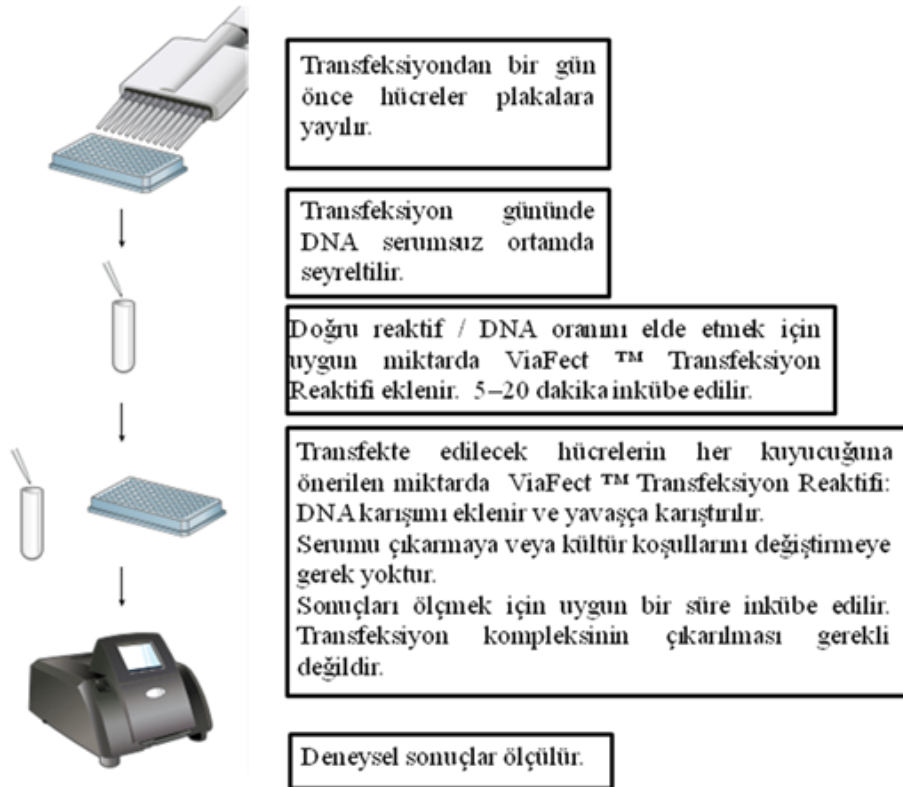
KLK4 promotorlarını alt klonlama yapmak amacıyla pMET-Luc Reporter vektörüne klonlaması gerçekleştirildi. Bu vektörü kullanmadaki amaç vektörün lusiferaz genine sahip olmasından dolayıdır. Bu amaçla, primerler tasarlanırken dizi başlarına eklenen spesifik restriksiyon kesim bölgeleri eklendi ve bu strateji ile XhoI ve HindIII enzimleriyle 20 µL toplam hacimle kesilen pMET-Luc vektörü ile insan KLK4 promotorları 37 °C de 15 dk kesime bırakıldı. Kesim sonucunda kontrol amaçlı DNA agaroz jelde kontrolleri yapıldı. Hem pMET-Luc Reporter haberci vektörü hemde promotorların jelden geri kazanımı gerçekleştirildi. 20 µl’ lik son hacimde 15 dk oda ısısında ardından bir gece +4 °C’ de ligasyon için bırakıldı.

Ertesi gün PZR cihazından alınan ligasyon ürünü *E.coli* suşu olan *XL-1 blue* ve *JM109* hücrelerine transformasyonu yapıldı. Ardından pMET-Luc Reporter vektörü kanamisine dirençli olduğu için kanamisin ile daha önceden dökülmüş agarlı petrilere bakterilerin ekimi yapıldı ve etüve bırakıldı. Bir sonraki gün petrillerdeki kolonilerden seçilenler LB sıvı besiyerine alev yanında ekimi gerçekleştirdi. Bir sonraki gün plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmitleri restriksiyon enzimi (XhoI ve HindIII) ile kesilerek rekombinant koloni kontrolleri gerçekleştirildi. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütülerek rekombinant koloniler belirlendi ve aday rekombinant koloniler SENTEBİOLAB’ a ve BM LAB’ a dizileme için gönderildi. Gelen sekanslama sonuçlarının BioEdit programında analizlerini gerçekleştirerek NCBI BLAST da KLK4 genine bağlanıp bağlanmadığı kesin olarak belirlendi.

### 3.2.12 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi ile İlgili Teknikler

#### 3.2.12.1 Plazmitlerin Geçici Transfeksiyonu

Hücre kültüründe büyütülen hücreler belirli pasaj sayısına geldiklerinde sayılarak 12 kuyulu plakalara yayıldı (250.000 hücre/kuyu). Ertesi gün hücreler antibiyotiksiz medium içerisine alındı. Sitokin uygulaması yapılacak gruplar % 0,1 BSA içeren medium (DMEM F12 Mix veya RPMI) içerisine alındı. Geçici transfeksiyon için Promega Viafect™ Transfection Reagent Kit kullanıldı.



Şekil 3.5: Promega Viafect™ Transfection Reagent Kit kullanımının şematik anlatımı.

Viafect kit datasheet' in, Reagent:DNA oranı olarak önerdiği bazı oranlar bulunmaktadır. Bu oranların optimizasyonu için KKK4' ün en büyük promotörü olan 1104 bç ile 1,5:1, 2:1, 3:1 ve 4:1 oranları kullanılarak optimizasyon için transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu optimizasyon hem PC-3 hem de LNCaP hücreleri için gerçekleştirildi. Sonuç olarak bütün transfeksiyonlarda kitin 3:1 oranının kullanılmasına karar verildi. Ayrıca KKK4 promotorlarının bazal aktiviteleri için de optimizasyon deneyleri gerçekleştirildi. Bunun için PC-3 hücrelerine promotorların transfeksiyonları yapıldı. İlgili kuyulara 150 µM olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> eklenerek hücrelerde hipoksik koşul gerçekleştirildi ve ilgili

kuyucuklara da 500Ü/ml (20ng/ml) TGF-β1 eklendi. 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda plakalardan medyumlar toplandı.

Lusiferaz aktivitesi için ‘Clontech Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System’ kiti (TAKARA) kullanıldı. Lusiferaz ve SEAP ölçümleri için Luminoskan Ascent marka luminometre cihazı kullanıldı. Çıkan değerler excel de analiz edildi. Transfeksiyon etkinliğinin kontrolü ve Lusiferazların kontrolü için pmetluc kontrol vektörü, SEAP vektörü ve herhangi bir promotör parçası içermeyen boş pMetLuc Reporter vektörünün transfeksiyonu ile değerlendirildi.

### 3.2.12.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

**Tablo 3.17:** Lusiferaz aktivitesi için kullanılan çözeltiler.

Solüsyonlar	İçeriği
10 X Substrat Solüsyonu	Liyofilize haldeki substrat talimatlara uygun şekilde çözüldü.
1 X Substrat/Reaksiyon Tamponu	10 X substrat çözeltisi talimatlara uygun şekilde reaksiyon tamponu ile sulandırıldı.

Plakalardan 48 ve 72 saat sonunda toplanan hücre medyumları alınarak ependorflara toplandı. Luminometrede örneklerin okunması için her bir örnek sırayla 384 kuyulu plakalara 9 µL hacimde konuldu. Her bir örnek üzerine 1 X Substrat/Reaksiyon tamponundan (tablo 3.17) 1 µL eklendi ve cihazda ölçümleri alındı.

### 3.2.12.3 SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi

**Tablo 3.18:** Seap aktivite ölçüm çözeltileri.

Solüsyonlar	İçeriği
1 X Dilüsyon Buffer	5 X dilüsyon bufferından istenilen miktarda alınarak 1 X' e distile dH <sub>2</sub> O ile sulandırıldı. Her örnek için 15 µL (384 well plate için) kullanıldı.

Plakalardan 48 ve 72 saat sonunda toplanan hücre medyumları alınarak ependorflara toplandı (SEAP aktivitesinin ölçümü için, lusiferaz örnekleri için toplanan medyumlardan

ölçümler gerçekleştirildi). Luminometrede örneklerin okunması için her bir örnek sırayla 384 kuyulu plakalara 5 µL olacak şekilde konuldu ve üzerine 1 X dilüsyon bufferdan 15 µL eklenerek, plaka önce streç film ardında alimünyum folyo içerisine konularak 30 dakika boyunca 65 °C’de su banyosunda bekletildi. Ardından plaka 3 dk buza alındı ve oda sıcaklığına gelmesi için bekletildi. Üzerlerine SEAP substrat çözeltisinden 20 µL eklenerek, 30 dakika beklendi ve tüm örnekler aynı anda luminometrede ölçüldü.

### **3.2.13 İnhibisyon Çalışmaları**

#### **3.2.13.1 Protein ve RNA eldesi**

##### **3.2.13.1.1.1 Deney Düzeninin Kurulması**

Hücreler rutin pasajlama ile uygun sayıya ulaştıklarında tripan mavisi ile sayımı yapıldıktan sonra 2 ml besiyeri (%10 FCS + DMEMF12 Mix/RPMI) içeren 6 well plakalara 500.000 hücre olarak yayıldı. PC-3 ve LNCaP hücre hatlarından ayrı ayrı hem normal oksijen koşullarında hem de hipoksik (CoCl<sub>2</sub>) koşullarda deney grupları oluşturuldu. Hücreler 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün medyum atılarak plakalara % 0,1 BSA + DMEMF12 Mix/RPMI içeren medyum eklendi. Hücreler 1 saat inkübe edildi. Ardından ilgili kuyulara inhibitör uygulamaları gerçekleştirildi (Tablo 3.19). 1 saat sonunda ise ilgili gruplara 500 Ü/ml (20ng/ml) TGF-β sitokini ve 150 µM CoCl<sub>2</sub> hem ayrı ayrı hemde birlikte uygulanan gruplar oluşturularak uygulama yapıldı. 6 saat sonunda kontrol ve deney gruplarından besi yerleri uzaklaştırıldı. Tüm deney gruplarındaki her bir kuyu PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra, RNA eldesi için tripsin edta ile hücreler kazınarak alındı. Protein grupları için, ise bölüm 3.2.4.2 de anlatıldığı gibi izolasyon yapıldı ve bölüm 3.2.4.3 de anlatıldığı şekilde protein miktar tayini gerçekleştirildi. Western Blot için, PC-3 normoksi grubu 35 µg, hipoksi grubu ise 30 µg, LNCaP normoksi grubu 45µg, hipoksi grubu ise 35µg olacak şekilde SDS jelle yüklendi. Bölüm 3.2.4.5 de anlatıldığı gibi SDS Jelin Blotlanması gerçekleştirildi. Bölüm 3.2.4.6 de anlatıldığı gibi proteinler belirlendi. RNA pelletleri ise bölüm 3.2.3.3 de anlatıldığı gibi izolasyonları gerçekleştirildi ve cDNA sentezleri yapılarak bölüm 3.2.3.5 de anlatıldığı gibi Gerçek zamanlı PZR yapıldı.



**Tablo 3.19:** Yolak inhibitörleri.

<b>İNHİBİTÖR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
SİS3 (Smad2/3 İnhibitörü)	3µM
SP600125 (JNK inhibitörü)	20µM
PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü)	5µM
PD98059 (MEK-1 inhibitörü)	10µM
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	1µM

### **3.2.13.2 Transkripsiyonel Aktivitenin Belirlenmesi**

#### **3.2.13.2.1.1 KLK4 Promotorları olan P2 ve P3 içeren Plazmitlerin Transfeksiyonu**

PC-3 hücreleri kültür ortamında büyütüldükten sonra uygun sayıya ulaştıklarında tripan mavisini ile sayımı yapıldı ve 2 ml besiyeri (% 10 FCS + DMEMF12 Mix) içeren 6 well plakalara, 500.000 hücre olarak yayıldı. PC-3 hücreleri ile kurulan deney gruplarında ayrı ayrı hem normal oksijen koşullarında hem de hipoksik (CoCl<sub>2</sub>) koşullarda deney grupları oluşturuldu. Hücreler 1 gece bekletildi ve ardından plakalara % 0,1 BSA + DMEMF12 Mix içeren medyum eklendi. Hücreler 1 saat inkübe edildi. Ardından promotorların transfeksiyonu için Promega Viafect kit kullanılarak ilgili kuyulara KLK4 promotorları olan P2 (760 bç) (1 µg) ile birlikte SEAP (0,5 µg) ve P3 (1 µg) ile birlikte SEAP (0,5 µg) içeren plazmitler transfekte edildi. Ayrıca transfeksiyon etkinliğinin ve Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü için pMetLuc Kontrol vektörü (0,5 µg) ve herhangi bir promotor parçası içermeyen boş pMetLuc Reporter vektörünü içeren plazmit (0,5 µg) + (0,5 µg) Seap2 kontrol plazmiti de farklı bir grup hücreye uygulandı. Transfeksiyondan 2 saat sonra hipoksik plakalarına 150 µM olacak şekilde kimyasal hipoksi oluşturan CoCl<sub>2</sub> uygulandı, ardından CoCl<sub>2</sub> işlemi üzerinden 1 saat geçtikten sonra ilgili kuyulara 500 Ü/ml (20ng/ml) TGF-β sitokini uygulanarak plakalar inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün 6 well plakalardaki her bir deney grubundaki hücreler kaldırılıp tripan mavisini ile sayılarak 96 well plakalara her bir kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde 8 tekrarlı olarak yayıldı. 48 ve 72 saat sonunda medyumlar toplanarak ölçüm alındı. İlgili kuyulara 48 ve 72 saat dolmasına 6 saat kala inhibitörler uygulanarak 48 ve 72 saat sonunda medyumlar toplandı. Örnekler luminometrede ölçüldü. Alınan sonuçlar excel de değerlendirildi.

### 3.2.14 DNA- Protein Etkileşimi ile ilgili Teknikler

#### 3.2.14.1 Deney Düzeninin Kurulması, PC-3 ve LNCaP hücrelerinden Nükleer

##### Ekstraktların Hazırlanması.

PC-3 ve LNCaP hücreleri 75cm<sup>2</sup>' lik flasklara yayıldı. Flaskların bir sonraki gün medyumları atılarak % 0,1 BSA + DMEMF12 Mix/RPMI içeren yeni besi yeri konuldu ve bir saat beklendi. Sürenin sonunda ilgili gruplara 500 Ü/ml (20ng/ml) TGF- $\beta$  sitokini ve 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> hem ayrı ayrı hemde birlikte uygulanan gruplar oluşturularak uygulama yapıldı. Diğer gün hücre flaskları inkübatörden alınarak buz üzerine konuldu. Medyumunu atılan flasklar soğuk PBS ile iki kez yıkanarak üstlerine 3' er ml TEN buffer eklendi ve 5dk TEN buffer içerisinde bekletildi. Daha sonra bir spatula ile hücreler flask yüzeylerinden kazınarak kaldırıldı ve ependorlara toplandı. Her bir grubun ayrı ependorfa konulduğu örnekler +4 °C' de, en yüksek devir olan 13.000 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan pelletler üzerine 50  $\mu$ L A tamponu eklenerek çözüldü ve bu çözelti buzda 15 dk tutuldu. Ardından daha iyi liziz olmaları için insülin iğnesi kullanarak pipetaj yapıldı. Pipetaj sonrası yine soğutmalı santrifüjde aynı devirde 20 sn santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra ependorflara C tamponundan 60' ar  $\mu$ L eklenerek yeniden pipetaj yapıldı. Bu işlemler sonunda buz üzerinde 30 dk bekletilen örnekler tekrardan 5 dk santrifüj yapıldı ve protein miktarları bölüm 3.2.4.3' de belirtildiği şekilde belirlendi. Örnekler -80 °C ye kaldırıldı.

**Tablo 3.20:** Nükleer ekstrak solüsyonları.

Solüsyon	İçeriği
TEN Buffer	40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH: 7,5,
Buffer A	10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 10 mM KCl, 1 $\mu$ g/ml tripsin inhibitörü, pH: 7,9
Buffer C	20 mM HEPES 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA, %25 gliserol, 0,5 mM PMSF 1 $\mu$ g/ml pepstatin A, 0,5 mM DTT, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 10 $\mu$ g/ml tripsin inhibitörü, pH: 7,9,

#### 3.2.14.2 Oligoların Etiketlenmesi

Primerlerin biyotinlenmesi için Pierce Biotin 3' End DNA Labeling Kit sistemi kullanıldı. Üretici firmadan temin edilen TdT enzimi, 1 X TdT Reaksiyon solüsyonu ile 2 Ü/ $\mu$ g hale

gelecek şekilde seyreltildi. Son hacim olarak 50 µL olarak hesaplanan biotinleme işleminde; 5 X TdT Reaksiyon solüsyonundan 10 µL, Diluted TdT (2 Ü/µL) enziminden 5 µL, enjeksiyonluk saf sudan 25 µL, Biotin-11-UTP' den 5 µL ve Unlabeled Control Oligodan 5 µL kullanılarak 37 °C' de yarım saat PZR cihazına bırakıldı. Cihazdan alınan örneklere 2,5 µL 0,2 M EDTA (pH=8) eklenerek reaksiyonu işlemi durduruldu ve 50 µL kloroform:izoamil alkol (24:1) eklendi. Vorteks yapılarak santrifüjde 2 dk santrifüjlendi. Cihazdan alınan ependorflarda iki faz oluştu ve üstteki fazlar temiz ependorflara alındı. Bu çalışmada kullanılan KLK4 genine göre dizayn edilmiş EMSA primerlerinin hem forward (ileri) hemde reverse (geri) primerlerinin ikisinde etiketlendi (Tablo 3.21).

**Tablo 3.21:** EMSA deneyinde kullanılan ve etiketlenen primerler.

Primer Adı	Dizisi
KLK4 SMAD (+163/+194) F	5'-CATCTCTCTAGACAGATCTCTCACTGTCTCT-3'
KLK4 SMAD (+163/+194) R	5'-AGAGACAGTGAGAGATCTGTCTAGAGAGAT-3'
KLK4 SMAD DEL (+163/+194) F	5'-CATCTCTCTAGACTTTTTTCTCACTGTCTCT-3'
KLK4 SMAD DEL (+163/+194) R	5'-AGAGACAGTGAGAAAAAGTCTAGAGAGAT-3'
KLK4 HİF-1α (-80/-52) F	5'-CCTGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGGC-3'
KLK4 HİF-1α (-80/-52) R	5'-GCCCCCAGGGGATGTGTTCAGGGGTCAGG-3'
KLK4 HİF-1α DEL (-80/-52) F	5'-CCTGACCCCTGGATTTTTCCCCTGGGGGC-3'
KLK4 HİF-1α DEL (-80/-52) R	5'-GCCCCCAGGGGAAAAATCCAGGGGTCAGG-3'

### 3.2.14.3 Oligonükleotidlerin Bağlanması

Primerlerin birbirlerine bağlanıp çift zincirli bir yapı almaları için biyotinli primerlerden 80 fmol/µL kullanılarak 50 µL' lik son hacime getirmek için sulandırıldı. Daha sonra 95 °C' de 5 dk PZR cihazına konuldu. Cihazdan alınan oligolar oda ısısında 2 saat soğumaları için beklendi. Biyotinli problemlerin 1000 kat fazlası (80.000 fmol/µL) olarak biyotinsiz primerlerde hazırlandı.

### 3.2.14.4 Bağlanma Reaksiyonu

Bağlanma reaksiyonu için, 4 µg nükleer ekstrakt, 1 X bağlanma tamponu, 50 ng/µL son konsantrasyonda poly dI.dC, 5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 fmol biotin etiketli primerler konularak 20 µL' lik son hacime tamamlandı. Daha sonra 10 dk buz üzerinde ardından 40 dk oda sıcaklığında bağlanmanın olması için beklendi.

### **3.2.14.5Jelin Yürütülmesi ve Proteinlerin Membrana Transferi**

Deneyde kullanılacak olan jeller bir gün öncesi hazır hale getirilerek +4 °C de saklandı. Deneye başlamadan önce jeller 0,5 X TBE içeren tampon içersine yerleştirilerek 1 saat boyunca 90 V akımda yürütüldü. Transfer işlemi sistemi bölüm 3.2.4.5' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve burada membran olarak naylon membranlar kullanıldı. Transfer buffer olarak ise 0,5X TBE kullanıldı. Hazırlanan kasetler transfer buffer içerisine yerleştirilerek 90 voltta 2 saat transfer işlemine bırakıldı. Transferden alınan membranlar içerisine az tampon konularak streç filme sarıldı ve UV altında 15 dk boyunca sabitleme yani kross-link işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra membranlara bloklama tamponu konularak 15 dk çalkalama yapıldı. Ardından tampon içerisine Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate eklenerek 15 dk daha çalkalamada bırakıldı. 1 X yıkama tamponu ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra substrat dengeleme tamponundan 15 ml eklendi ve 5 dk bu solüsyonla çalkalamaya bırakıldı. ECL kiti kullanılarak görüntüleme yapıldı.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1 Kimyasal Hipoksi Modelinin Oluşturulması ve Doğrulanması

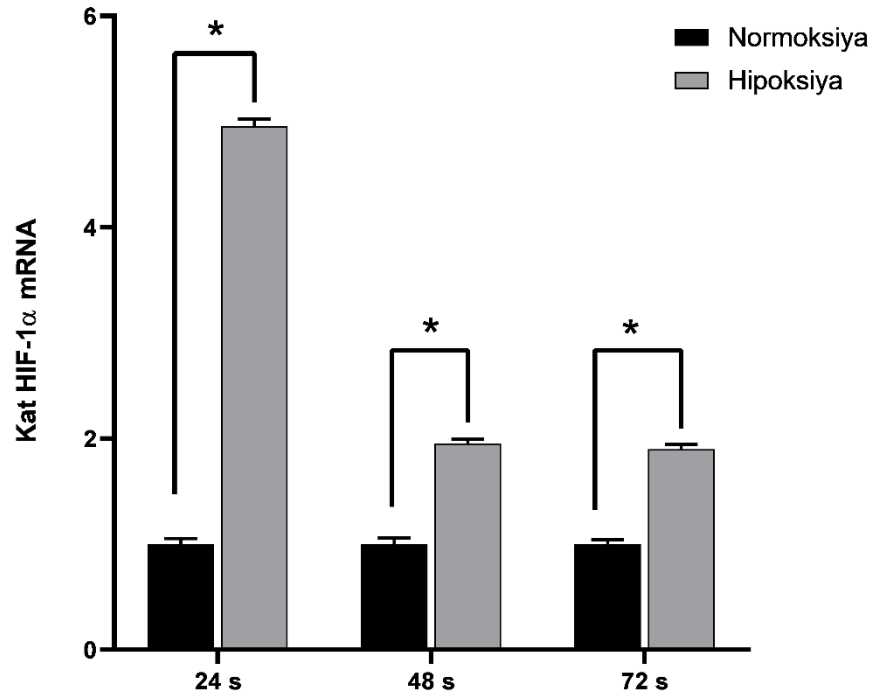
Çalışmamızda PC-3 ve LNCaP hücrelerinde kimyasal bir ajan olan  $\text{CoCl}_2$  ile hipoksik model oluşturuldu. Kimyasal hipoksinin çalışma mekanizması şekil 1.9 da anlatılmıştır. Çalışmamızda seçtiğimiz iki hücre hattında öncelikli olarak kimyasal hipoksi modeli oluşturulmuştur. İlk basamakta bu modelin doğrulanması ve sonrasında TGF- $\beta$  sitokininin ve hipoksik koşulların hücre proliferasyonuna etkisi MTT testi ile araştırıldı.

PC-3 ve LNCaP hücreleri büyütülerek  $25\text{cm}^2$  'lik flasklar içerisine alındı. Flasklar içerisinde  $150\ \mu\text{M}$  olacak şekilde  $\text{CoCl}_2$  eklenerek kimyasal şartlarda hipoksik koşul oluşturuldu (Turkoglu ve Koçkar, 2016). Kimyasal hipoksi modelinde kullandığımız  $\text{CoCl}_2$ ' nin çalışma prensibi için Şekil 1.9 da incelenebilir. Çalışmamızda ayrıca TGF- $\beta$  sitokini de çalışılacağından elimizdeki sitokin hipoksik modelde hücre proliferasyonuna olan etkisi de çalışıldı. Normal şartlar ile kıyaslamak için ayrılan hücrelere herhangi bir kimyasal uygulanmadı. Bu şekilde normoksik ve hipoksik koşullar oluşturulan hücrelerden 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücre pelletleri bölüm 3.2.3.3' de anlatıldığı şekilde izolasyonları yapıldı. Bölüm 3.2.3.4' de anlatıldığı şekilde RNA miktarları belirlendi. Bölüm 3.2.3.5' de anlatıldığı gibi RNA elektroforezi ile RNA' lar görüntülendi. Bölüm 3.2.3.6' da anlatıldığı gibi bu RNA' lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu DNA' lar ile bölüm 3.2.3.8 de belirtildiği koşullarda tablo 4.1' deki primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı.

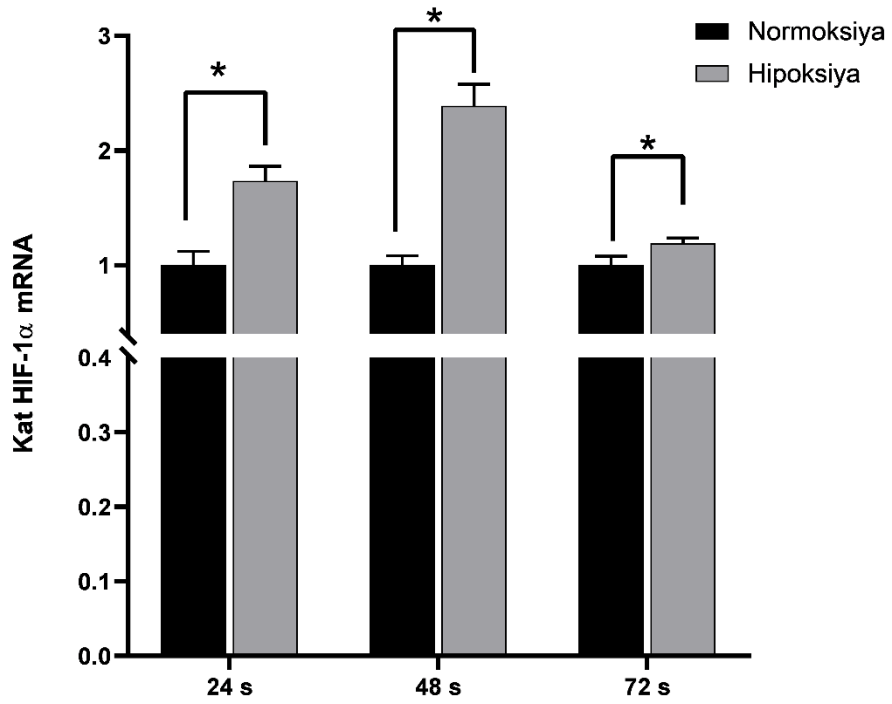
Gerçek zamanlı PZR sonucu çıkan Ct değerleri Livak metoduna göre değerlendirildi. Bu şekilde PC-3 (Şekil 4.1) ve LNCaP (Şekil 4.2) hücreleri için hipoksik koşulun oluşumu HIF-1 $\alpha$ ' nın ekspresyon seviyesine bakılarak doğrulandı.

**Tablo 4.1:** HIF-1 $\alpha$  ve H $\beta$ 2 forward ve reverse primer bilgileri.

H $\beta$ 2M Primerleri	Primer Dizileri
H $\beta$ 2 Forward	5'TTTCTGGCCTGGAGGCTATC'3
H $\beta$ 2 Reverse	5'CATGTCTCCATCCCCTTAACT'3
HIF-1 $\alpha$ Primerleri	Primer Dizileri
HIF-1 $\alpha$ Forward	5'CCACCTATGACCTGCTTGGT'3
HIF-1 $\alpha$ Reverse	5'TGTCCTGTGGTGACTTGTCC'3



Şekil 4.1: Kimyasal hipoksi modelinde PC-3 hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyesi (Gerçek Zamanlı PZR).



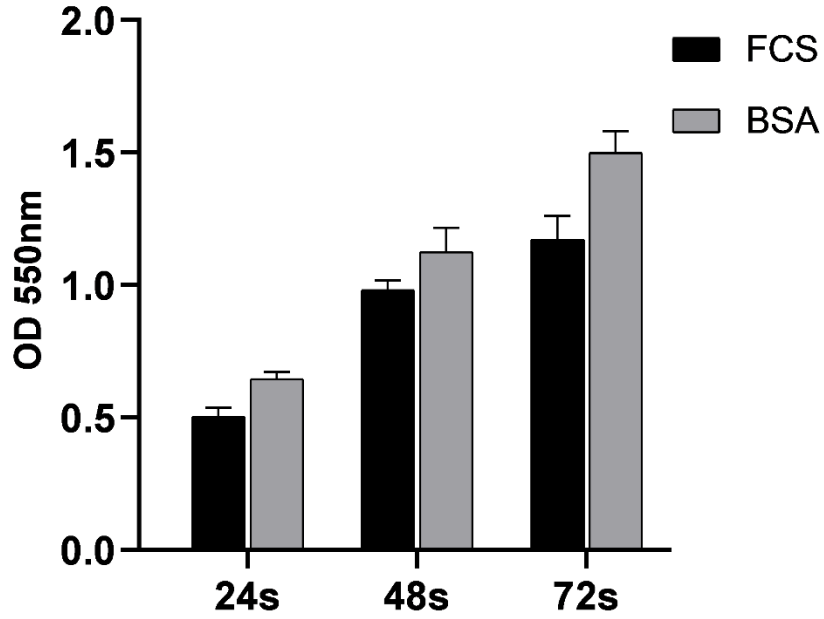
Şekil 4.2: Kimyasal hipoksi modelinde LNCaP hücrelerinde HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyesi (Gerçek Zamanlı PZR).

#### **4.2 TGF- $\beta$ Sitokininin ve Kimyasal Hipoksi Ajanı Olan CoCl<sub>2</sub>' nin PC-3 ve LNCaP Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi (MTT Testi)**

Çalışmamızda hipoksik model oluşturmak için kullanılan CoCl<sub>2</sub> ve TGF- $\beta$  sitokinin PC-3 ve LNCaP hücreleri üzerindeki öldürücü etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla sitotoksikite testi yapıldı. Bu çalışmada 96 kuyulu plakalar kullanıldı. Bunun sebebi deneyi çok tekrarlı olarak yapabilmektir. Hücre kültüründe günler öncesinden büyütülen PC-3 ve LNCaP hücreleri 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 10.000 hücre olacak şekilde yayıldı. Bir gün sonra, sitokin uygulanacak gruplar BSA' lı medyuma alındı. Ardından 150 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> ve 500Ü/ml (20ng/ml) TGF- $\beta$  uygulaması yapıldı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon periyotları sonunda 20  $\mu$ L MTT solusyonu üzerilerine uygulandı ve MTT metabolizasyonu için 4 saat 37 °C'de bekletildi. Ardından medyumlar uzaklaştırılarak 0,004M HCl içeren izopropanol uygulaması ile hücreler çözüldü. Daha sonra 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri alındı. Yapılan bu deneyin her bir grubu 8 tekrarlı olarak kuruldu ve birbirinden bağımsız en az iki kez çalışıldı.

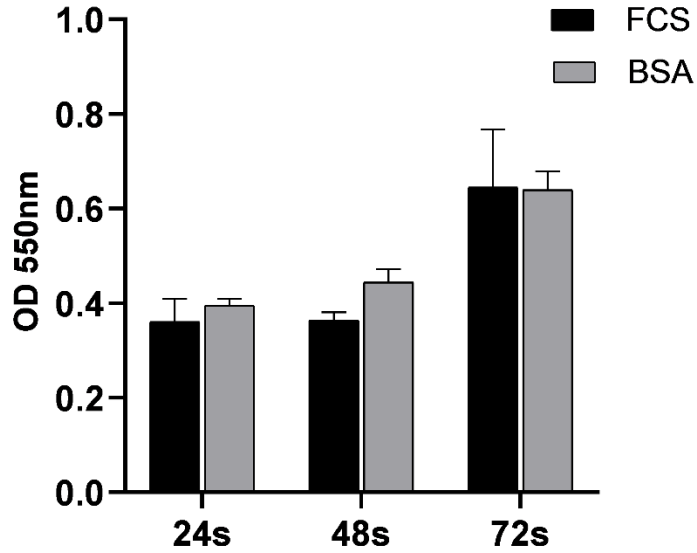
TGF- $\beta$  sitokinin etkisini gözlemleyebilmek için hücreler serum-free medyumunda % 0,1 BSA içeren ortamda büyütüldüler. Serum tanımlanmamış bir ortam olduğundan ve içeriğinde sitokinleri bulundurduğundan dolayı uygulayacağımız TGF- $\beta$  sitokininin net etkisini gözlemek için BSA' nın hücre proliferasyonuna etkisi öncelikle incelendi. Hücreler hem FCS hem de BSA içeren ortamlarda büyütüldü ve hücre proliferasyonları karşılaştırıldı. Yapılan analizler sonucunda BSA' nın hem PC-3 hem de LNCaP hücrelerinde herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilmedi.

### PC-3 Hücrelerinde FCS ve BSA' nın Hücre Çoğalmasına Etkisi



Şekil 4.3: FCS ve BSA' nın PC-3 hücre proliferasyonuna etkisi.

### LNCaP Hücrelerinde FCS ve BSA' nın Hücre Çoğalmasına Etkisi

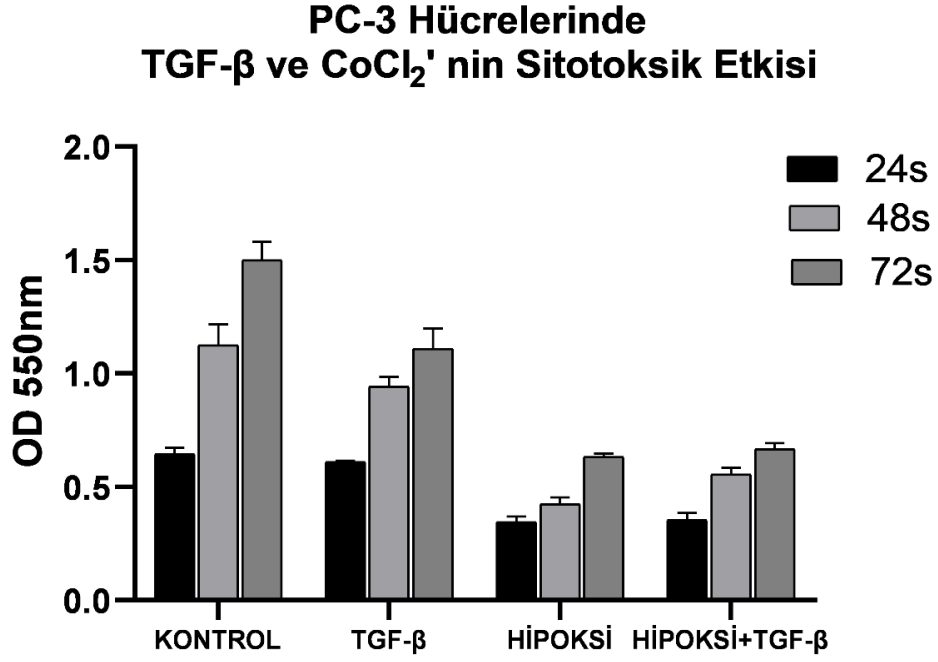


Şekil 4.4: FCS ve BSA' nın LNCaP hücre proliferasyonuna etkisi.

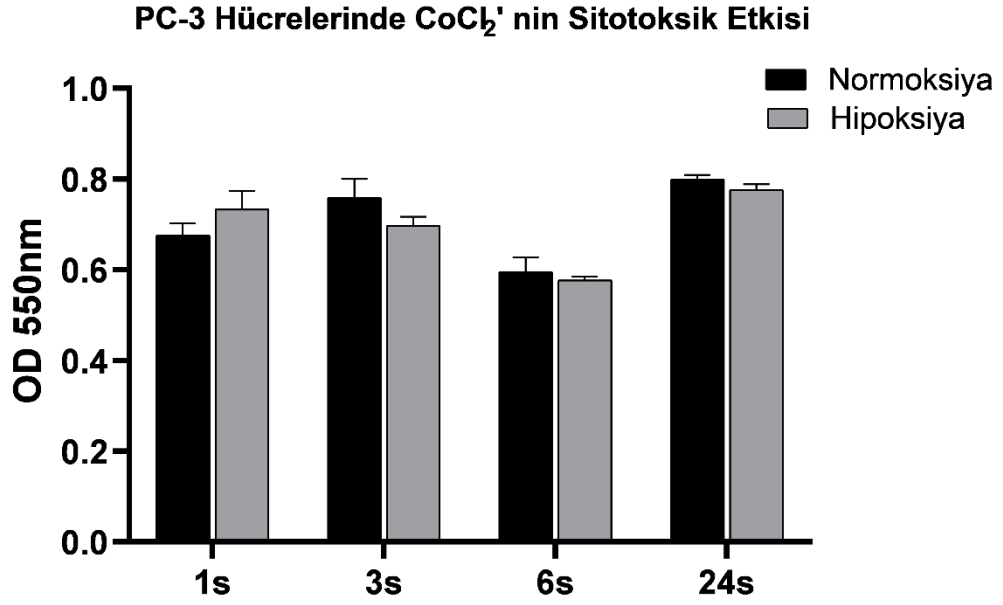
Yapılan analizler sonucunda Şekil 4.5 incelendiğinde, PC-3 hücrelerine en yüksek dozda uygulanan 500Ü/ml (20ng/ml) TGF- $\beta$  sitokininin hücrelerde önemli ölçüde sitotoksik etki



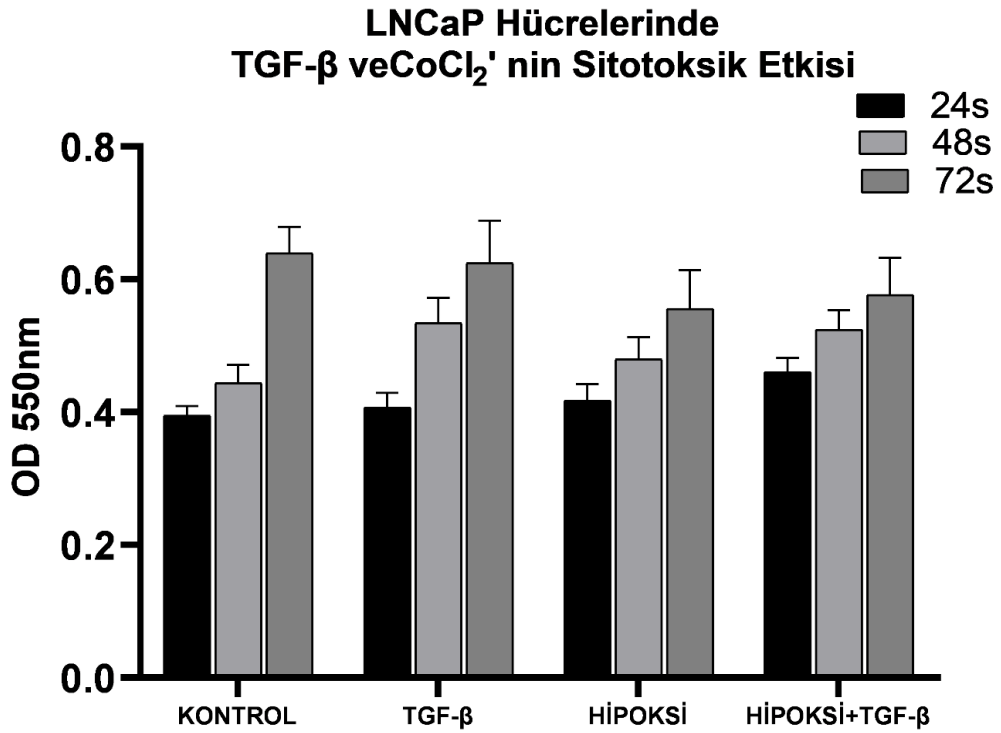
gözlemlenmedi. Fakat uygulanan  $150\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , 48 ve 72 saat dilimlerinde hücre proliferasyonuna olumsuz yönde etki yaptığı görüldü. Dolayısıyla PC-3 hücrelerinde daha kısa zaman dilimlerinde MTT deneyi tekrarlandı (Şekil 4.6).  $\text{CoCl}_2$  ve  $\text{TGF-}\beta$ ' nin LNCaP hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki gözlemlenmedi (Şekil 4.7).



Şekil 4.5:  $\text{TGF-}\beta$  ve kimyasal hipoksi ajanı olan  $\text{CoCl}_2$ ' nin PC-3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.



Şekil 4.6: Kimyasal hipoksi ajanı olan CoCl<sub>2</sub>' nin erken zaman dilimlerinde PC-3 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.



Şekil 4.7: TGF- $\beta$  ve kimyasal hipoksi ajanı olan CoCl<sub>2</sub>' nin LNCaP hücrelerinin proliferasyonuna etkisi.

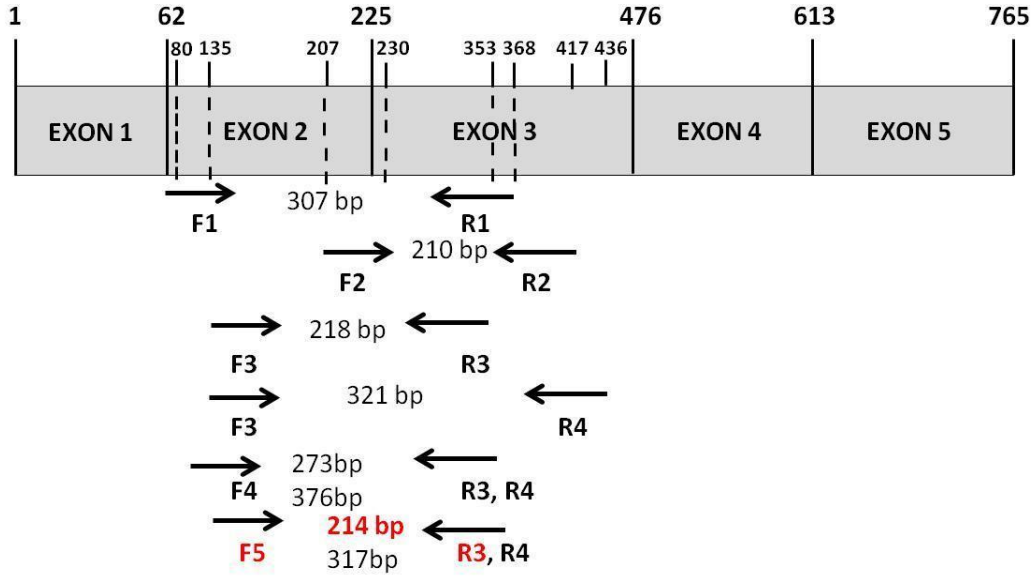
### **4.3 mRNA ile İlgili Deneyler**

#### **4.3.1 KLK4 Ekspresyon Primer Dizaynı ve Optimizasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan ekspresyon primer dizaynı için, KLK4 genine ait mRNA dizisi NCBI' dan bulundu ve Gene ID: 9622 kayıtlı dizi ile çalışıldı. Bulunan mRNA transkriptine ait dizi üzerinde ekzon ve intron bölgeleri işaretlendi. Dizayn edilen tüm primerler farklı ekzonlardan tercih edildi. Farklı zaman dilimlerinde dizi üzerinden farklı primerler tasarlandı. Bunun sebebi etkin bir çoğalmanın tespit edilememiş olmasıdır. Dizayn edilen tüm primerlere ait primer dizileri ekzonlar üzerinde işaretlendi (Şekil. 4.8) ve şematize edilerek çizildi (Şekil 4.9). Bu primerlere ait diziler, çoğaltılan bölgelerin büyüklükleri ve TM değerleri tablo 4.2' de gösterildi. Çalışan primerler kırmızı renk ile yazılmıştır.

AGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCAGCAGTGAATCCAGGAGCCAGAGGTGGCCGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAA  
 AAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCCCTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTCTGTCTCCACATCT  
 CTCTAGACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGTCTCTCTGTCTCTCTGAATCTATATCTCC  
 ATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCACTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTCCCTCCA  
 TGCCTGTGTTGGTGGGTGGCTAGACACCACTCTCTCCCAATTCACAGATGGCTAGATGCTTCTCTAAACTGTTCCCTTTCTACCTAGT  
 TCTCTCTCTCTCTCTTTTCCATCTCTCTCTCTTTTCTCTCTCAGTCTCTAAATCTGTCTCTCTAGTTCCTGGTCCAT  
 GGATGGGAGAGGGGTAGATGGTCTAGGCTCTGCCTACCTAAATAACCTCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGA  
 TGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCCTCATCCCCAGGTGCTGACGTGATGGCCACAGCAGGA  
 AATCCCTGGGGCTGGTTCCTGGGTACCTCATCTTGGTGTCCGAGGTACTGAGTATGCGTGTGTGTCTGTCCGTCTGG  
 GGGCACAGTGTGTTGTAATGTTCAAGTGTGACTCAGTGTCTCTGTCTGTGACTGCAAAGCTGCCTGTGAGACGGTACCCGTGT  
 TATCCGTCCCCCATGGCTGTGCCCTGCAACTCCTGTATCGTGGTAAATTTGTGTGTGGCAGTGTGCCTGGGTGTGTGTTGT  
 ACCTGTGAGACTCTGACAGTTGTGCTCTGAATATCTGGTGGAGTGACAACAGTGAATGATGATATGGGACAGGGGAAGCC  
 GAGGGTGCAGGAGATTGTGCTTCCCTGGGGCGTGATCCATTGCTGGGAATCTGTGCCTGCTTCCCTGGGTCTTCACTGCTGAGATC  
 CCCCTCTCCCATCCCAAGGAACCTCACCTCACAGGATAAAAACGGTGTGTTGGTGTGCATGGCTTGTGGCTTGGTGTGAT  
 GTGGCAAGGCTGGGAGAGGATAGGAGTACTCGGCGCAGGACCCTTTTGTGACATCAGTCTGCCGACAGAAGTGACCCGAT  
 CCTTGTCTCCAGCAACAACTCCACCCCTGAGCTTTAATTACCCCGAAGGACCCGATCTACTGCTATGACCTTAGACTCTCT  
 TGTGAAACCCCTCCTGACCGTGGCTTGTGACCCGGATGGCACCAGTCTCACCTCCAGAGCTCACCCAGCCCTGACTCCGCC  
 CCAGAAGCCCTGGTCCACCTTCTGAGACTGCCTTAGCCATAACCCAGCTCTTGAAGCCTTGTGGGCCCCCTGCGCTGTAAAC  
 CCCAACCTTAGGAGCACTGATCCCGCTTCTCAGCCCAACCCCATGCGCTGACTCTCTCCAGGAGCCCTGACTACCCCTGAAT  
 CCTGTGACCAGGCTCTGCACCGTATACCCGCCCTGGGAGCCCTAGGCCATATACTGGACCAGCCCTGAAGCTCCGATCAT  
 GACCCCTGCACCATAAACCCCAACCCAGGAGCCCTGGGTCCGCCCTTGGGCCGCCCCAGCCCTGACTCGGCCCCCAAGAG  
 TCCTGACTGTCTGAAGCCCTGACCAGCCCTGCTCGTAAACCCCTCCCAAGAGCCCTGGGCCGCCCTCTGAGCCCGTT  
 CCCAGCCCTCCTGACCCCGAGGAGCCCTGACTGAACTCTGAACTCTGACCAGCCCTGCTCGGTAAAGCCCAACCCAGGAA  
 CCTTGGGCCGCCCTCTGGTCCGATCCATCCCTGACTCCGCCCTCAGGATCGTCTCTGGTGTAGCTGACGCCAAATCATA  
 AACGGCAGGACTGCAGCCCGCACTCGCAGCCCTGGCAGCGGCACTGGTTCATGGAAACGAAATTGTTCTGTCTCGGGCTCTCTG  
 GTGCATCCGCACTGGGTGCTGTACGCCGCACACTGTTCCAGAA GTGAGTGCAGAGGTAGGGGAGTGGGACAGGGCTGGTCC  
 GGGGGCGGGGCTAATATCAGGCTCATCTTGGGGTGTCTCAGGGGAAACAGCGGTGAAGGCTCTGGGAGGAGGACGGAAATGAGC  
 CTGGATCCGGGAGCCCCAGAGGGAAGGGCTGGGAGGCGGGAATCTTGTCTCGGAAGGACTCAGAGAGTCTGACTTGAATCT  
 CAGCCCACTGCTGAGTCTTAGTGAACAAAGGCAAGTCTTGTCCCTGAAATTTTGTGAATGAGGATTTGAGACCATGTTAAG  
 TAGCTCTTAGGGTGTGTTAGCGAAGAGGGTGGGGTGGGGTTAGGAGATGGGGAATGGGGTGAAGATGAGAATGGAGGT  
 AAGGATGTAGTTGCCAAAACTGACCTGCCCTCCGTGCCACAGCTCCTCAACCATCGGGCTGGGCTGCACAGTCTTGAAG  
 CCGACCAAGAGCCAGGAGCCAGATGTTGGAGGCCAGCCTCTCCGTACGGCACCAGAGTACAACAGACCCTTGTCTCGCTA  
 GCTCTGCTCATCAAGTTGGA CGAATCCGTGTCGAGTCTGACACCATCCGACGCTCAGCATGCTTCCAGTCCCTACCG  
 CCGGGA ACTCTTGGCTCGTTTCTGGCTGGGGTCTGCTGGCGAACGGTGTGAGCTCACGGGTGTGTGTCTGCCCTCTCAAGGAGGT  
 CCTCTGCCAGTCCGGGGGGTGCACAGAGCTCTGCTCCAGGCAGAATGCCTACCGTGTGAGTGCCTGAAACGTGTCCGT  
 GGTCTCTGAGGAGTCTGCAGTAAGCTCTATGACCCCTGTACCACCCAGCATGTTCTGCCGGGCGGAGGGCAAGACACGAA  
 GGACTCCTGCAACTGTGAGAGAGGGGAAGGGGAGGGCAGGCGACTCAGGGAAGGTTGGAGAAGGGGGAGACAGACACACAGG  
 GCCGATGGCGAGATGCAGAGATGGAGAGACACACAGGGAGACAGTGAACACTAGAGAGAGAACTGAGAGAAACAGAGAAATA  
 AACACAGGAATAAAGAGAAGCAAAAGAGAGAAACAGAAACAGACATGGGGAGCCAGAAACACACACATAGAATGCAAT  
 TGACCTTCCAAACAGCATGGGGCTGAGGGCGGTGACCTCCACCCCAACAGAAAATCCTCTTATAACTTTTGTACTCCCCAAAACC  
 TGACTAGAAATAGCTACTGTTGACGGGGAGCCTTACCAATAACATAAATAGTCGATTTATGCATACGTTTATGCATTCATGA  
 TATACTTTGTGGAATTTTGTGATATTTCTAAGCTACACAGTTCGTCTGTGAAATTTTTTAAATGTTGCAACTCTCTCAAAA  
 TTTTCTAATGTGTTTATGAAAAAATCCAAGTATAAGTGGACTTGTGCAGTTCAAAACAGGGTGTTCAGGGTCAACTGTGT  
 ACCCAGAGGGAACAGTGCACAGATTCATAGAGGTGAAACACGAAGAGAAACAGGAAAAATCAAGACTCTACAAAGAGGCTGG  
 GCAGGTGGCTCATGCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCGAGGACAGGAGATCACTTGGGTAAAGGATTCAGAGCCCTACCG  
 GGCCAAAATGGTGAATCCTGTCTGTAATAAAAATACAAAAGTTAGCTGGATATGGTGGCAGGCGCCTGTAATCCAGCTACTT  
 GGGAGGCTGAGGCAGAAGAAATGCTTGAATATGGGAGGCGAGGTTGAAGTGAAGTGTGAGATCACACCACTATACTCCAGCTGGG  
 GCAACAGAGTAAGACTCTGTCTCAAAAAAAGAAAAAAGAAAGAACTTTACAAAGAGATGCAGAGACACTGAGACAGATAAACA  
 AGCCACAAGGAGACAAAGGAGAGACAGACAAACAGAAACAGACAGACCACAAGCCCAAGAGAAGCAGCCAGCATTCAGGACAT  
 AGGACATCGGGAAGCAGGATTAGATGAAGTCAAGGATCTGGAATGGGACTTCCAACAGATATGTTGCTGGGCTATGTTGTTATT  
 GATGATGGTCTGTCTTGTCTCAGTCTCATTTAGTTCCTTTCTGAGCCACATCCATTTCCACCTCTGTGTTTTGAATT  
 CTGACTCTCCCTCTCTTCAACAACAGGGTGTACTTGGGGGGCCCTGATCTGCAACGGGTACTTGCAGGGCTTGTGTCTTTCCG  
 AAAAGCCCCGTGTGGCAAGTTGGCGTGCAGGTGTCTACACCAACTCTGCAAAATCACTGAGTGGATAGAGAAAACCGTCCA  
 GGCCAGTTAACTCTGGGACTTGGAAACCCATGAAATTTGACCCCAAAATACATCTTGGGAAGGAAATTCAGGAATATCTGTTC  
 AGCCCTCTCCCTCAGGCCAGGAGTCCAGGCCCCAGCCCTCTCCCTCAAACCAAGGTACAGATCCCCAGCCCTCTCTC  
 CCTCAGACCCAGGAGTCCAGACCCCCAGCCCTCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGCCCTCTCCCTCAGACCCAGGAGTCC  
 CAGACCCCCAGCCCTCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGCCCTCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGACCCCCAGCCCTCT  
 CCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGGCCCCAAACCCCTCTCCCTCAGACTCAGAGGTCCAGGCCCCAAACCCCTCTTCCCAG  
 ACCCAGAGGTCCAGGTCCAGCCCTCTCCCTCAGACCCAGCGTCCAATGCCACCTAGACTCTCCCTGTACACAGTGCCTCC  
 TTGTGGCACGTTGACCAACCTTACCAGTTGGTTTTTCATTTTTGTCCCTTCCCTTAGATCCAGAAATAAGTCTAAGAGAA  
 CCGCA

Şekil 4.8: KLK4 mRNA dizisi üzerinde sentezlenen primer dizileri.



Şekil 4.9: KLK4 ekzonları üzerinden dizayn edilen primerlerin şematize şekli.

Tablo 4.2: KLK4 ekspresyon primer dizileri.

Primer Adı	Tm	Baz içeriği	Ürün büyüklüğü	BÇ
KLK4 exp. İleri (F1)	66.6	5'-GATCGCTCGTCTCTGGTAGCTGCAGCCA-3'	307	28
KLK4 exp. İleri (R1)	60.1	5'-TCCAACCTTGATGAGCATGAGGTCGT-3' ACGA'	307	25
KLK4 exp. İleri (F2)	57	5'-GCACACTGTTTCCAGAACTCCTA-3'	210	23
KLK4 exp. İleri (R2)	57	5'-CGAAGCAATGCTGATGCTCC-3'	210	20
KLK4 exp. İleri (F3)	61.4	5'-GCGGCACTGGTCATGGAAAACG-3'	218	22
KLK4 exp. Geri (R3)	57.1	5'-ATGAGGTCGTTAGCGAGCAAG-3' CTTGC'	218	21
KLK4 exp. Geri (R4)	57.8	5'-GCCAGAAACGAGGCAAGAGT-3'	321	20
KLK4 exp. İleri (F4)	53	5'-CTGCAGCCAAATCATAAAC-3'	R3 ile 273 R4 ile 376	19
KLK4 exp. İleri (F5)	58.4	5'-CACTGGTCATGGAAAACGAATT-3'	R3 ile 214 R4 ile 317	22

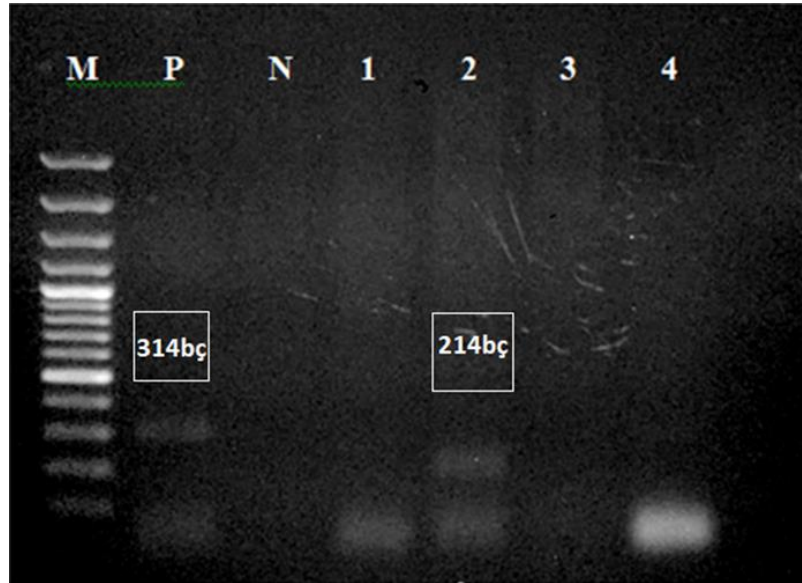
KLK4 geni için dizayn edilen F1,R1, F2,R2, F3,R3 ekspresyon primerleri ile farklı bağlanma sıcaklıklarında, farklı DNA kalıplarıyla yapılan PZR denemeleri sonucunda istenilen spesifik bantlar elde edilemedi ve yeni primerler olan F4,F5 ve R4 primerleri tasarlandı. F4 ve F5 primerleri R3 ve R4 primerleri ile denendi. F5 ve R3 primerleri ile yapılan PZR sonucunda hem PC-3 hemde LNCaP hücre hattında aynı bağlanma koşullarında doğru büyüklükte (214 bç) bant elde edildi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

**Tablo 4.3:** KLK4 (F4-R3, F5-R3, F4-R4, F5-R4) ve H $\beta$ 2 primerleri ile PC-3 sitokin (TGF- $\beta$ ) uygulanmış cDNA kalıp ile yapılan PZR içeriği (Tüm hacimler \* $\mu$ L'dir).

	P	N	1	2	3	4
	H $\beta$ 2 P.K	H $\beta$ 2 N.K				
cDNA	1	-	1	1	1	1
Taq Polimeraz	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Taq Buffer	5	5	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	2	2	2	2	2	2
İleri Primer	1	1	1(F4)	1(F5)	1(F4)	1(F5)
Geri Primer	1	1	1(R3)	1(R3)	1(R4)	1(R4)
dNTP	1	1	1	1	1	1
ddH <sub>2</sub> O	38.5	39.5	38.5	38.5	38,5	38,5
Toplam	50	50	50	50	50	50

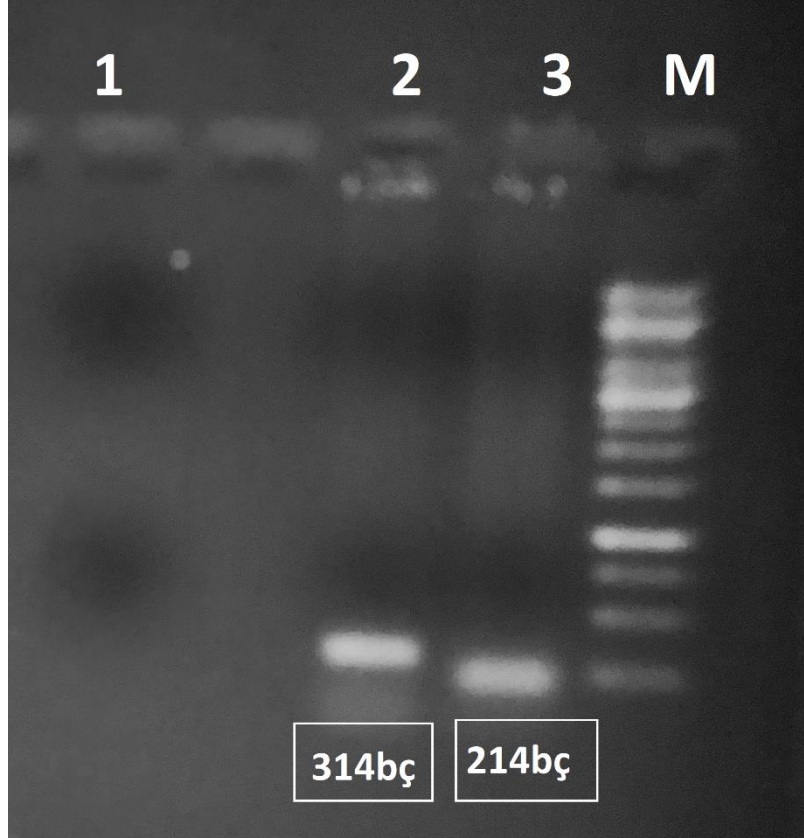
**Tablo 4.4:** KLK4 (F4-R3, F5-R3, F4-R4, F5-R4) ve H $\beta$ 2 primerleri PC-3 cDNAsı ile yapılan PZR koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95°C	5dk	1
Denatürasyon	95°C	45sn	35
Bağlanma	55°C	45sn	35
Uzama	72°C	45sn	35
Final Uzama	72°C	5dk	1



**Şekil 4.10:** KLK4 ekspresyon primerleri (F4-R3, F5-R3, F4-R4, F5-R4) ve H $\beta$ 2 primerleri ile PC-3 cDNA kalıp ile yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroferez görüntüsü. (M:

100 bp marker, P: H $\beta$ 2 primerleri ile pozitif kontrol, N: H $\beta$ 2 primerleri ile negatif kontrol, 1: KLK4 ekspresyon primerleri F4-R3 ile PC-3 hücre hattında PZR görüntüsü, 2: KLK4 ekspresyon primerleri F5-R3 ile PC-3 hücre hattında PZR görüntüsü, 3: KLK4 ekspresyon primerleri F4-R4 ile PC-3 hücre hattında PZR görüntüsü, 4: KLK4 ekspresyon primerleri F5-R4 ile PC-3 hücre hattında PZR görüntüsü).



**Şekil 4.11:** KLK4 ekspresyon primerleri ( F5-R3) ve H $\beta$ 2 primerleri ile LNCaP cDNA kalıp ile yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M: 1 kb marker, 1: H $\beta$ 2 primerleri ile negatif kontrol, 2: H $\beta$ 2 primerleri ile pozitif kontrol, 3: KLK4 ekspresyon primerleri F5-R3 ile LNCaP hücre hattında PZR görüntüsü).

Doğru büyüklükte bant görülen KLK4 ekspresyon primerleri ile gerçek zamanlı PZR çalışmasına geçmeden önce, aynı çalışmada SMAD2, SMAD3, SMAD4, HIF-1 $\alpha$  ve H $\beta$ 2 primerleri ile de çalışılacağı için bu genlere ait ekspresyon primerlerinde bağlanma sıcaklıkları aynı olması gerekiyordu. Çünkü tüm primerler ile aynı 96 well plakada çalışılacaktır. Bu yüzden bu primerler ile de önce PZR yapıldı ve sonuçlar agaroz jelde görüntülendi. SMAD2 için 330bç, SMAD3 için 309bç SMAD4 için 356bç, HIF-1 $\alpha$  için 302bç ve H $\beta$ 2 için 314bç doğru büyüklükte bantlar gözlemlendi. Bütün primer için uygun olan

55 °C bağlanma sıcaklığı tespit edildikten sonra gerçek zamanlı PZR çalışmalarında bu primerlerin kullanılmasına karar verildi.

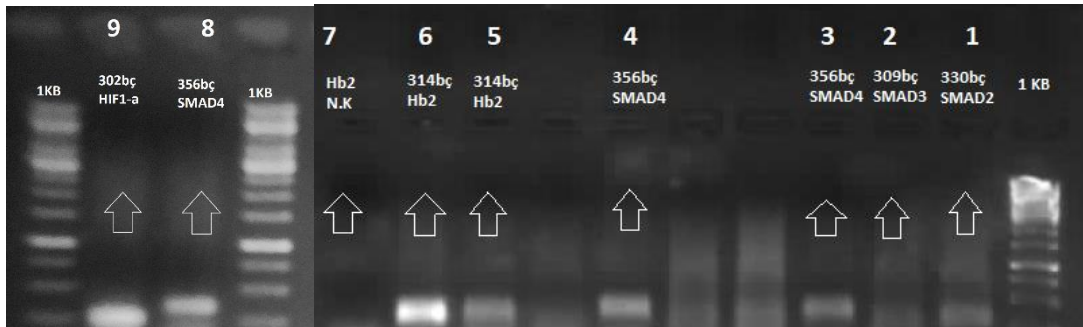
**Tablo 4.5:** SMAD2, SMAD3, SMAD4, HİF-1 $\alpha$ , ve H $\beta$ 2 primerleri ile farklı cDNA kaynakları ile yapılan PZR içeriği.

	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD4	H $\beta$ 2 P.K	H $\beta$ 2 P.K	H $\beta$ 2 N.K	SMAD4	HİF1- $\alpha$
<b>Tüp No</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>cDNA</b>	LNCaP 72h T+C	LNCaP 72h T+C	LNCaP 72h T+C	PC-3 48h C+T	LNCaP 72h C+T	PC-3 48h C+T	-	LNCaP Nor.	LNCaP TGF
<b>cDNA miktarı</b>	2	2	2	2	2	2	-	2	2
<b>Taq Buffer</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Forward Primer</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Reverse Primer</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>dNTP</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Taq Pol.</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	39,5	37,5	37,5
<b>Toplam</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Tüm miktarlar mikrolitre ( $\mu$ l) birimindedir.

**Tablo 4.6:** SMAD2, SMAD3, SMAD4, HİF-1 $\alpha$ , KLK4 ve H $\beta$ 2 primerleri ile farklı cDNA kaynakları ile yapılan PZR koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
<b>Denatürasyon</b>	94°C	5dk	1
<b>Denatürasyon</b>	94°C	30sn	35
<b>Bağlanma</b>	55°C	30sn	35
<b>Uzama</b>	72°C	30sn	35
<b>Final Uzama</b>	72°C	5dk	1



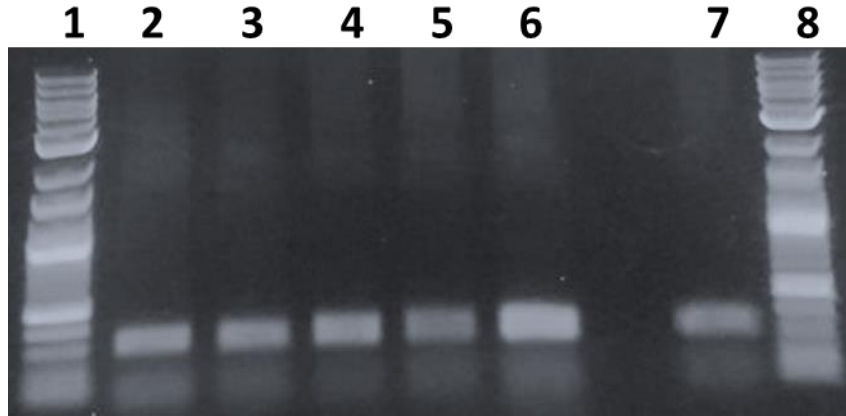
**Şekil 4.12:** SMAD2, SMAD3, SMAD4, HİF-1 $\alpha$  ve H $\beta$ 2 primerleri ile farklı cDNA kaynakları ile yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. (1kb: Marker, 1: SMAD2)



ekspresyon primerleri ile LNCaP C+T hücre hattında PZR görüntüsü, 2: SMAD3 ekspresyon primerleri ile LNCaP C+T hücre hattında PZR görüntüsü, 3: SMAD4 ekspresyon primerleri ile LNCaP C+T hücre hattında PZR görüntüsü, 4: SMAD4 ekspresyon primerleri ile PC-3 C+T hücre hattında PZR görüntüsü, 5: H $\beta$ 2 primerleri ile LNCaP C+T hücre hattında pozitif kontrol, 6: H $\beta$ 2 primerleri ile PC-3 C+T hücre hattında pozitif kontrol, 7: H $\beta$ 2 primerleri ile negatif kontrol, 8: SMAD4 ekspresyon primerleri ile LNCaP Normoksiya hücre hattında PZR görüntüsü, 9: HIF-1 $\alpha$  ekspresyon primerleri ile LNCaP TGF- $\beta$  hücre hattında PZR görüntüsü .\*(C+T : Kimyasal hipoksi+TGF- $\beta$ ).

#### 4.3.2 Farklı Hücre Hatlarında KLK4 Geninin mRNA İfadesinin Belirlenmesi

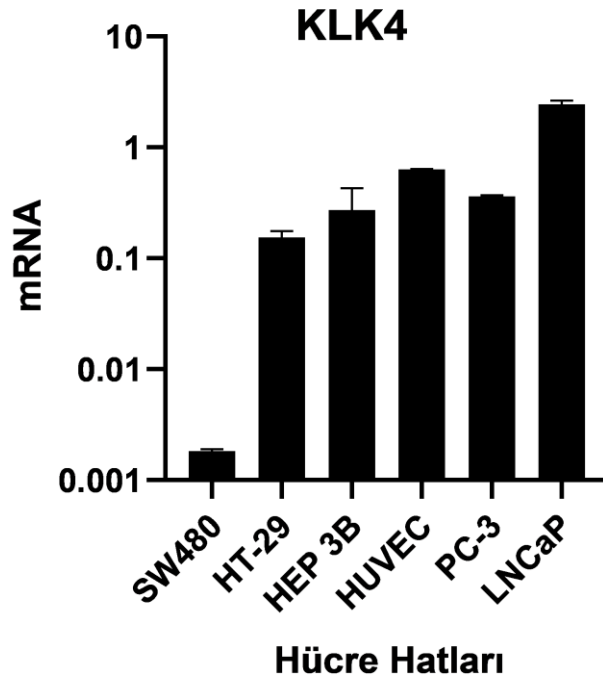
Farklı hücre hatlarında KLK4' ün ifadesinin belirlemek amacıyla hücreler (SW480, HT-29, HEP 3B, HUVEC, PC-3 ve LNCaP,) kültürde büyütüldü ve sayılarak 25 cm<sup>2</sup> flasklara 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde yayıldı. Ertesi gün tripsinizasyon ile flasklardan hücreler bir spatula yardımıyla kazınarak endorflara toplandı. Santrifüleme ve PBS ile yıkama sonrası elde edilen pelletlerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA' lardan 1  $\mu$ g kullanılarak cDNA sentezi bölüm 3.2.3.6 da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA' ların kontrolü H $\beta$ 2 PZR' ı yapılarak bölüm 3.2.3.7 anlatıldığı şekilde ve tablo 3.7 de belirtilen PZR koşullarında yapılarak kontrol edildi ve agaroz jele yüklenerek görüntülendi.



**Şekil 4.13:** Farklı hücre hatlarından yapılan cDNA' ların H $\beta$ 2 PZR elektroforez jel görüntüsü (1:100 bç marker, 2: SW480 kolon kanseri hücre hattı, 3: HT-29 kolon kanseri hücre hattı, 4: HEP 3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, 5: HUVEC umbilikal ven endotel hücresi, 6: PC-3 prostat kanseri hücre hattı, 7: LNCaP prostat kanseri hücre hattı, 8: 100 bç marker).

KLK4 geninin farklı hücre hatları olan PC-3/LNCaP (insan prostat karsinomu), HEP 3B (insan hepatoselüler karsinomu), HT-29/SW480 (insan kolon karsinomu), ve HUVEC

(insan umblikal ven endotel hücresi) hücrelerinde mRNA ifadesini belirleyebilmek amacıyla yapılan cDNA' lardan gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR bölüm 3.2.3.8' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Yapılan analize göre (Şekil 4.14) KLK4' ün tüm hücre hatlarında ifadesi olduğu görüldü. mRNA ifadesinin en çok androjen bağımlı prostat kanseri hücresi olan LNCaP hücresinde, en az ise kolon kanseri hücresi olan SW480 hücresinde olduğu görüldü.

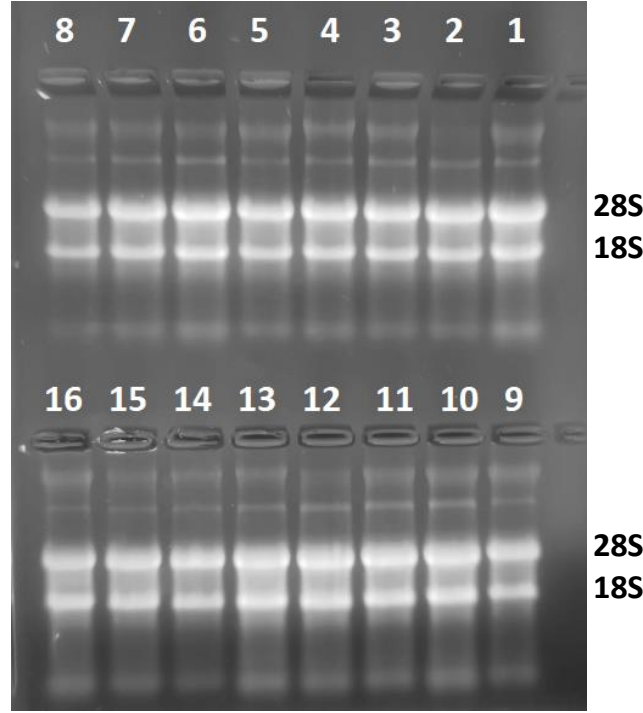


**Şekil 4.14:** Farklı hücre hatlarında KLK4 mRNA ifadesi (SW480 kolon kanseri hücre hattı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı, HEP 3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, HUVEC umblikal ven endotel hücresi, PC-3 prostat kanseri hücre hattı, LNCaP prostat kanseri hücre hattı).

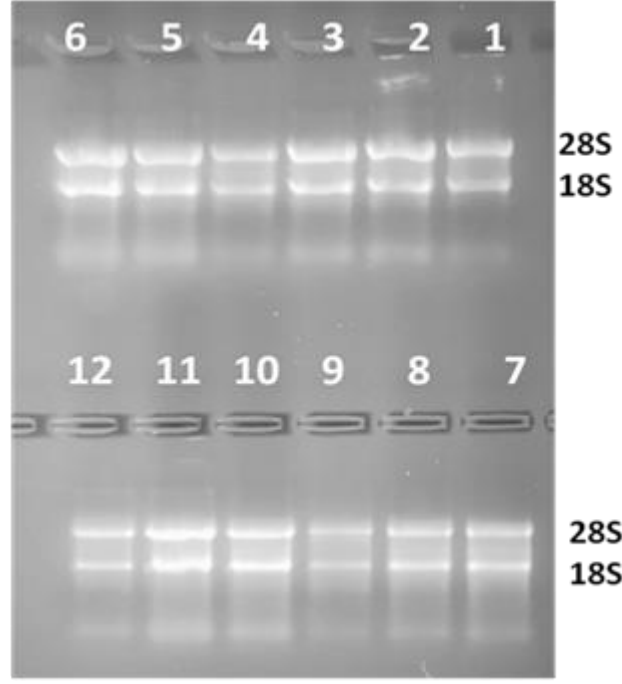
#### 4.3.3 Hücrelere TGF- $\beta$ ve CoCl<sub>2</sub> Uygulamaları sonrası RNA İzolasyonları

Hücreler rutin pasajlama ile uygun sayıya geldiklerinde  $2 \times 10^6$  hücre olarak 25 cm<sup>2</sup> flasklara yayıldılar. Büyütülen PC-3 ve LNCaP hücrelerine sırasıyla 1'er saat arayla 500 Ü/ml TGF- $\beta$ , 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> ayrı ayrı ve 500 Ü/ml TGF- $\beta$ +150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> uygulandı. Bu işlem PC-3 hücrelerinde 1, 3, 6 ve 24 saat olarak LNCaP hücreleri için ise 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman dilimlerinde gruplar oluşturularak elde edilen tüm pelletlerden RNA izolasyonları Thermo Scientific Gene Jet RNA Purification Kit (Ref K0731 Lot 00683657) firmasının kitinde bulunan talimatlar doğrultusunda yapıldı. Elde

edilen RNA' lar, RNA jel elektroforezinde bölüm 3.2.3.5' de anlatıldığı şekilde yürütüldü ve görüntüledi.



**Şekil 4.15:** PC-3 hücre hattında kurulan deney sonucu elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' lar. (1: PC-3 1h Kontrol, 2: PC-3 1h TGF, 3: PC-3 1h CoCl<sub>2</sub>, 4: PC-3 1h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 5: PC-3 3h Kontrol, 6: PC-3 3h TGF, 7: PC-3 3h CoCl<sub>2</sub>, 8: PC-3 1h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 9: PC-3 6h Kontrol, 10: PC-3 6h TGF, 11: PC-3 6h CoCl<sub>2</sub>, 12: PC-3 6h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 13: PC-3 24h Kontrol, 14: PC-3 24h TGF, 15: PC-3 24h CoCl<sub>2</sub>, 16: PC-3 24h TGF+ CoCl<sub>2</sub>).



**Şekil 4.16:** LNCaP hücre hattında kurulan deney sonucu elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' lar. (1: LNCaP 24h Kontrol, 2: LNCaP 24h TGF, 3: LNCaP 24h CoCl<sub>2</sub>, 4: LNCaP 24h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 5: LNCaP 48h Kontrol, 6: LNCaP 48h TGF, 7: LNCaP 48h CoCl<sub>2</sub>, 8: LNCaP 48h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 9: LNCaP 72h Kontrol, 10: LNCaP 72h TGF, 11: LNCaP 72h CoCl<sub>2</sub>, 12: LNCaP 72h TGF+ CoCl<sub>2</sub>).

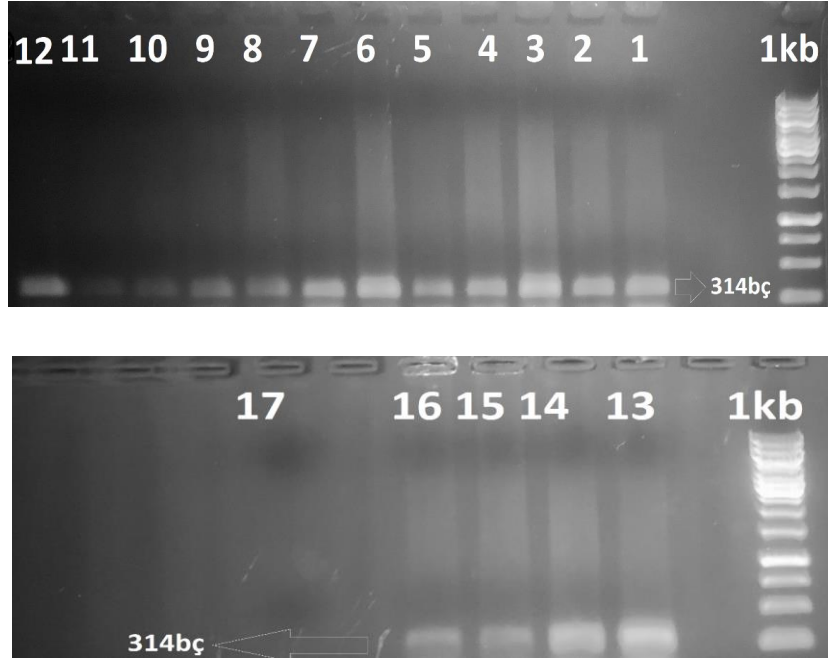
#### 4.3.4 cDNA Eldesi ve Kontrolü

İzole edilen bu RNA' ların spektrofotometre ile RNA miktarı ve saflığı mikrodropta belirlendi. RT reaksiyonlarında 1 µg RNA ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. DNA' ların kontrolü için Hβ2 PZR' ı yapıldı ve örnekler jelde yürütülerek görüntülendi.

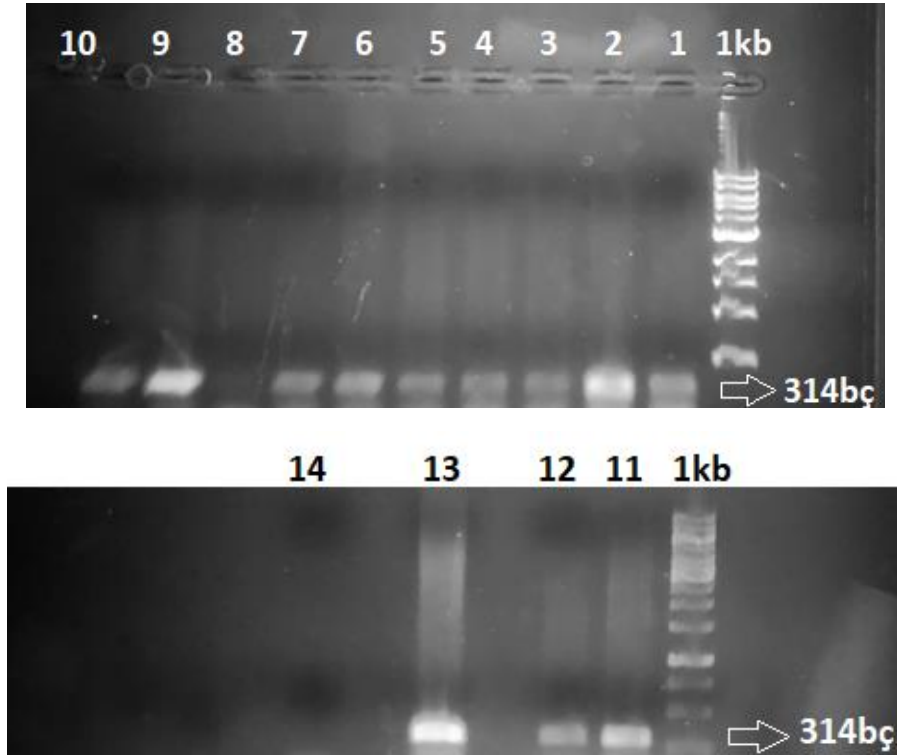
Bu cDNA' lar kullanılarak SMAD2, SMAD3, HIF-1α, Hβ2 ve KLK4 ekspresyon primerleri ile gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

**Tablo 4.7:** Hβ2 PZR koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
<b>Denatürasyon</b>	94°C	2dk	1
<b>Denatürasyon</b>	94°C	1dk	35
<b>Bağlanma</b>	55°C	30sn	35
<b>Uzama</b>	72°C	45sn	35
<b>Final Uzama</b>	72°C	5dk	1



**Şekil 4.17:** PC-3 hücre hattından izole edilen RNA' ların kontrolü için h $\beta$ 2 PZR' 1 elektroforez jel görüntüsü. (1kb: Marker, 1: PC-3 1h Kontrol, 2: PC-3 1h TGF, 3: PC-3 1h CoCl<sub>2</sub>, 4: PC-3 1h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 5: PC-3 3h Kontrol, 6: PC-3 3h TGF, 7: PC-3 3h CoCl<sub>2</sub>, 8: PC-3 1h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 9: PC-3 6h Kontrol, 10: PC-3 6h TGF, 11: PC-3 6h CoCl<sub>2</sub>, 12: PC-3 6h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 13: PC-3 24h Kontrol, 14: PC-3 24h TGF, 15: PC-3 24h CoCl<sub>2</sub>, 16: PC-3 24h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 17: Negatif Kontrol).



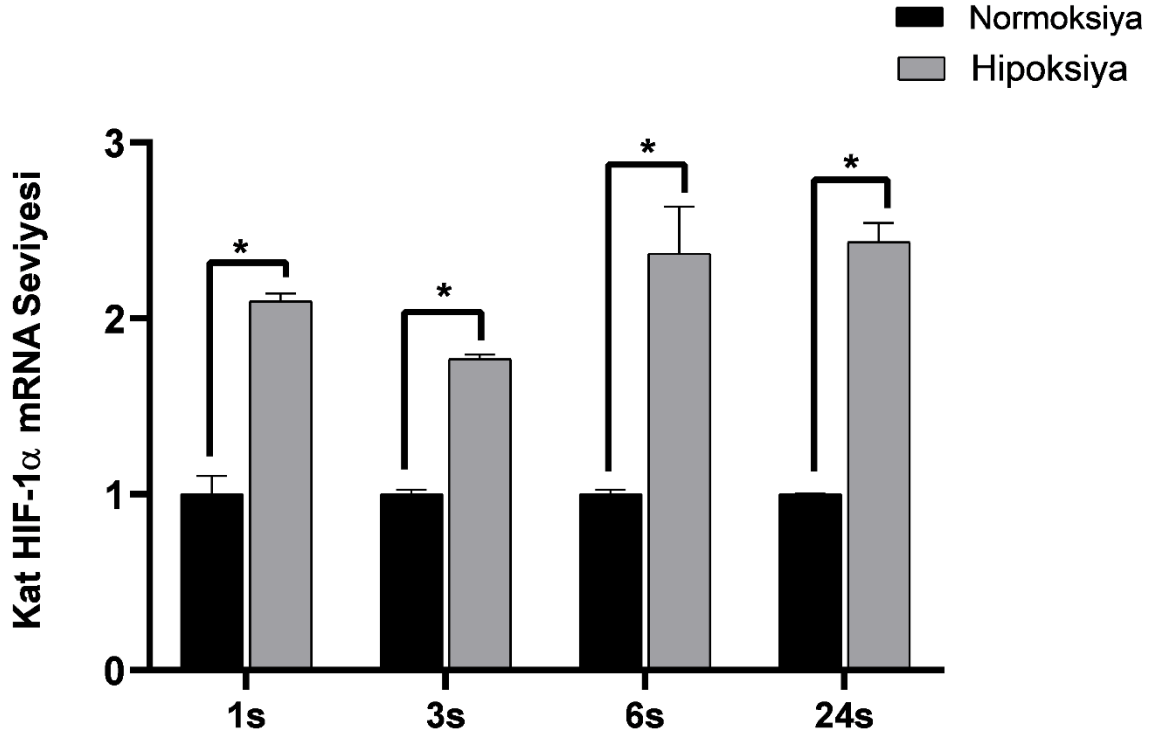
**Şekil 4.18:** LNCaP hücre hattından izole edilen RNA' ların kontrolü için hβ2 PZR' ı elektroforez jel görüntüsü. (1kb: Marker, 1: LNCaP 24h Kontrol, 2: LNCaP 24h TGF, 3: LNCaP 24h CoCl<sub>2</sub>, 4: LNCaP 24h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 5: LNCaP 48h Kontrol, 6: LNCaP 48h TGF, 7: LNCaP 48h CoCl<sub>2</sub>, 8: LNCaP 48h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 9: LNCaP 72h Kontrol, 10: LNCaP 72h TGF, 11: LNCaP 72h CoCl<sub>2</sub>, 12: LNCaP 72h TGF+ CoCl<sub>2</sub>, 13: Pozitif Kontrol, 14: Negatif Kontrol).

#### 4.3.5 Gerçek Zamanlı PZR

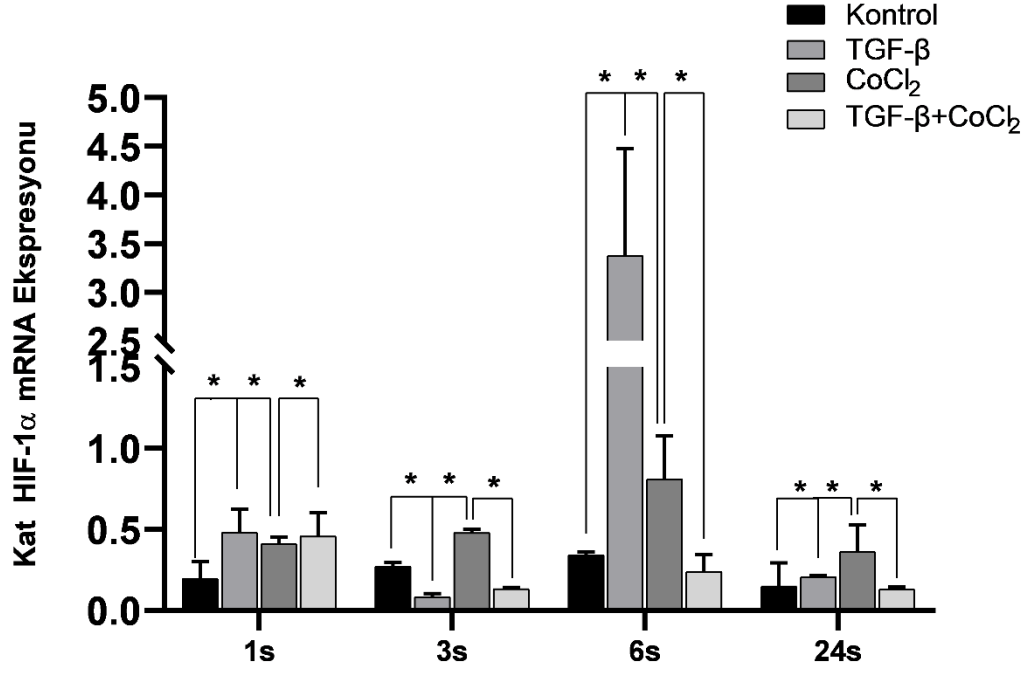
Elde edilen cDNA' ların kontrolünden sonra bu cDNA' lar ile bölüm 3.2.3.8' de anlatıldığı şekilde gerçek zamanlı PZR yapıldı.

Çalışmamızda öncelikle KLK4 ifadesi tespit edilebilir düzeyde olmayan PC-3 hücreleri ile analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla sitokin ve CoCl<sub>2</sub> uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen cDNA' lar kalıp olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı. Hipoksik koşulun ana regülatörü ve göstergesi olan HİF-1α seviyesi ilk olarak analiz edildi. PC-3 hücrelerinde 1,3,6 ve 24 saatlik zaman dilimlerinde normal koşullara kıyasla CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda HİF-1α seviyesinin (Şekil 4.19) tüm zaman dilimlerinde arttığı gösterildi. Bu da hipoksik koşulların başarılı bir şekilde oluşturulduğunun teyidi olmuştur. Çalışılan tüm koşullarda da HİF-1α seviyesi ayrıca analiz edildi. (Şekil 4.20). Daha sonra sırasıyla KLK4 (Şekil 4.21 A-B) ve TGF-β sinyal yolağının düzenleyici proteinleri olan SMAD proteinlerinin de mRNA seviyesindeki ekspresyonları analiz edildi

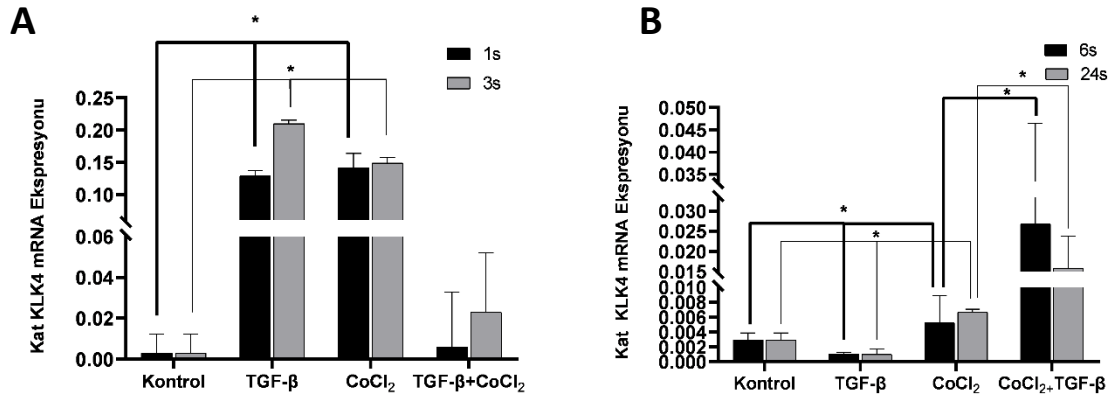
(Şekil 4.22, Şekil 4.23). TGF- $\beta$  uygulamasının hücreler üzerindeki uyarıcı etkisi SMAD2/3 mRNA seviyelerindeki artış ile koreledir. PC-3 hücre hattında TGF- $\beta$  ve hipoksik gruplarda KLK4 mRNA seviyesi 1 ve 3 saatlerde artarken (Şekil 4.21 A) 6 ve 24 saatlerde TGF- $\beta$  uygulamasının mRNA seviyesindeki ekspresyonunda azalmaya, hipoksik koşullarda ise yine diğer saatlerde olduğu gibi artışa (Şekil 4.21 B) sebep olmuştur.



**Şekil 4.19:** Çalışmamızda kullandığımız kimyasal hipoksi modelinde PC-3 Hücre Hattında Normoksik ve Hipoksik Koşullarda HIF-1 $\alpha$  mRNA ifadesinin Gerçek zamanlı PZR ile doğrulanması (1,3, 6 ve 24 saatler).

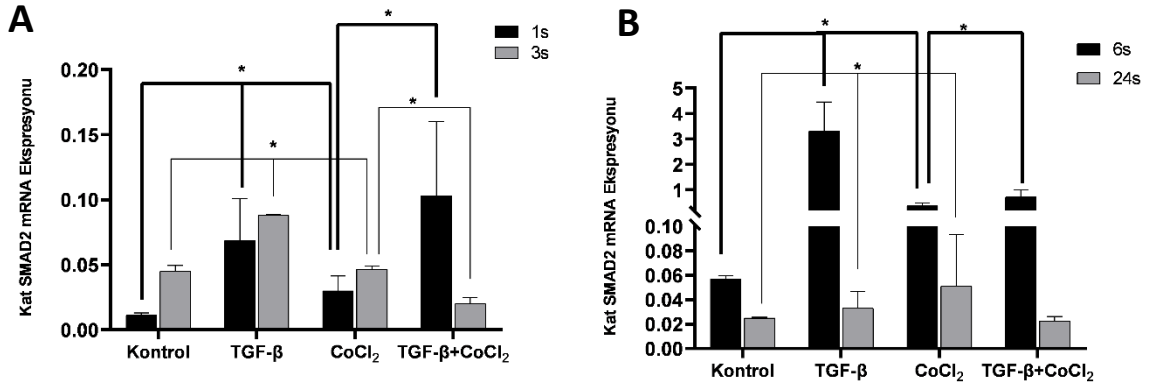


Şekil 4.20: PC-3 Hücre Hattında tüm gruplarda HIF-1 $\alpha$  mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (1,3, 6 ve 24 saatler).

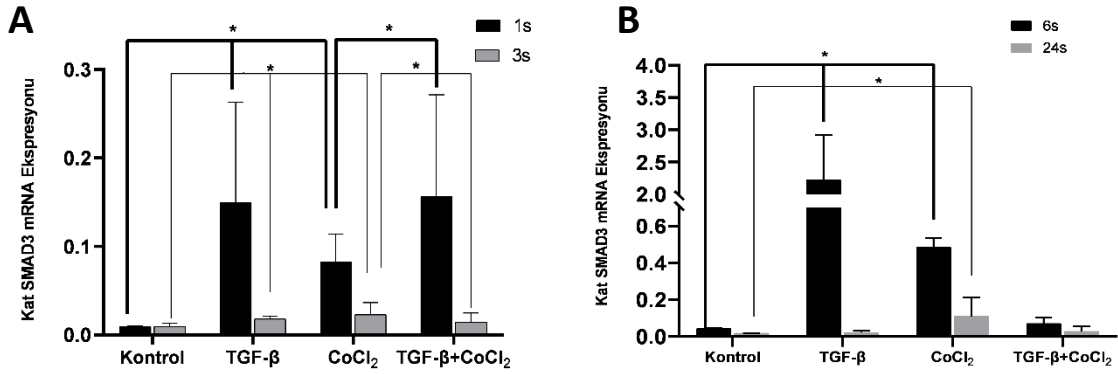


Şekil 4.21: PC-3 Hücre Hattında KLK4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (A: 1 ve 3 saatler, B: 6 ve 24 saatler).





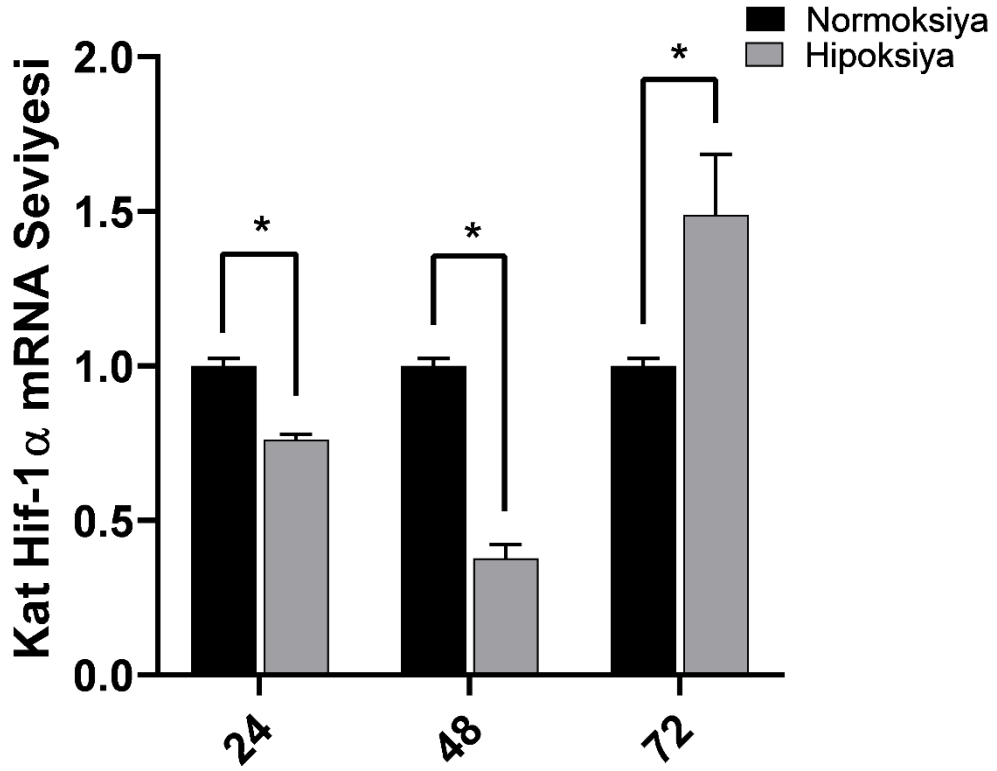
**Şekil 4.22:** PC-3 Hücre Hattında SMAD2 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (A: 1 ve 3 saatler, B: 6 ve 24 saatler).



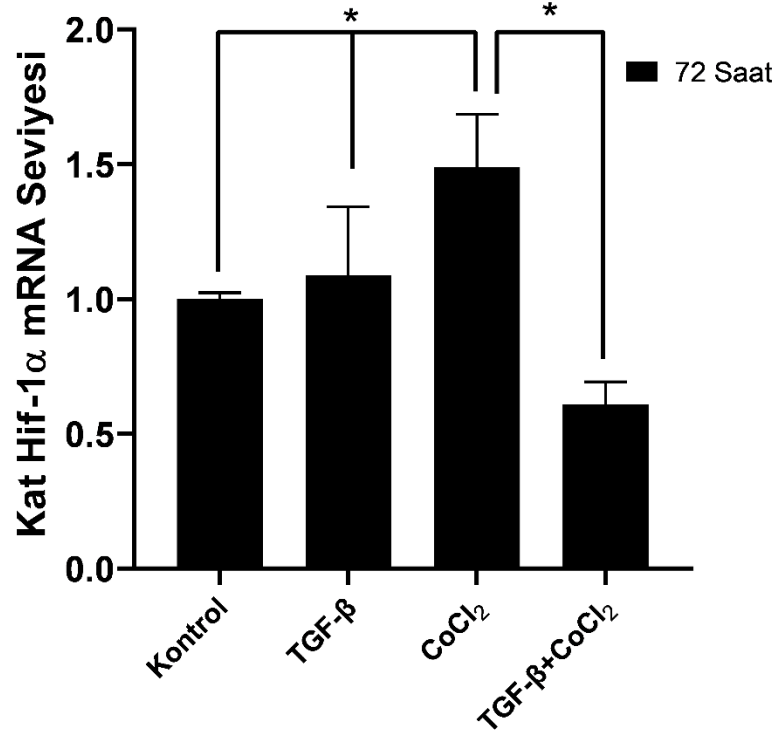
**Şekil 4.23:** PC-3 Hücre Hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (A: 1 ve 3 saatler, B: 6 ve 24 saatler).

Çalışmalarımız KLK4 ifadesi yüksek oranda tespit edilen LNCaP hücrelerinde de gerçekleştirildi. Bu amaçla sitokin ve CoCl<sub>2</sub> uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen cDNA' lar kalıp olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR sonucunda analizleri yapıldı. Hipoksik koşulun ana regülatörü ve göstergesi olan HİF-1α seviyesi ilk olarak analiz edildi. LNCaP hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde normal koşullara kıyasla CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda HİF-1α seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.24) tüm zaman dilimlerinde artış tespit edilemedi. Sadece 72 saatte başarılı bir hipoksik koşulun sağlandığı görülmektedir (Şekil 4.25). Bu sebeple çalışılan diğer genlerdeki etki 72 saat için değerlendirmeye alındı. Bu da hipoksik koşulların başarılı bir şekilde oluşturulduğunun teyidi olmuştur. Çalışılan tüm koşullarda da HİF-1α seviyesi ayrıca analiz edildi (Şekil 4.25). Daha sonra sırasıyla KLK4 (Şekil 4.26 A) ve TGF-β sinyal

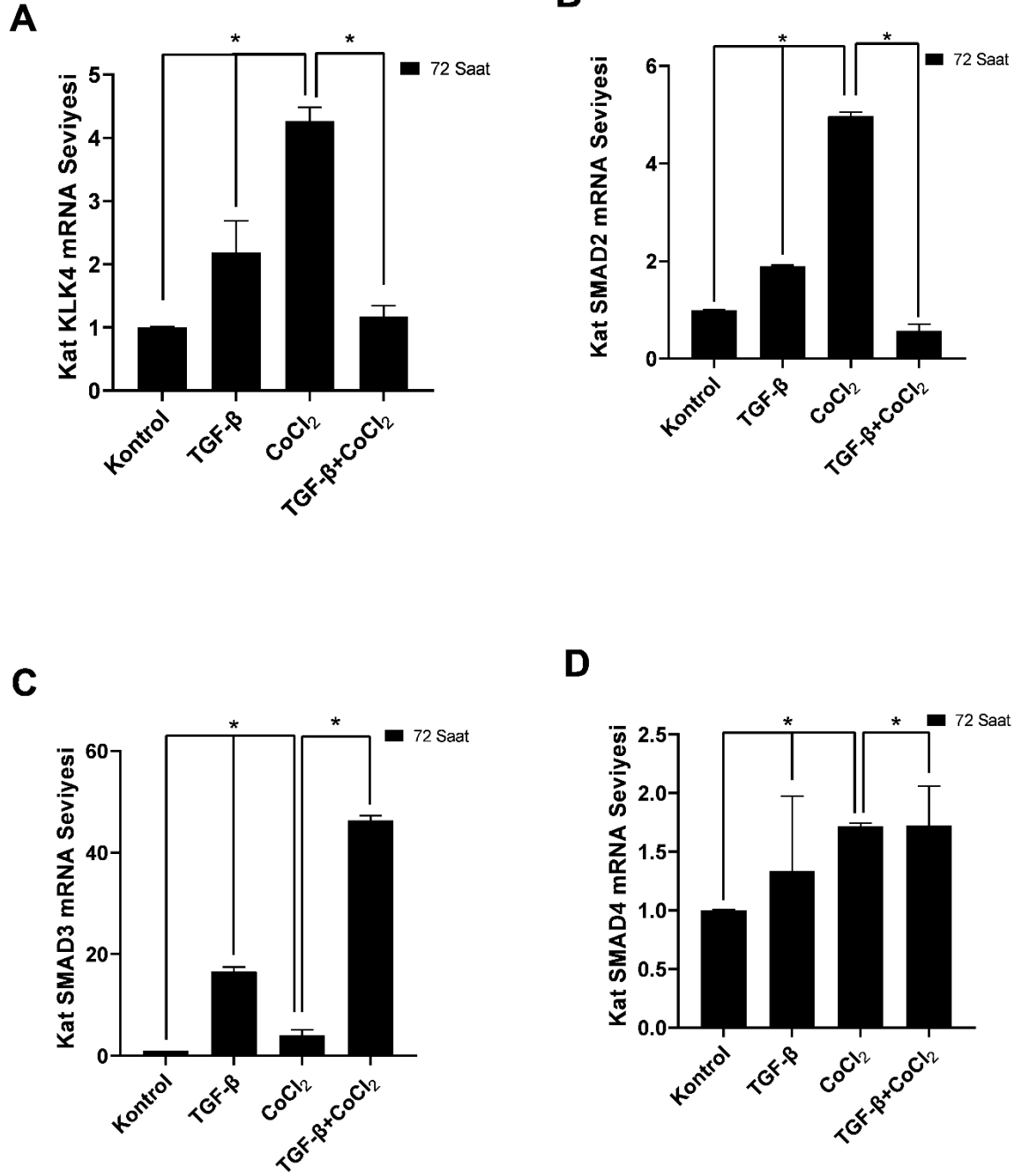
yolağının düzenleyici proteinleri olan SMAD proteinlerinin de mRNA seviyesindeki ekspresyonları analiz edildi (Şekil 4.26 B,C,D). TGF- $\beta$  uygulamasının hücreler üzerindeki uyarıcı etkisi SMAD2/3/4 mRNA seviyelerindeki artış ile koreledir. LNCaP hücre hattında TGF- $\beta$  ve hipoksik gruplarda KLK4 mRNA ekspresyonunda 72 saatte artış (Şekil 4.26 A) tespit edildi.



Şekil 4.24: Çalışmamızda kullandığımız kimyasal hipoksi modelinde LNCaP Hücre Hattında Normoksik ve Hipoksik Koşullarda HIF-1 $\alpha$  mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile doğrulanması (24, 48 ve 72 saatler).



Şekil 4.25: LNCaP Hücre Hattında Tüm gruplarda HIF-1α mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat).



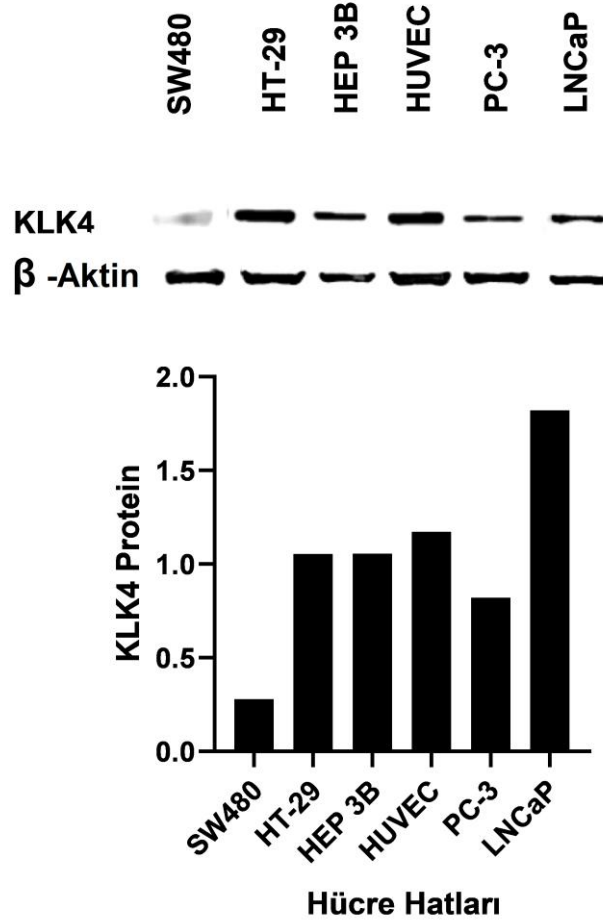
**Şekil 4.26:** (A) LNCaP hücre hattında KLK4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat). (B) LNCaP hücre hattında SMAD2 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat), (C) LNCaP hücre hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat), (D) LNCaP hücre hattında SMAD4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi (72 saat).

## 4.4 Protein ile İlgili Deneyler

### 4.4.1 Farklı Hücre Hatlarında KLK4' ün Protein İfadesinin Belirlenmesi

SW480, HT-29, HEP 3B, HUVEC, PC-3 ve LNCaP hücre hatlarında KLK4' ün protein ifadesinin belirlemek amacıyla büyütülen hücreler sayılarak 25 cm<sup>2</sup> flasklara 2x10<sup>6</sup> olarak ekildi. Bir sonraki gün flasklara Ripa Buffer eklenerek bir spatula yardımıyla hücreler kazınarak protein izolasyonları bölüm 3.2.4.2' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Ardından bölüm 3.2.4.3' de anlatıldığı şekilde protein miktar tayinleri gerçekleştirildi. SDS jellere her bir hücre hattından elde edilen proteinlerden 35 µg olacak şekilde yüklendi ve 90V da yürütme işlemi bölüm 3.2.4.4' de anlatıldığı şekilde yapıldı. Ardından SDS jelin blotlanması bölüm 3.2.4.5 de anlatıldığı şekilde 1 gece boyunca yapıldı. Transferden alınan proteinlerin belirlenmesi bölüm 3.2.4.6 da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Yapılan western blot sonucunda görüntülenen membranlardan elde edilen bantlar İmaj J programında analiz edildi. Analizler sonucunda elde edilen KLK4 protein miktarı, β-Aktin proteini miktarı ile normalleştirildi. Yapılan analiz sonuçlarına göre (Şekil 4.27), KLK4' ün mRNA analizleri ile tutarlı olarak tüm hücrelerde ifadesi bulunurken, yine olarak en çok androjen bağımlı prostat kanseri hücresi olan LNCaP hücresinde, en az ise kolon kanseri hücresi olan SW480' de protein ifadesi tespit edildi.



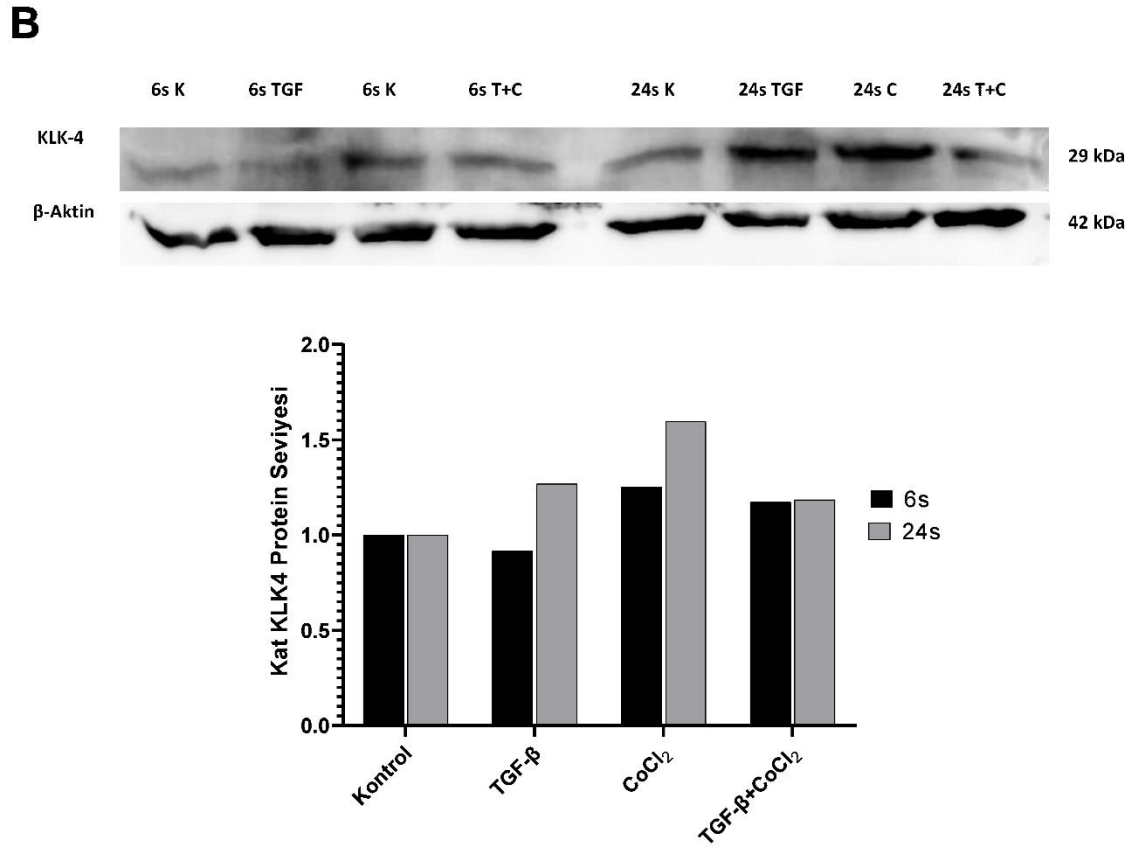
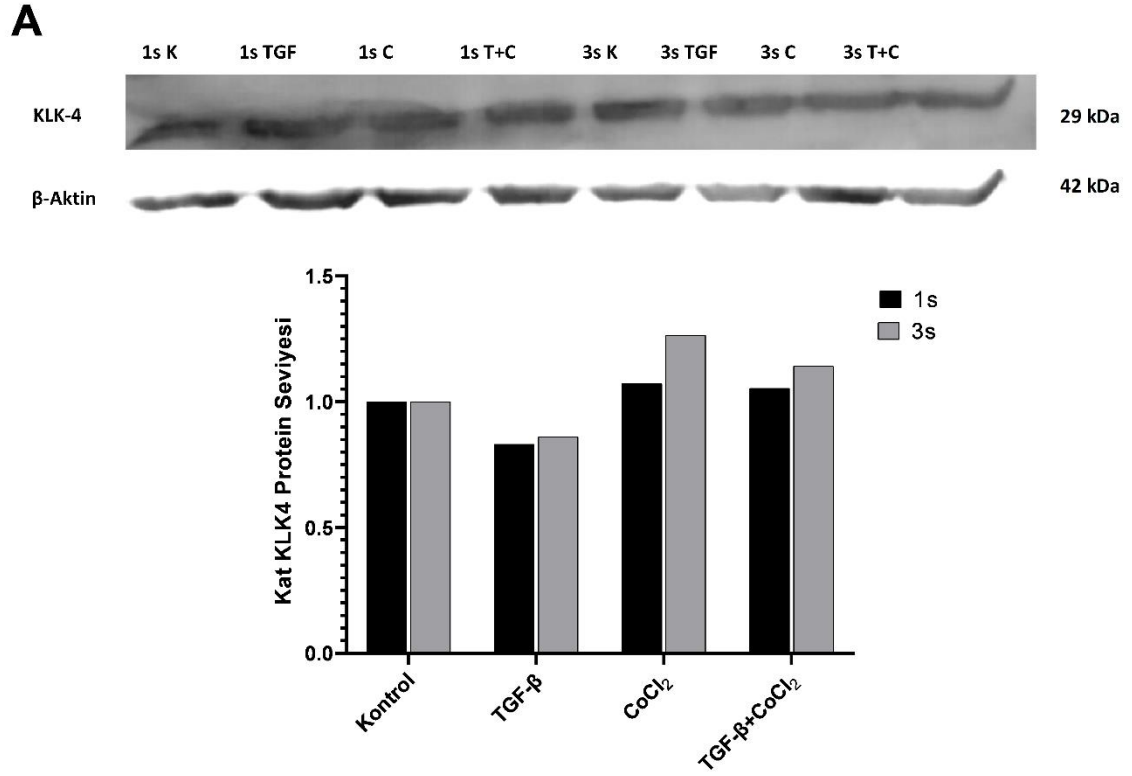
**Şekil 4.27:** Farklı hücre hatlarında KLK4' ün protein ifadesi (SW480 kolon kanseri hücre hattı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı, HEP 3B hepatoselüler kanseri hücre hattı, HUVEC umbilikal ven endotel hücresi, PC-3 prostat kanseri hücre hattı, LNCaP prostat kanseri hücre hattı).

#### 4.4.2 Deney Düzeninin Kurulması (TGF- $\beta$ ve CoCl<sub>2</sub> Uygulaması) ve Western Blot

Rutin pasaj ile çoğaltılan PC-3 ve LNCaP hücrelerinden deney grupları oluşturuldu. LNCaP hücreleri için 6, 24, 48 ve 72 saat dilimlerini içeren deney grupları oluşturuldu. PC-3 hücreleri için ise 1,3,6 ve 24 saat dilimi içeren deney grupları oluşturuldu. Sitokin ve CoCl<sub>2</sub> uygulamaları saat dilimleri için tersten başlatıldı yani PC-3 deney grupları için 24 saatlik deney gruplarına ait hipoksik grupları içeren hipoksik flasklara 150  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 1 saat sonra ise ilgili flasklara 500Ü/ml (20ng/ml) TGF- $\beta$  sitokini uygulandı. Bir sonraki gün aynı uygulamalar sırasıyla 6 saat, 3 saat ve 1 saat deney grupları için de tekrarlandı. LNCaP hücreleri için, 72 saatlik deney gruplarına ait hipoksik grupları içeren hipoksik flasklara 150  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 1 saat sonra ise ilgili flasklara 500Ü/ml (20ng/ml) TGF- $\beta$  sitokini uygulandı. Bu işlem bir sonraki gün 48

saatlik deney gruplarına, sonraki gün ise 24 saat ve 6 saatlik deney gruplarına uygulanarak süre sonunda protein izolasyonlarına geçildi. Tüm deney gruplarından Ripa Buffer ile protein izolasyonu gerçekleştirildi. Hemen ardından Bradford çözeltisi ile protein ölçümleri yapıldı. SDS jellere örnekler yüklendi ve jelde yürütüldü. Bu işlem sonunda jeller PVDF membranlara aktarılmak üzere transfere alınarak 1 gece +4°C de transfere bırakıldı. Transfer sisteminden alınan membranlar bloklama işlemine konuldu daha sonra 3 kez yıkandı ve primer antikora alındı. Membranlar KLK4 primer antikoruyla (1µg) 1 gece, SMAD2/3 antikoru (1/500) ile 1-1,5 saat, PI3K, NFKβ, SAPK/JNK ve P38 MAPK (1/1000) antikoları ile ise 1 gece muamele edildikten sonra, 5 dakikalık sürelerle 3 kez tekrar yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra sekonder antikora (1/5000) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar ECL ile muamele edilerek görüntülendi.

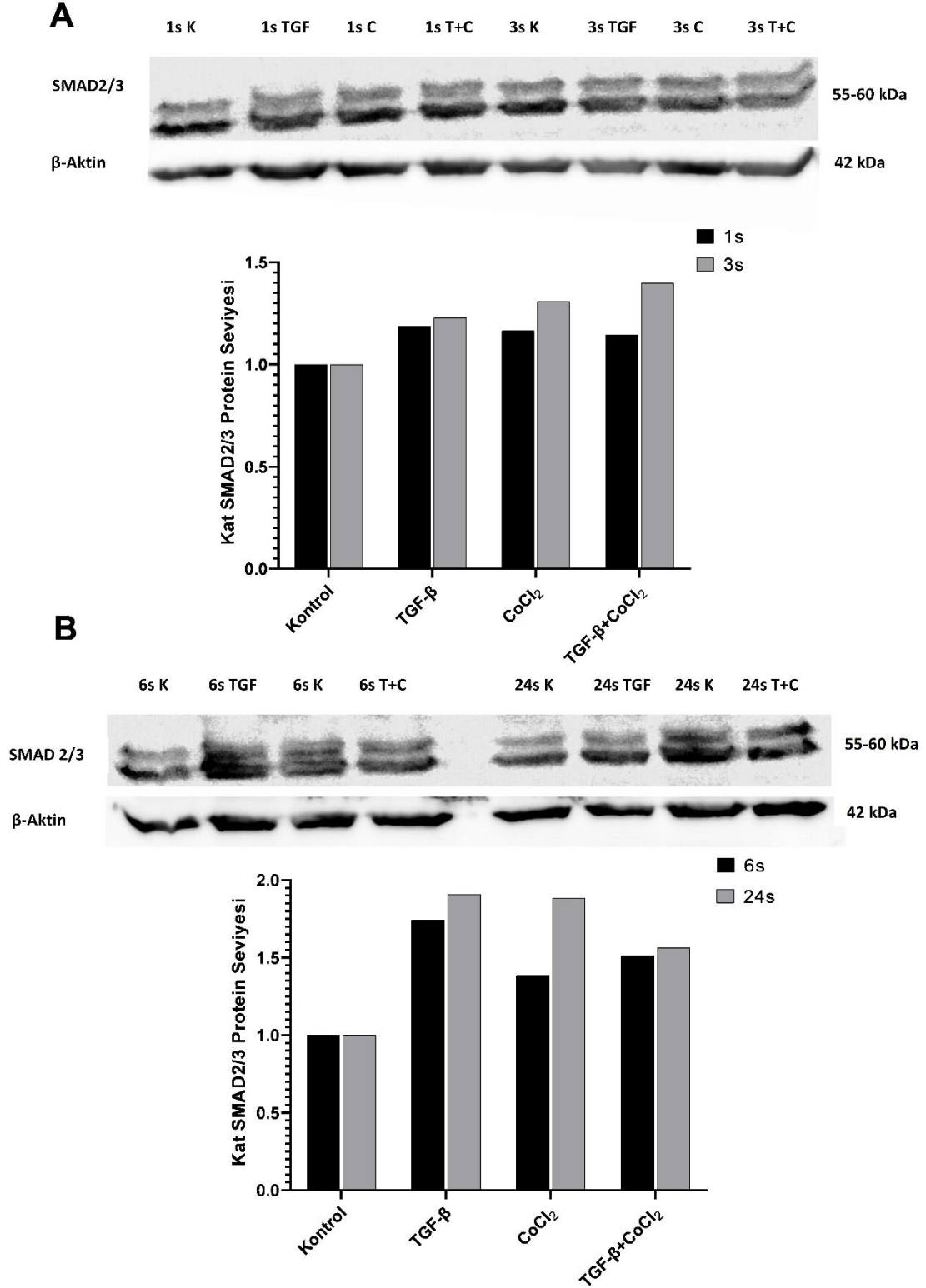
Yapılan analizler sonucunda KLK4' ün ifadesinin hipoksik koşullarda tüm zaman dilimlerinde arttığı görüldü. 24 saatlik zaman diliminde ise TGF-β uygulanan gruplarda ifadesinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.28 A ve B). Aynı gruplarda Smad2/3 protein ifadesine baktığımızda ise, tüm zaman dilimlerinde TGF-β ve CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda uyarıldığı görülmektedir (Şekil 4.29 A ve B).



**Şekil 4.28:** (A) PC-3 hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1-3 saatler. (1s K: PC-3 1 saat kontrol, 1s TGF: PC-3 1 saat TGF-β, 1s C: PC-3 1 saat CoCl<sub>2</sub>, 1s T+C: PC-3 1 saat TGF-β + CoCl<sub>2</sub>, 3s K: PC-3 3 saat kontrol, 3s TGF: PC-3 3 saat TGF-β, 3s C: PC-3 3 saat CoCl<sub>2</sub>, 3s T+C: PC-3 3 saat TGF-β + CoCl<sub>2</sub>.) (B) PC-3 Hücre



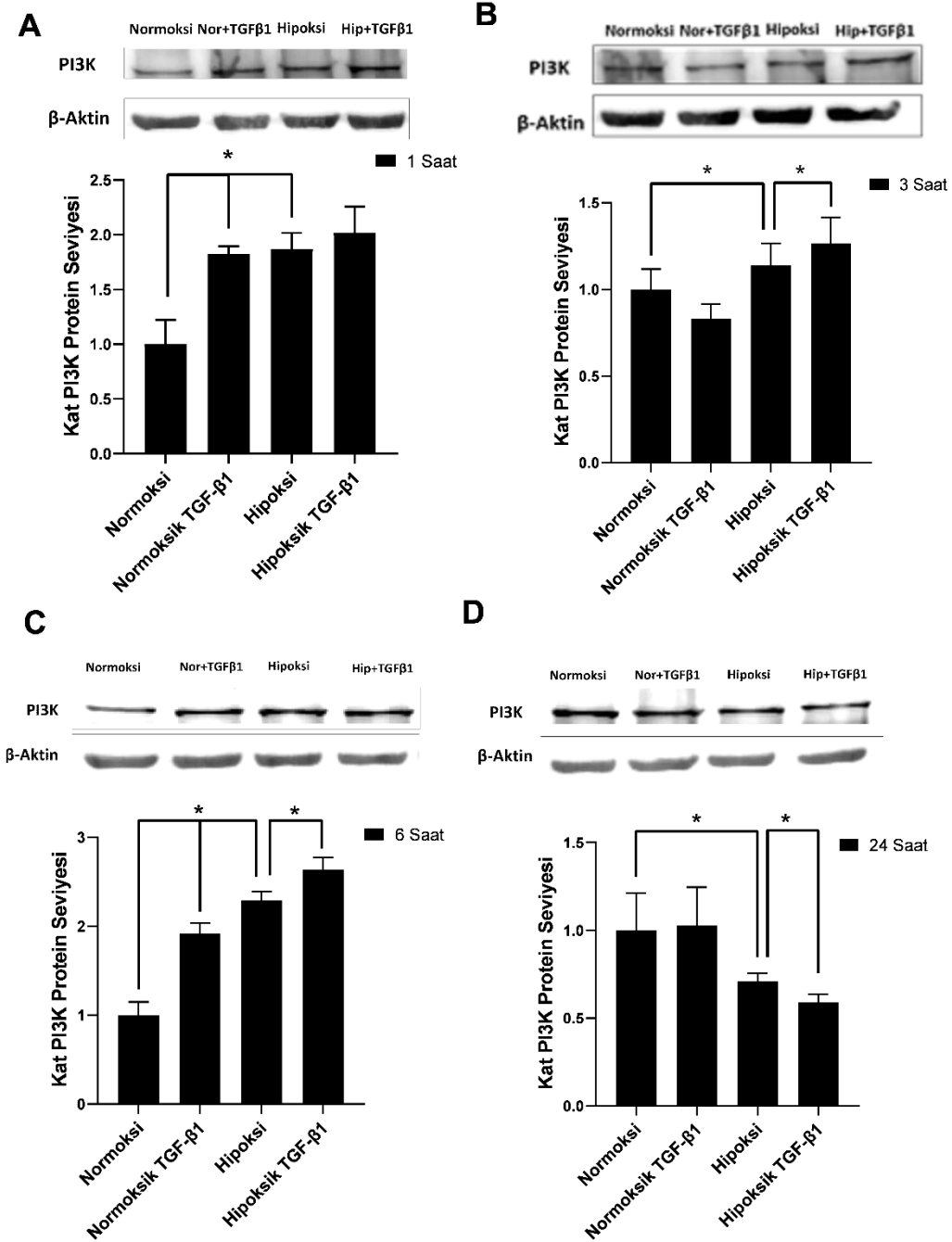
Hattında KLK4 Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6-24 saatler. (6s K: PC-3 6 saat kontrol, 6s TGF: PC-3 6 saat TGF- $\beta$ , 6s C: PC-3 6 saat CoCl<sub>2</sub>, 6s T+C: PC-3 6 saat TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub>, 24s K: PC-3 24 saat kontrol, 24s TGF: PC-3 24 saat TGF- $\beta$ , 24s C: PC-3 24 saat CoCl<sub>2</sub>, 24s T+C: PC-3 24 saat TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub>).



**Şekil 4.29:** (A) PC-3 hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1-3 saatler. (1s K: PC-3 1 saat kontrol, 1s TGF: PC-3 1 saat TGF- $\beta$ , 1s C: PC-3 1 saat CoCl<sub>2</sub>, 1s T+C: PC-3 1 saat TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub>, 3s K: PC-3 3 saat kontrol, 3s TGF: PC-3 3saat TGF- $\beta$ , 3s C: PC-3 3 saat CoCl<sub>2</sub>, 3s T+C: PC-3 3 saat TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub>.) (B) PC-3 Hücre Hattında SMAD2/3 Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6-24 saatler.(6s K: PC-3 6 saat kontrol, 6s TGF: PC-3 6 saat TGF- $\beta$ , 6s C: PC-3 6 saat CoCl<sub>2</sub>, 6s

T+C: PC-3 6 saat TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub>, 24s K: PC-3 24 saat kontrol, 24s TGF: PC-3 24 saat TGF- $\beta$ , 24s C: PC-3 24 saat CoCl<sub>2</sub>, 24s T+C: PC-3 24 saat TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub>.

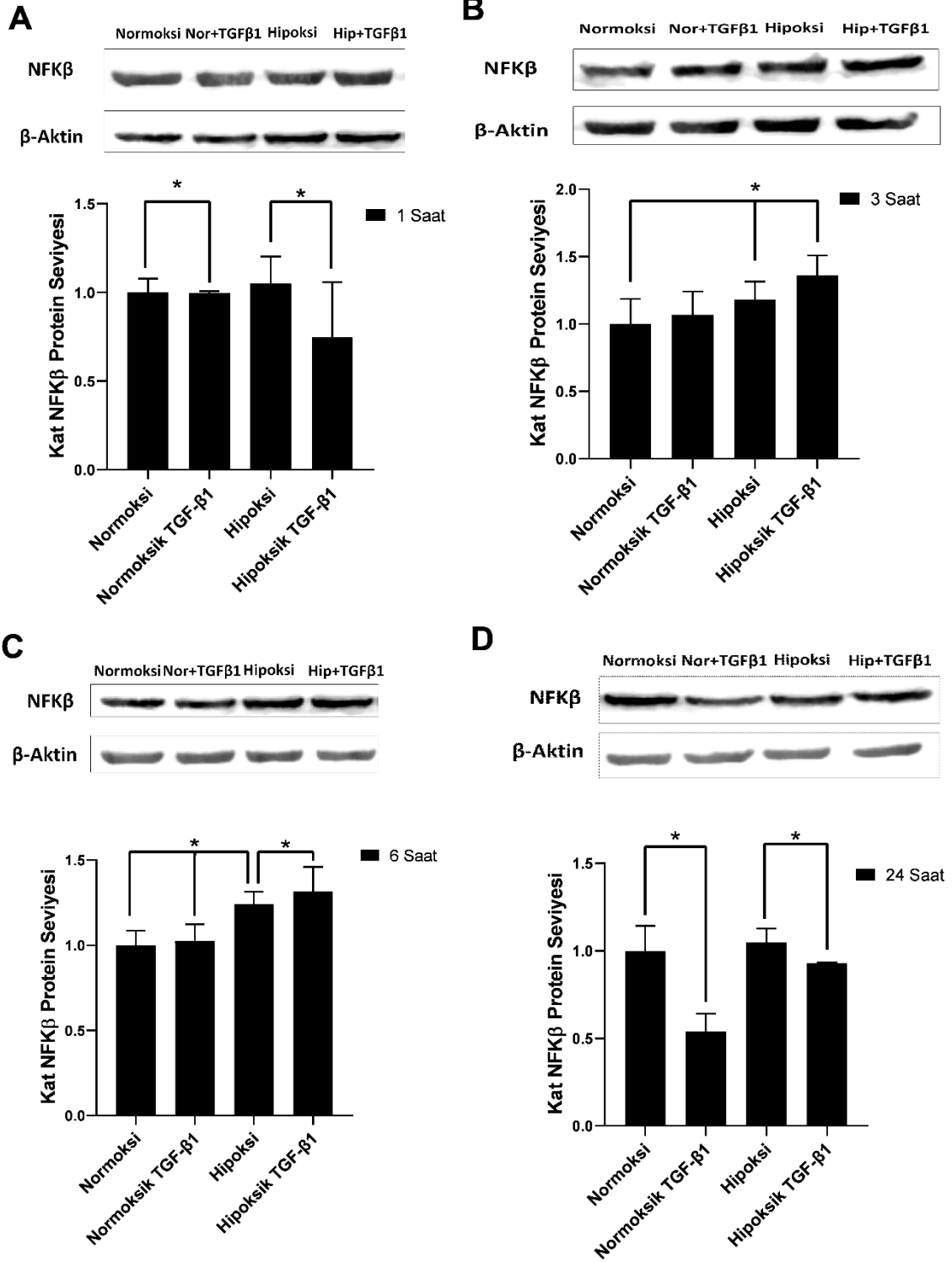
PC-3 hücrelerinde, farklı hücre içi yollara ait antikorlar ile farklı western blot çalışmaları yapıldı. İlk olarak PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz ) yolu incelendi. Büyüme faktörleri ve hormonlar, hücre büyümesini, hücre döngüsüne girişini, hücre göçünü ve hücre hayatta kalmasını koordine eden ve bu yolları tetikleyen PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz ) yolunda; erken saatler olan 1 saat ve 6 saatte TGF- $\beta$  veya CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda artış olduğu ve bu artışın TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda da devam ettiği görülmektedir. Çalışılan erken zaman dilimlerinde bu yolun aktive olduğu görülmektedir. İleri bir saat dilimi olan 24 saatte ise, CoCl<sub>2</sub> uygulanan grupta bu ifadenin azaldığı dolayısıyla TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub> uygulanan grupta da azalmanın devam etmesi CoCl<sub>2</sub>' ün TGF- $\beta$ ' nın ifadesini baskıladığını göstermektedir (Şekil 4.30).



**Şekil 4.30:** (A) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonuçları (B) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonuçları (C) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (D) PC-3 Hücre Hattında PI3K Protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları.

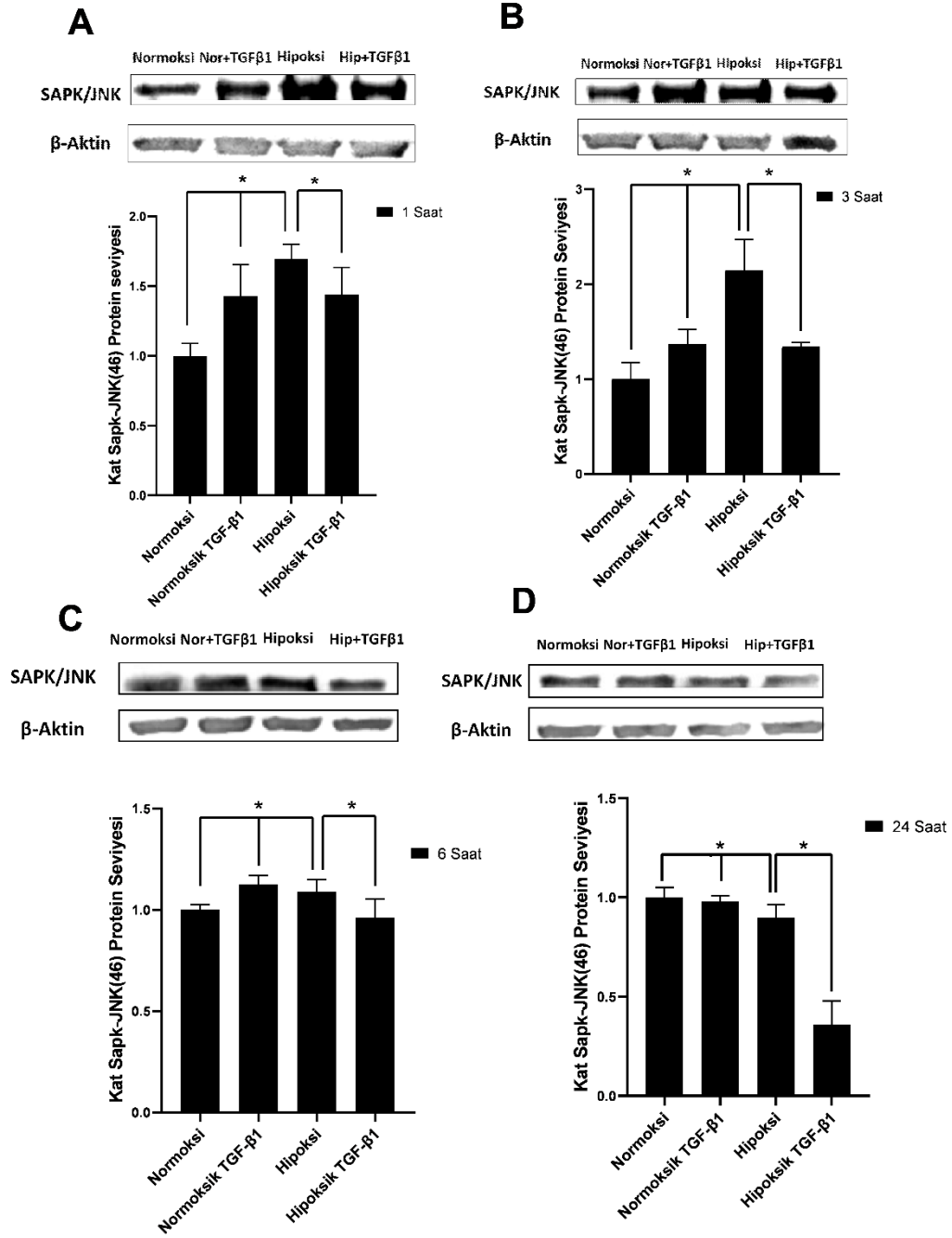
Nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel ailesi transkripsiyon faktörleri, inflamatuvar ve immün yanıtlarda rol oynarlar. PC-3 hücrelerinde bu yolun ifadesine baktığımızda, TGF- $\beta$ 'nın NF- $\kappa$ B yolu üzerinde etkili olduğu görülmektedir. TGF- $\beta$  daki artış veya azalma TGF- $\beta$  +

CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruptaki ifadeyi yönlendirmektedir. 1 saat grupları incelendiğinde TGF- $\beta$  uygulanan gruptaki azalma TGF- $\beta$  + CoCl<sub>2</sub> uygulanan grupta da azalmaya sebep olmuştur. Aynı şekilde 24 saat diliminde de görülmektedir. 6 saat diliminde ise tüm grupta NF- $\kappa$ B proteininin de artış görülmektedir (Şekil 4.31).



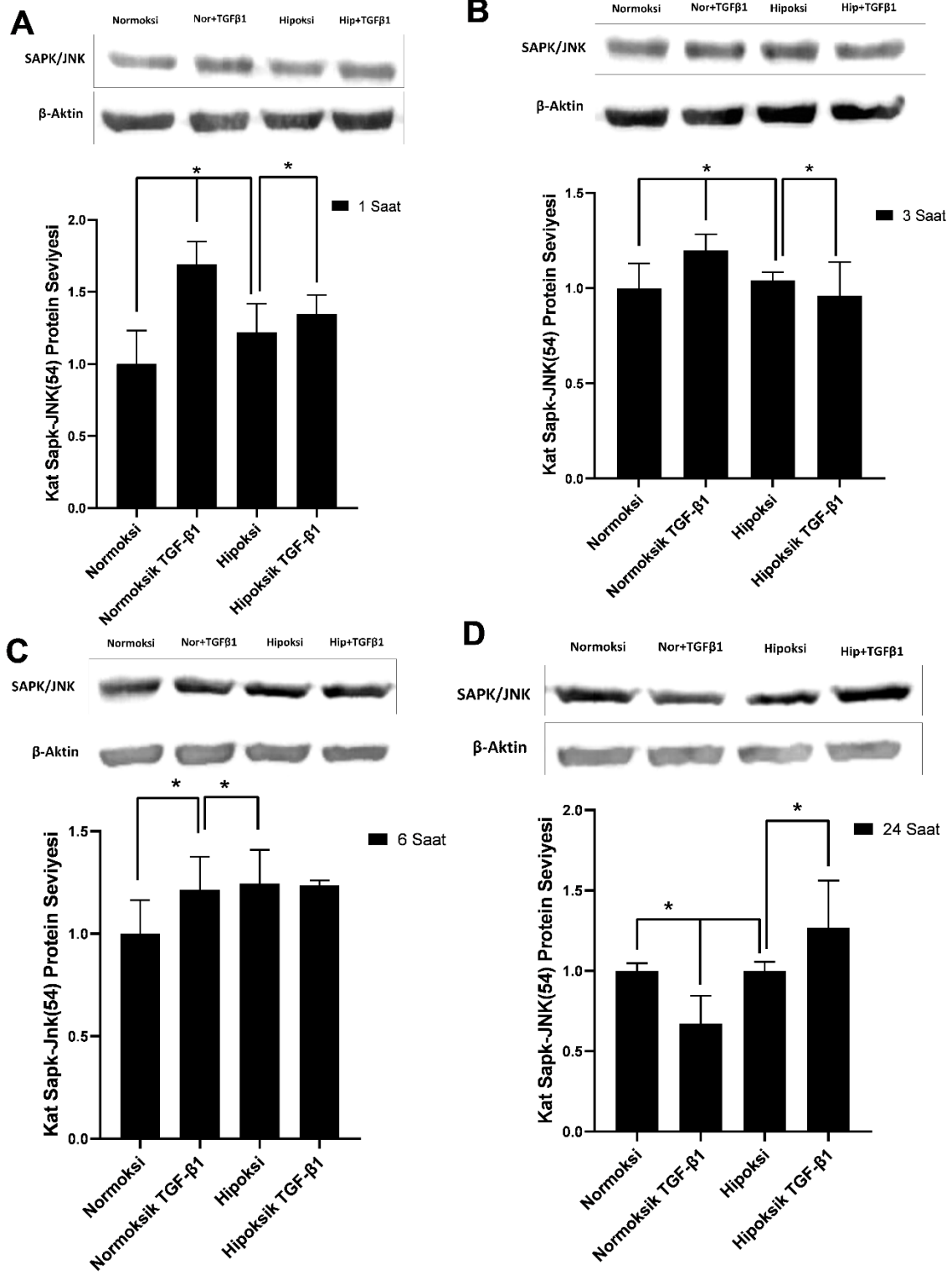
**Şekil 4.31:** (A) PC-3 hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonuçları (B) PC-3 hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonuçları (C) PC-3 hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (D) PC-3 hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları.

Stresle aktive olan protein kinaz/Jun-amino-terminal kinaz SAPK/JNK, UV ve gama radyasyonu, seramidler, inflamatuvar sitokinler ve bazı durumlarda büyüme faktörleri ve agonistleri dahil olmak üzere çeşitli çevresel stresler tarafından güçlü veya tercihen aktive edilir, bu yolda, SAPK/JNK' nın 46 kDa' luk alt biriminin PC-3 hücrelerindeki protein ifadesine bakıldığında, tüm saat dilimlerinde TGF- $\beta$  veya CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda ifadesinin arttığı fakat TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub> 'ün birlikte uygulandığı gruplarda ise azaldığı görülmektedir. Erken saat dilimlerinde ayrı ayrı hem hipoksi hemde TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda aktive olduğu görülmektedir ancak hipoksi+TGF- $\beta$  birlikte uygulandığında ise bu yolun aktif olmadığı tespit edildi (Şekil 4.32). SAPK/JNK' nın 54 kDa' luk alt biriminin PC-3 hücrelerindeki protein ifadesinde ise erken saat dilimlerinde (1 saat, 3 saat ve 6 saat) TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda ifadesi artmaktadır (Şekil 4.33).



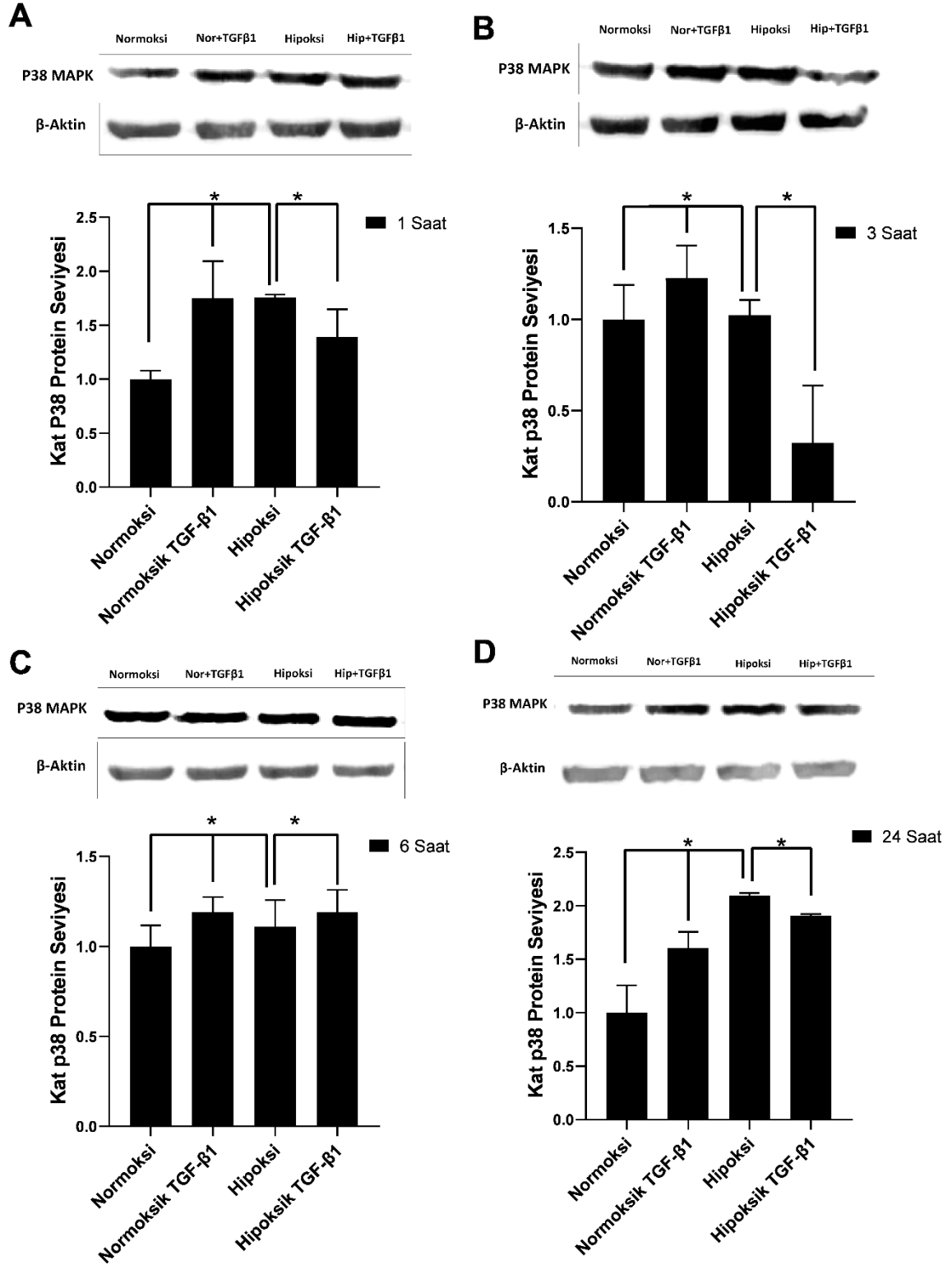
**Şekil 4.32:** (A) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonucu. (B) PC-3 3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonucu. (C) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (D) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu.





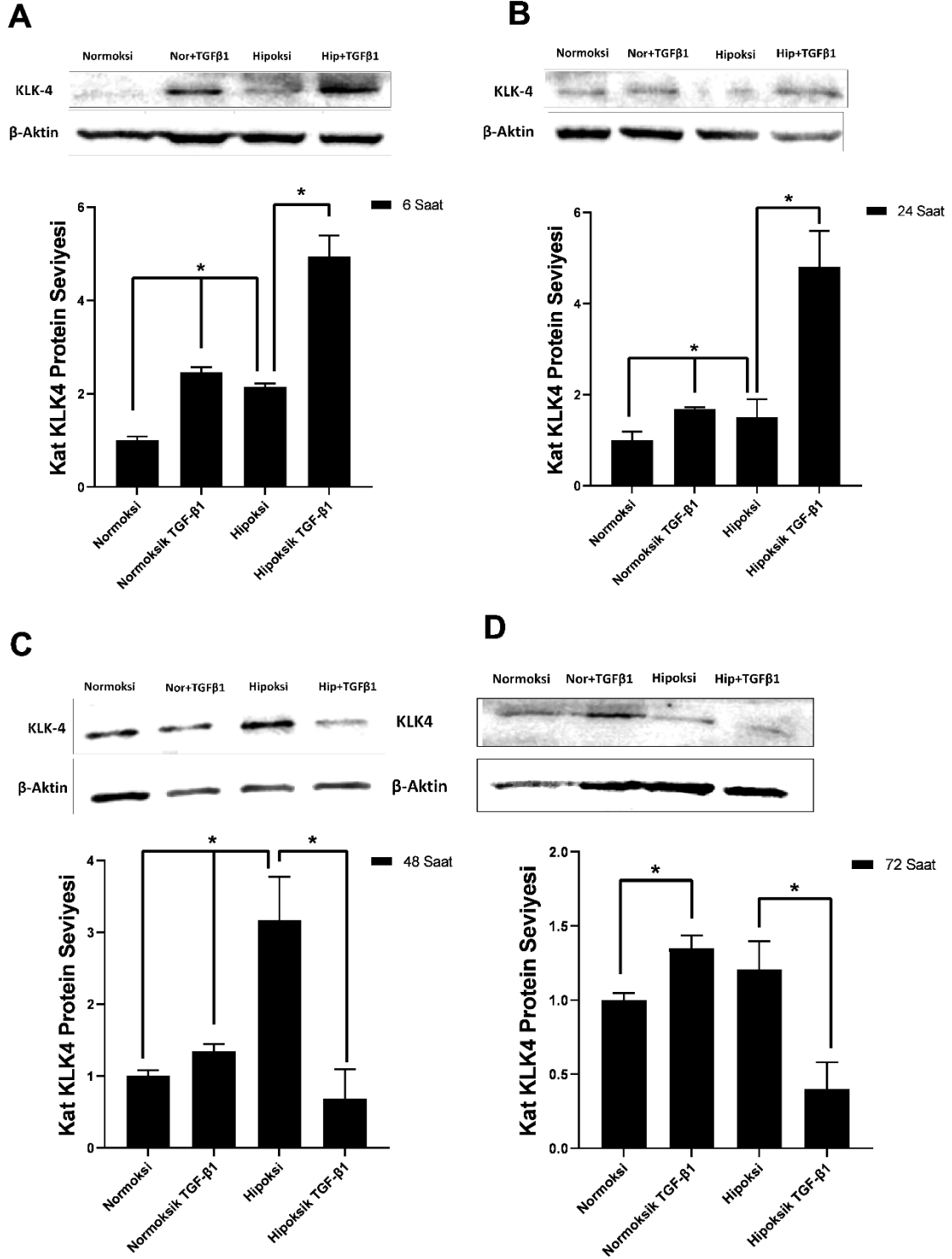
**Şekil 4.33:** (A) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonucu. (B) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonucu. (C) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (D) PC-3 hücre hattında SAPK/JNK 54 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu.

Ozmotik şok, inflamatuvar sitokinler, lipopolisakkarit (LPS), UV ışığı ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli hücrel stresler tarafından aktive edilen p38/MAPK yolunun PC-3 hücrelerinde protein ifadesine bakıldığına, tüm saat dilimlerinde TGF- $\beta$  veya CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda ifadesinin arttığı görülmektedir. Bu artış 6 saat hariç tüm zaman dilimlerinde TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda azalmaya sebep olduğu görülmektedir (Şekil 4.34).

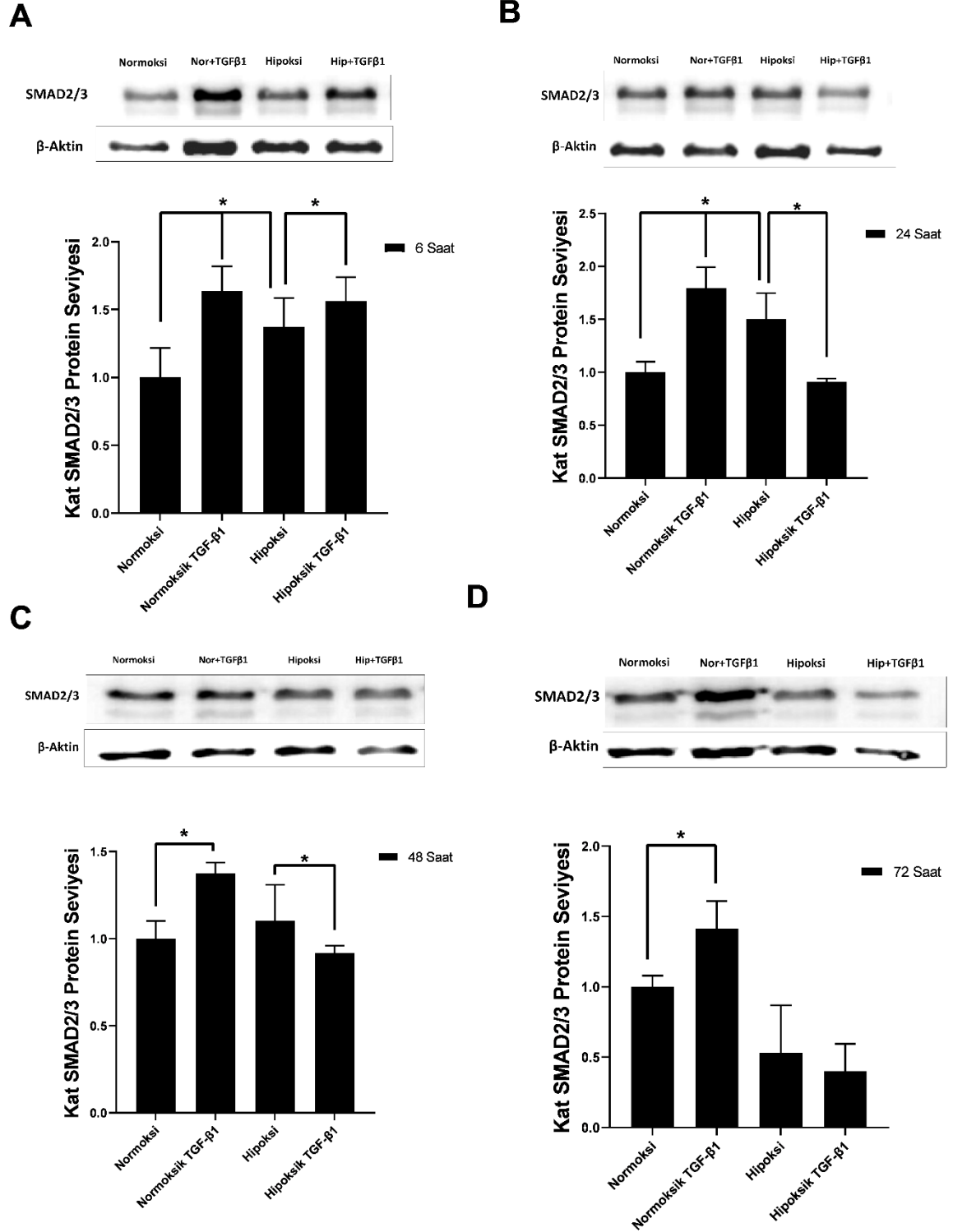


**Şekil 4.34:** (A) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 1 saat sonucu. (B) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 3 saat sonucu. (C) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (E) PC-3 hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu.

LNCaP hücreleriyle yapılan western blot çalışmalarında membranlar SMAD, KLK4 ve  $\beta$ -Aktin antikorumu ile ayrı ayrı muamele edildi. 6 ve 24 saat membranında KLK4 ve SMAD antikorumuyla görüntüleme yapıldıktan sonra membrane strip yapılarak  $\beta$ -Aktin antikoru ile muamele edilip tekrar görüntü alındı. 48 ve 72 saat membranı da aynı antikorumlar ile muamele yapılarak görüntü alındı. LNCaP hücre hattında çalışılan tüm zaman dilimlerinde hipoksik grupta KLK4 protein seviyesinde artış tespit edilmiştir (Şekil 4.35). Ayrıca 6 ve 24 saatte hem normoksik hem de hipoksik TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda da KLK4 protein seviyesi artmıştır (Şekil 4.35 A-B). 48 ve 72 saatlerde ise normoksik TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda KLK4 protein seviyesi artarken hipoksik TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda hipoksik kontrole kıyasla azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.35 C-D). Şekil 4.36' da görüldüğü gibi 6, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda normal koşullara kıyasla TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda SMAD proteinlerinde belirgin bir artış tespit edildi. 24, 48 ve 72 saatte ise 6 saatten farklı olarak hipoksik TGF- $\beta$  uygulanan grupta hipoksik kontrole kıyasla SMAD proteinlerinde azalma tespit edildi. Bu uygulama dışında tüm uygulamalarda SMAD proteinlerinin aktive olduğu tespit edildi. Bu bizim açımızdan TGF- $\beta$  yolunun aktive edildiğini göstermektedir.

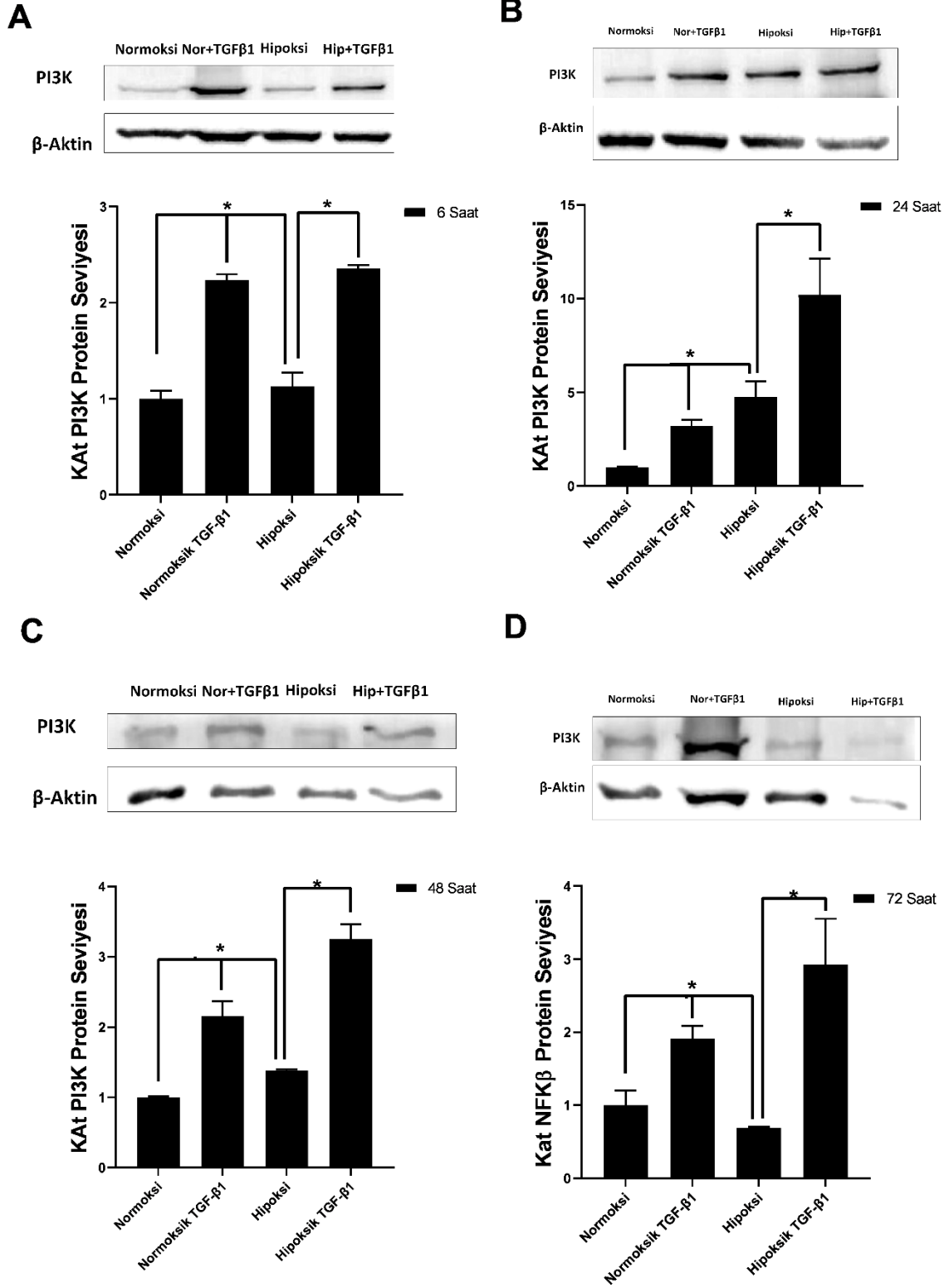


**Şekil 4.35:** (A) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu.. (C) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (E) LNCaP hücre hattında KLK4 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu.



**Şekil 4.36:** (A) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (E) LNCaP hücre hattında SMAD2/3 protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu.

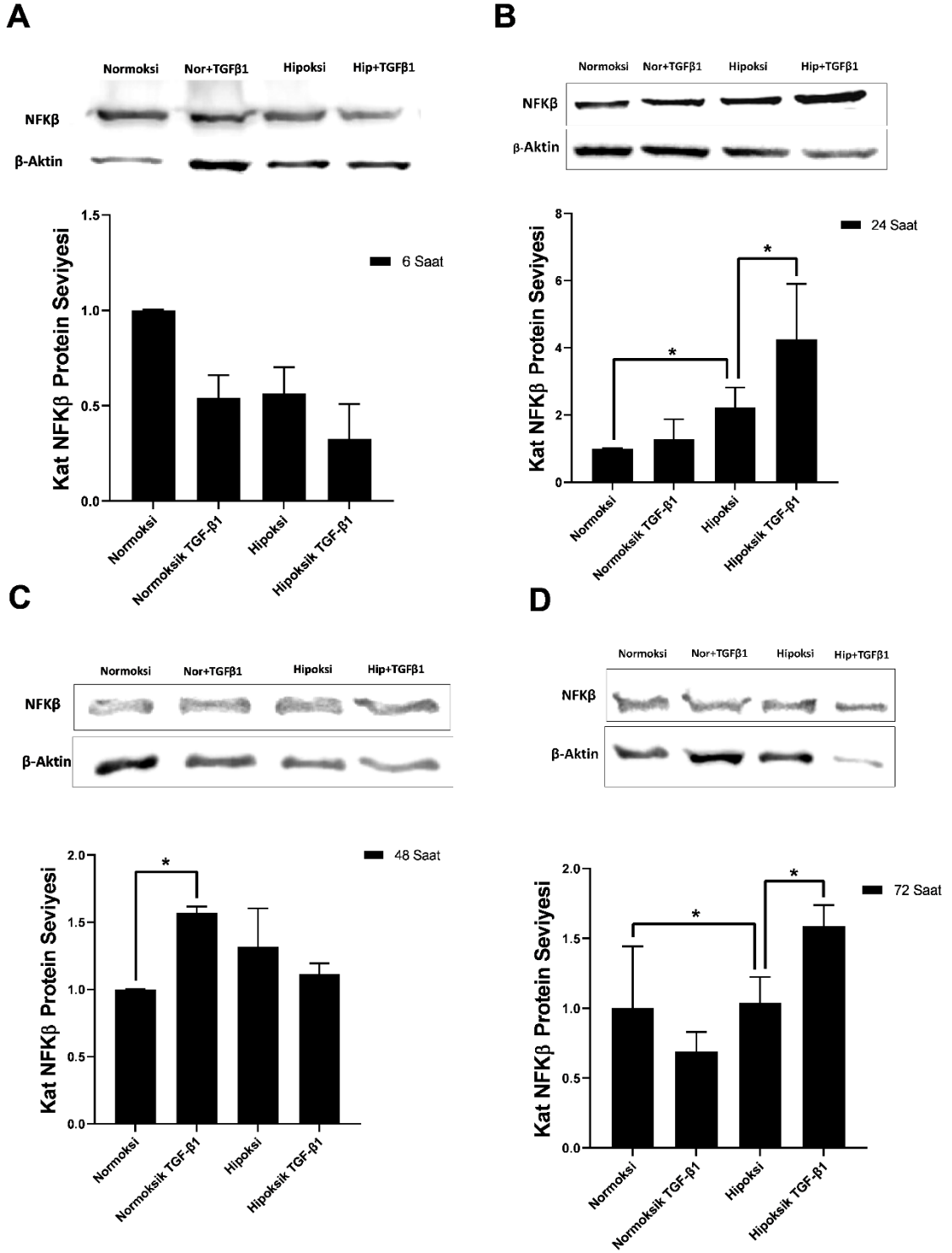
LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesi incelendiğinde şekil 4.37 de görüldüğü gibi 6, 24 ve 48 saat dilimlerinde (Şekil 4.37 A,B,C) TGF- $\beta$  veya CoCl<sub>2</sub> uygulanan gruplarda ifadede artış olduğu ve bu artışın TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub>' ün birlikte uygulandığı gruplarda devam ettiği görülmektedir. Bu durumda TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub>' ün bu yolu aktive ettiklerini göstermektedir. İleri zaman dilimi olan 72 saatte ise PI3K protein ifadesi TGF- $\beta$  uygulanan normoksik grupta arttığı, CoCl<sub>2</sub> uygulanan hipoksik gruplarda azaldığı ve TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub>' ün birlikte uygulandığı gruplarda ise bu ifadenin tekrar arttığı görülmektedir (Şekil 4.37 D).



**Şekil 4.37:** (A) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (B) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları (C) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonuçları (D) LNCaP hücre hattında PI3K protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonuçları.

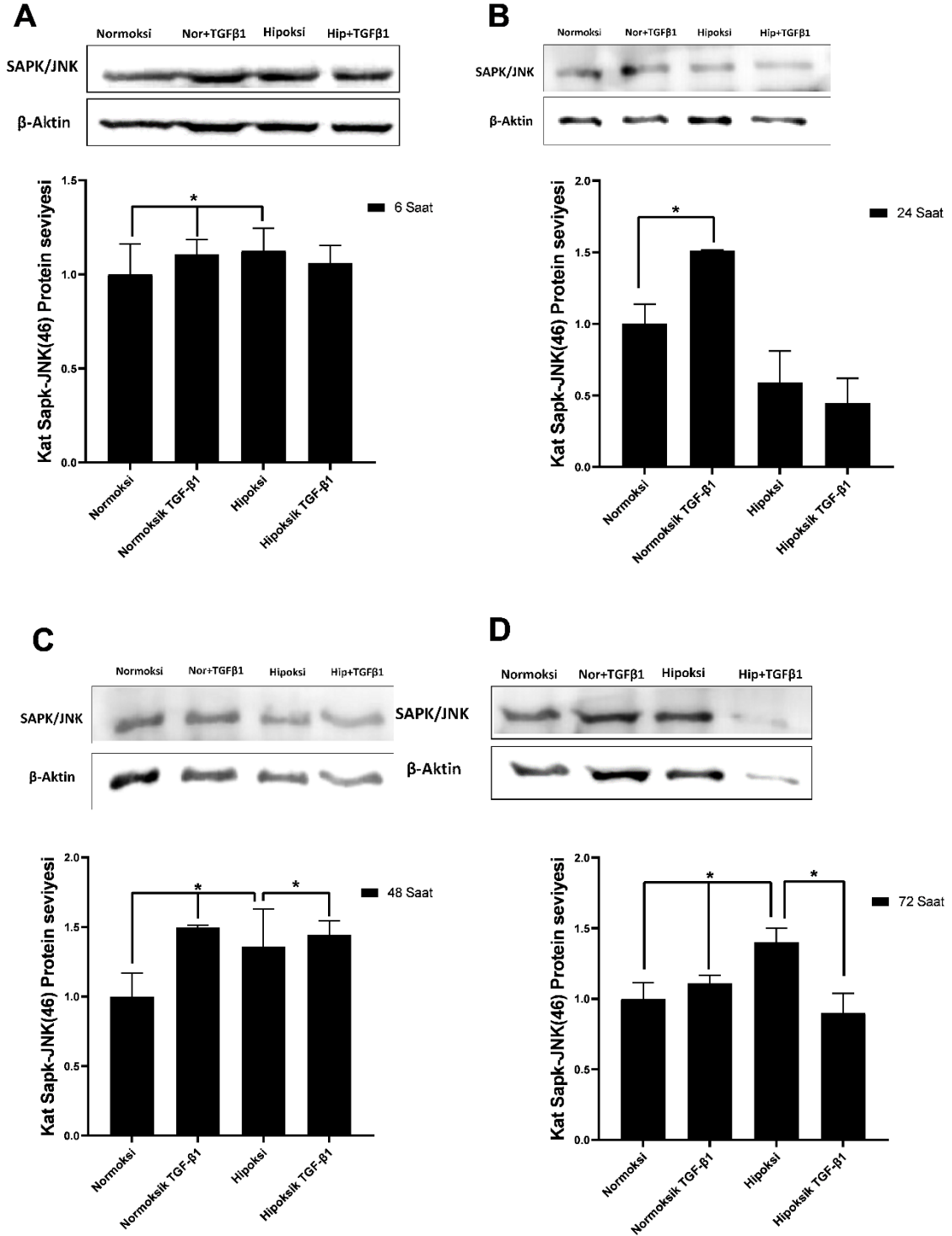


LNCaP hücre hattında NFK $\beta$  protein ifadesi incelendiğinde (Şekil 4.38), 24 ve 72 saatlerde özellikle TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub>' ün birlikte uygulandığı gruplarda bu yolun uyarıldığı görüldü. Yine sadece hipoksi gruplarında 24 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde NFK $\beta$  protein ifadesi artmıştır. Bu yolun hipoksi tarafından uyarıldığı belirlenmiştir.



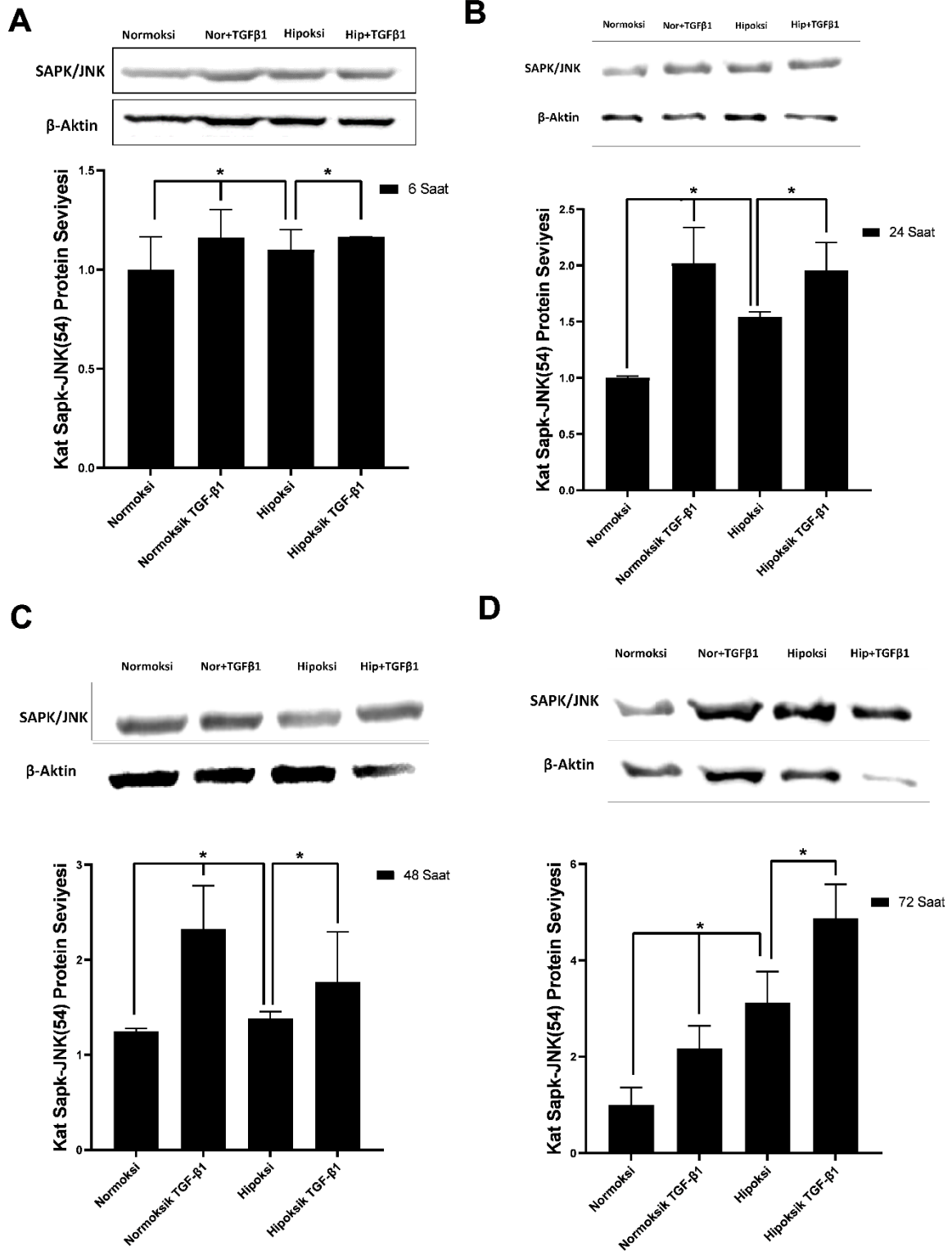
**Şekil 4.38:** (A) LNCaP hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonuçları (B) LNCaP hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonuçları (C) LNCaP hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonuçları (D) LNCaP hücre hattında NFKβ protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonuçları.

SAPK/JNK' nın 46 kDa' luk alt biriminin LNCaP hücrelerindeki protein ifadesine bakıldığında (şekil 4.39), tüm zaman dilimlerinde SAPK/JNK protein ifadesinin normoksik TGF- $\beta$  uygulanan grupların kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmektedir. Özellikle ileri zaman dilimi olan 48 ve 72 saatlerde özellikle hem TGF- $\beta$  hem de hipokside ifadenin arttığı görüldü.



**Şekil 4.39:** (A) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (D) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 46 kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu.

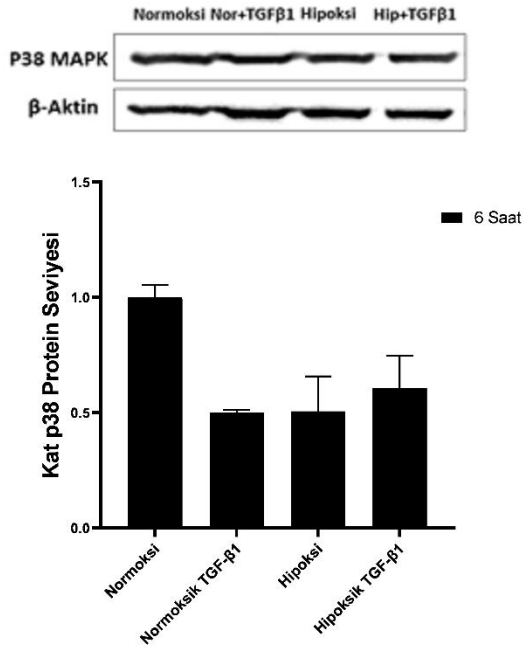
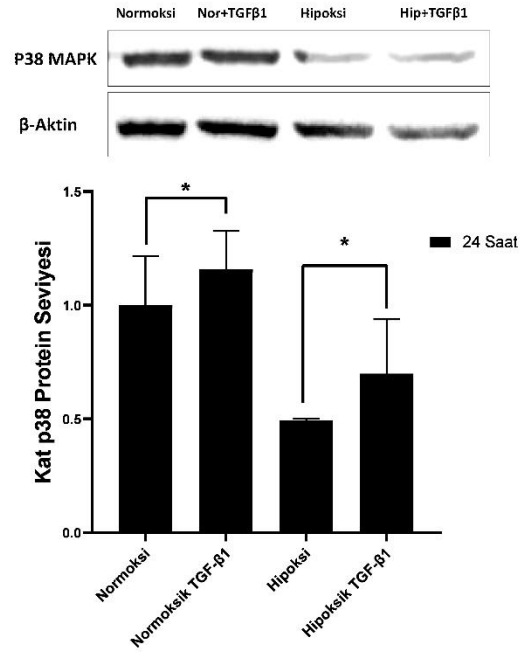
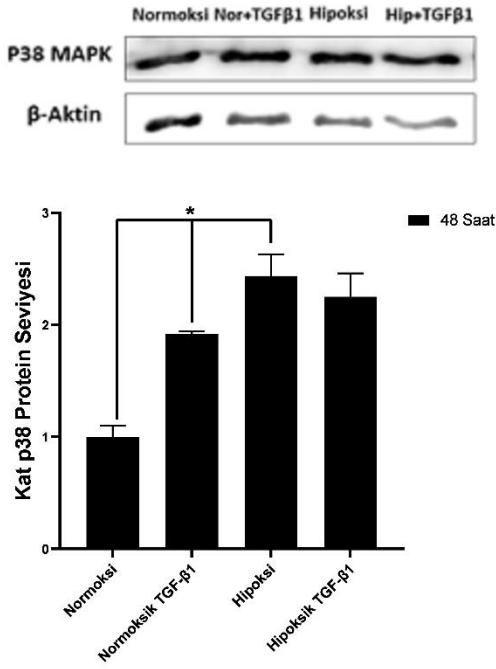
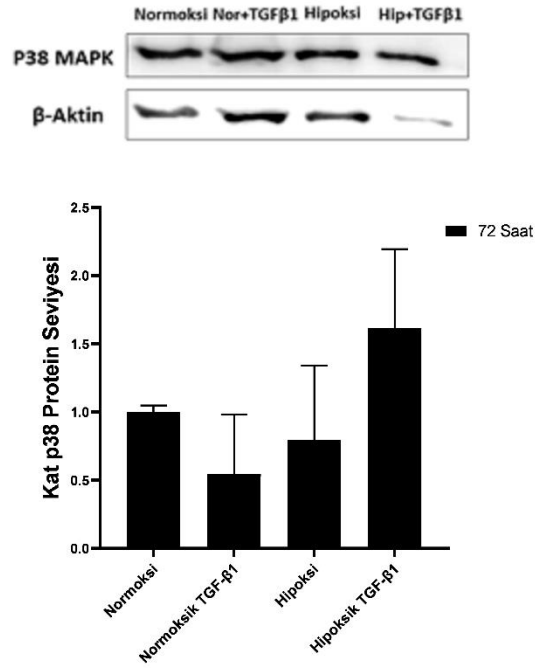
SAPK/JNK' nın 54 kDa' luk alt biriminin LNCaP hücrelerindeki protein ifadesinde (şekil 4.40) tüm saat dilimleri olan 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat de TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub>' ün ayrı ayrı uygulandığı tüm gruplarda bu yolun ifadesinin arttığı, TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub>' ün birlikte uygulandığı tüm gruplarda da yine bu artışın devam ettiği görüldü.



**Şekil 4.40:** (A) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (D)

LNCaP hücre hattında SAPK/JNK 54kDa protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu.

P38/MAPK yolunun LNCaP hücrelerindeki protein ifadesinde ise (Şekil 4.41), 6 saat diliminde ifade de herhangi bir fark gözlenmedi. 24 saat diliminde ve 48 saat zaman dilimlerinde TGF- $\beta$ ' daki ifade artışı görüldü.

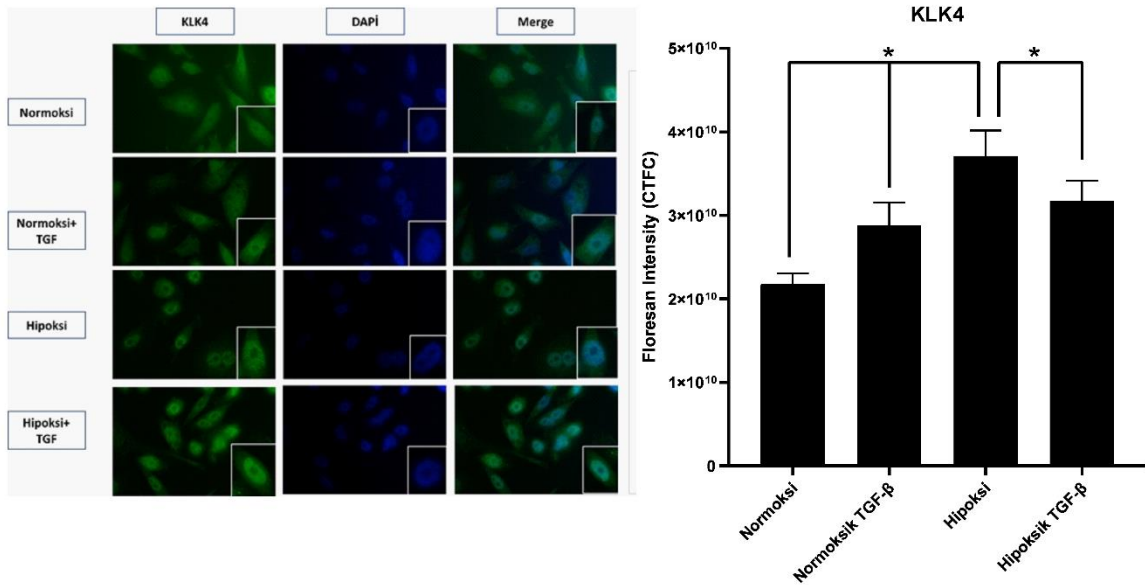
**A****B****C****D**

**Şekil 4.41:** (A) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 6 saat sonucu. (B) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 24 saat sonucu. (C) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 48 saat sonucu. (E) LNCaP hücre hattında p38 MAPK protein ifadesinin western blot ile belirlenmesi 72 saat sonucu.

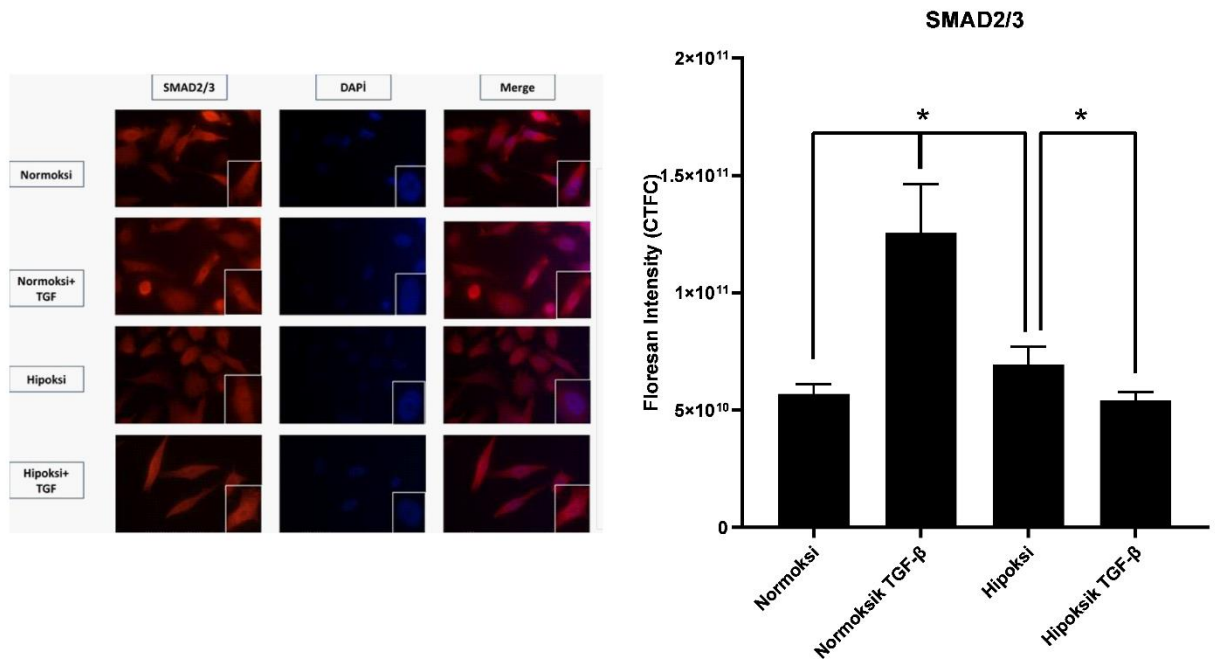


#### 4.4.3 IFC ÇALIŞMALARI

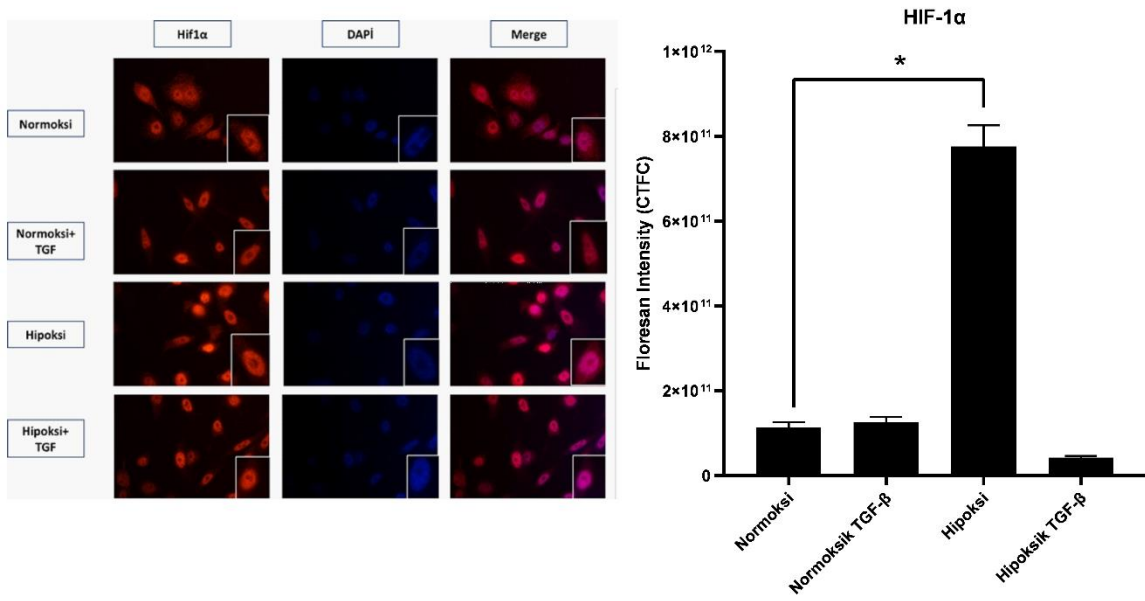
Çalışmamızda PC-3 ve LNCaP hücreleriyle yaptığımız immüno Floresan tekniği ayrıntılı olarak bölüm 3.2.5 de anlatılmıştır. KLK4' ün PC-3 hücrelerinde protein düzeyindeki ifadesine baktığımızda, normoksik TGF- $\beta$  ve hipoksik gruplarda ifadesinin arttığı, hipoksik TGF- $\beta$  da ise bu ifadenin azaldığı görüldü (Şekil 4.42). LNCaP hücrelerinde ise, normoksik TGF- $\beta$ , hipoksi ve hipoksik TGF- $\beta$  da KLK4 protein ifadesinin arttığı görülmektedir (Şekil 4.45). PC-3 ve LNCaP hücrelerinde SMAD ifadesine baktığımızda normoksik TGF- $\beta$  ve hipokside ifade artışı görülürken, hipoksik TGF- $\beta$  da bu ifadenin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.43 ve 4.46). Ayrıca hipoksik şartların oluşturulup oluşturulmadığının belirlenmesi için iki hücre hattında da HIF-1 $\alpha$  protein seviyesine bakıldı. İki hücre hattında da hipoksik şartların oluşturulduğu IFC tekniği ile de belirlendi (Şekil 4.44 ve Şekil 4.47). Böylece KLK4' ün TGF- $\beta$  etkili regülasyonunun özellikle hipoksik şartlar altında up regüle olduğu bunun da SMAD yolağı etkileşimi ile yaptığı belirlendi.



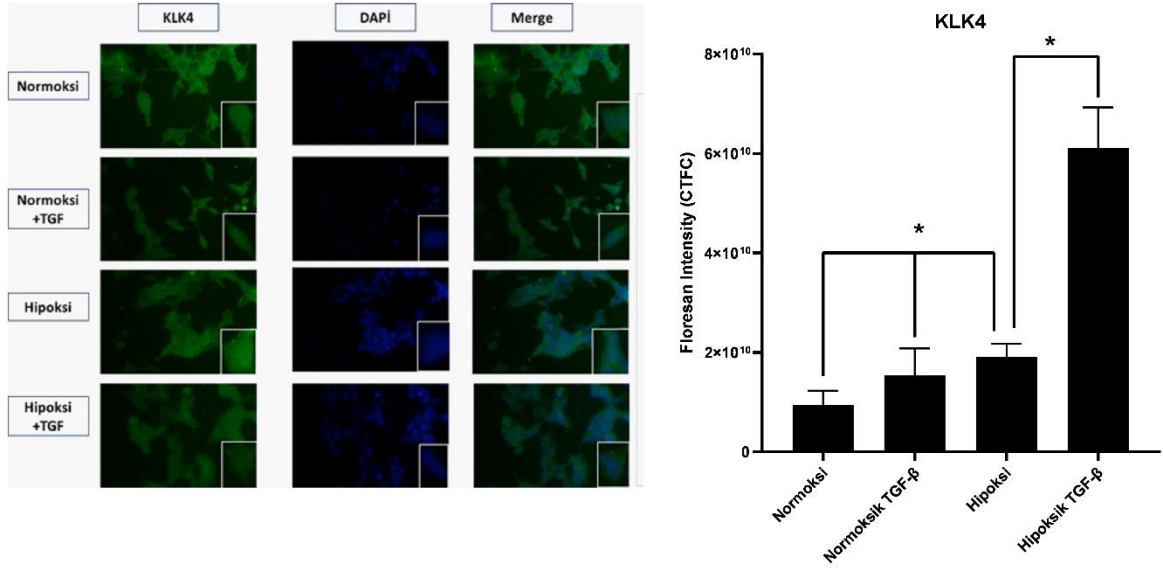
Şekil 4.42: PC-3 Hücre Hattında KLK4 Proteinlerinin TGF- $\beta$  etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü.



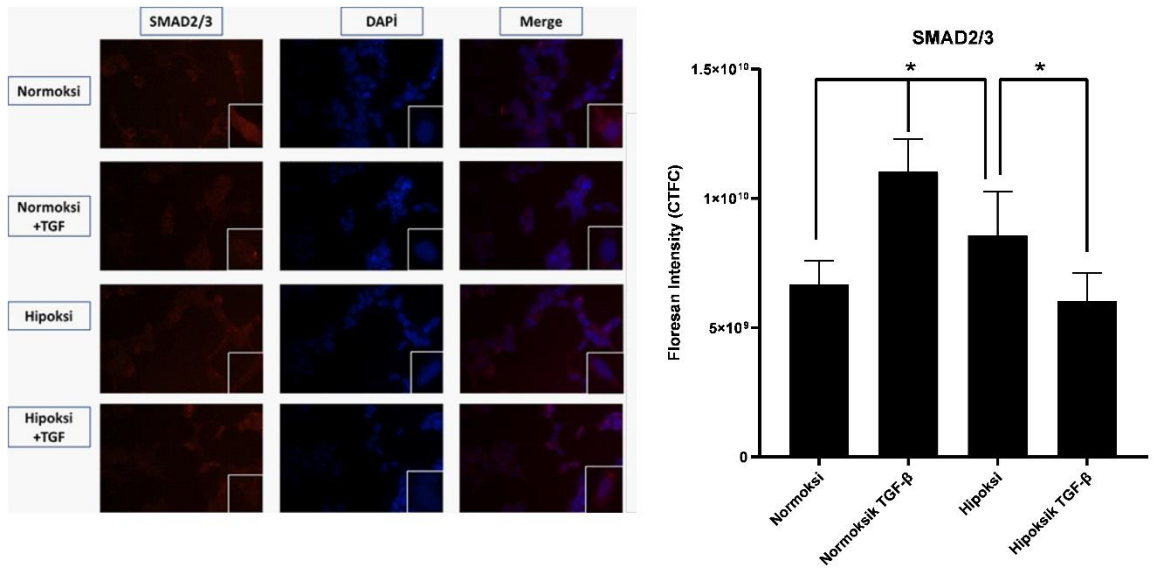
**Şekil 4.43:** PC-3 Hücre Hattında SMAD2/3 Proteinlerinin TGF-β etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü.



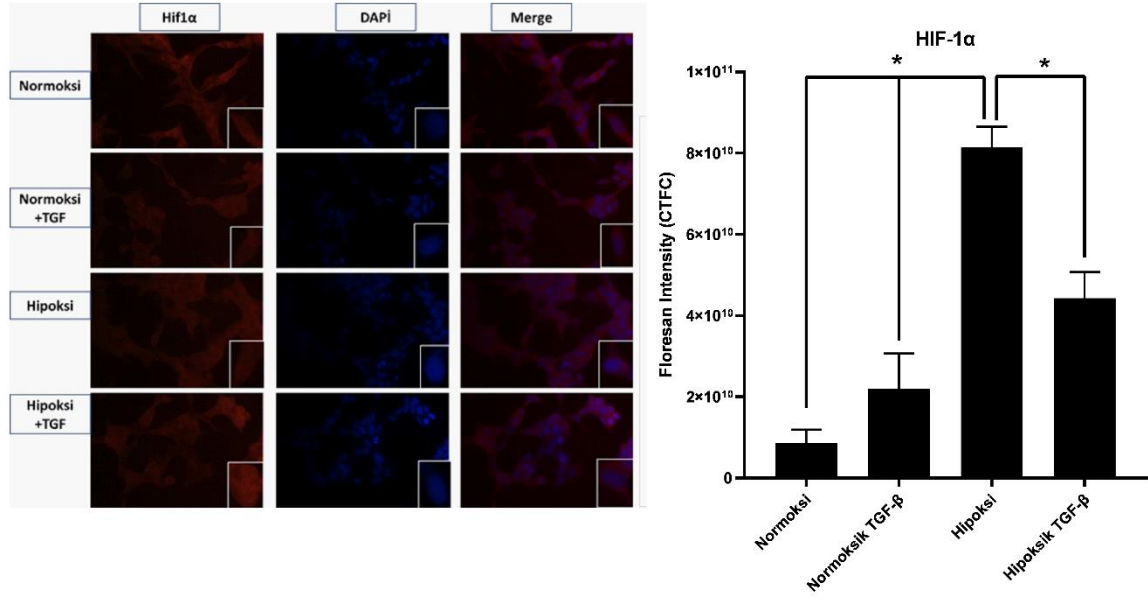
**Şekil 4.44:** PC-3 Hücre Hattında HİF-1α Proteinlerinin TGF-β etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü.



**Şekil 4.45:** LNCaP Hücre Hattında KLK4 Proteinlerinin TGF-β etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü.



**Şekil 4.46:** LNCaP Hücre Hattında SMAD2/3 Proteinlerinin TGF-β etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü.



**Şekil 4.47:** LNCaP Hücre Hattında HIF-1 $\alpha$  Proteinlerinin TGF- $\beta$  etkili hipoksik ve normoksik şartlardaki ifadesinin grafiksel görünümü.

## 4.5 İnhibisyon Çalışmaları

### 4.5.1 RNA ve Protein Eldesi

PC-3 ve LNCaP hücre hatlarından inhibisyon çalışmaları için ayrı ayrı hem normal oksijen koşullarında hem de hipoksik (CoCl<sub>2</sub>) koşullarda deney grupları oluşturuldu. Büyütülen hücreler 6 kuyucuklu plakalara alındı ve bölüm 3.2.13.1.1 de anlatıldığı şekilde sitokin ve inhibitör uygulamaları gerçekleştirildi. 6 saat sonunda alınan pelletlerden RNA ve protein izolasyonları yapıldı.

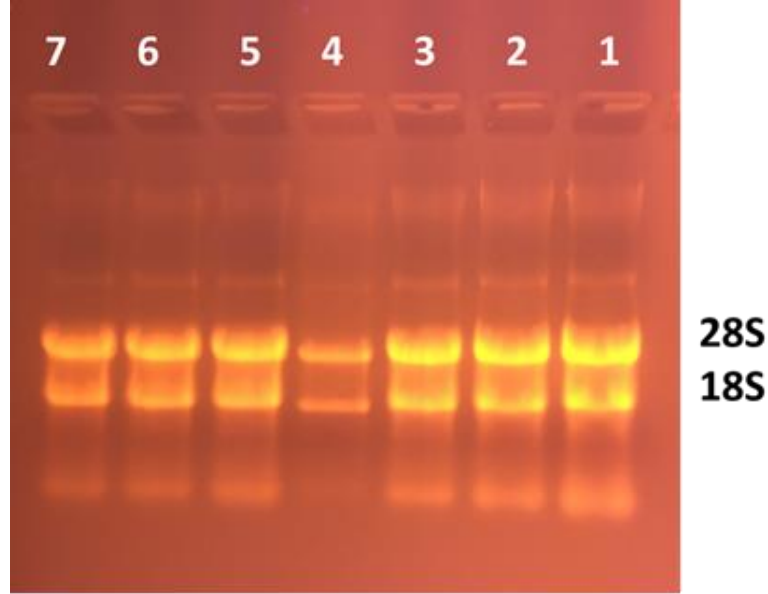
**Tablo 4.8:** Kullanılan inhibitörler ve son konsantrasyonları.

İNHİBİTÖR	SON KONSANTRASYON
SİS3 (Smad2/3 İnhibitörü)	3 $\mu$ M
SP600125 (JNK inhibitörü)	20 $\mu$ M
PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü)	5 $\mu$ M
PD98059 (MEK-1 inhibitörü)	10 $\mu$ M
Wortmannin (PI3K inhibitörü)	1 $\mu$ M

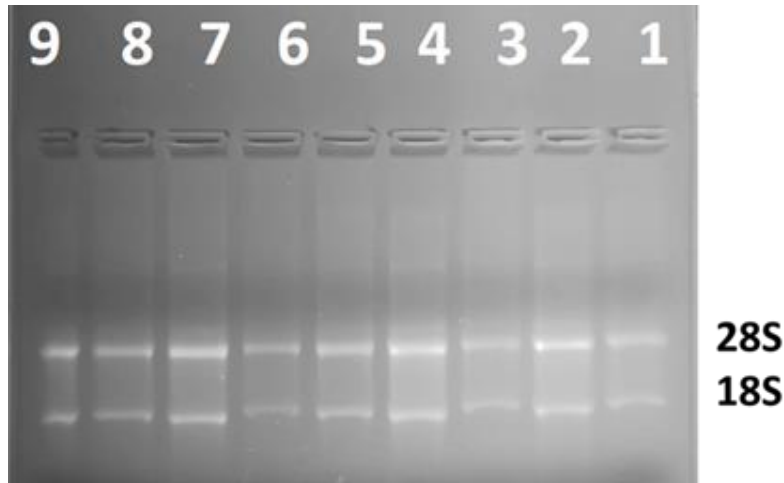
### 4.5.2 İnhibitör Uygulaması Yapılan Gruplardan RNA İzolasyonu

Rutin pasaj ile çoğaltılan PC-3 ve LNCaP hücrelerine sırasıyla 1'er saat arayla 500 Ü/ml TGF- $\beta$ , 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> ayrı ayrı ve 500 Ü/ml (20ng/ml)TGF- $\beta$ , 150  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> beraber

olacak şekilde uygulandı. Bu işlemden sonra 6 saat sonunda pelletler toplandı ve bölüm 3.2.3.3 de anlatıldığı şekilde RNA şolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen RNA' lar, RNA jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüledi (Şekil 4.48-4.51).

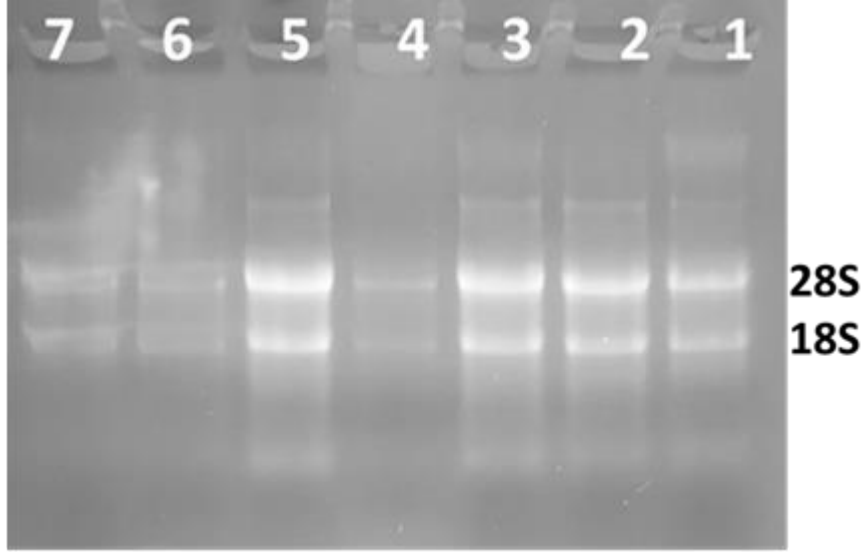


**Şekil 4.48:** PC-3 hücre hattında normal oksijen koşullarında kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü. (1: Kontrol, 2: TGF- $\beta$ , 3: TGF- $\beta$ +SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 4: TGF- $\beta$ +SP600125 (JNK inhibitörü), 5: TGF- $\beta$ +PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 6: TGF- $\beta$ +PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 7: TGF- $\beta$ +Wortmannin (PI3K inhibitörü).

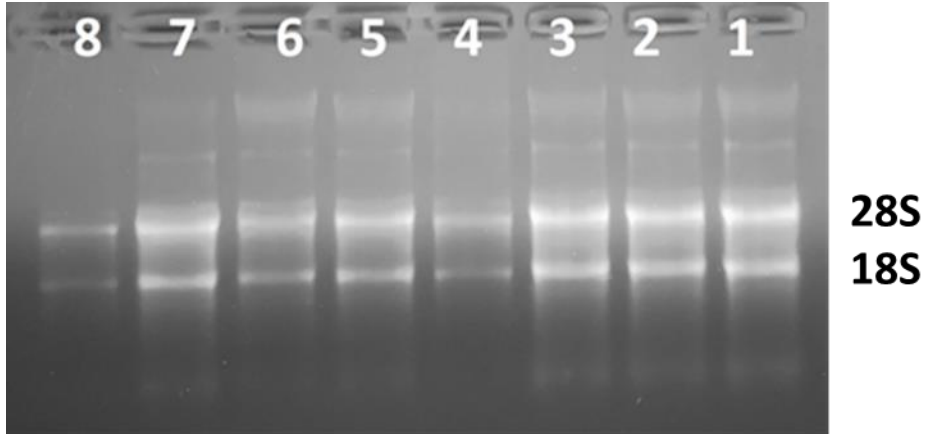


**Şekil 4.49:** PC-3 hücre hattında hipoksik koşullarda kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü. (1: Normoksi Kontrol 2: Hipoksi Kontrol 3: Hipoksi Kontrol 4: Hipoksi+TGF- $\beta$ , 5: Hipoksi+TGF- $\beta$ +SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 6: Hipoksi+TGF- $\beta$ +SP600125 (JNK inhibitörü), 7: Hipoksi+TGF-

$\beta$ +PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 8: Hipoksi+TGF- $\beta$ +PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 9: Hipoksi+TGF- $\beta$ +Wortmannin (PI3K inhibitörü).



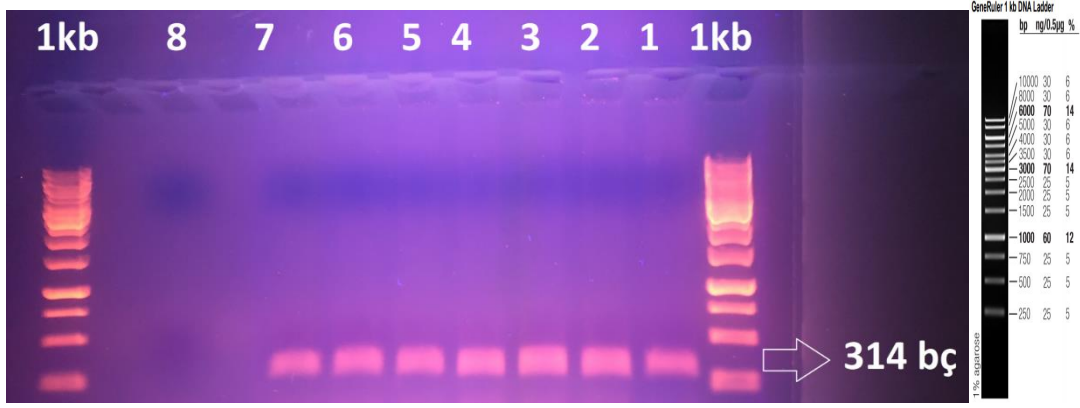
**Şekil 4.50:** LNCaP hücre hattında normal oksijen koşullarında kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü. (1: Kontrol, 2: TGF- $\beta$ , 3: TGF- $\beta$ +SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 4: TGF- $\beta$ +SP600125 (JNK inhibitörü), 5: TGF- $\beta$ +PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 6: TGF- $\beta$ +PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 7: TGF- $\beta$ +Wortmannin (PI3K inhibitörü).



**Şekil 4.51:** LNCaP hücre hattında hipoksik koşullarda kurulan deney grubundan elde edilen pelletlerden izole edilen RNA' ların elektroforez jel görüntüsü. (1: Normoksi Kontrol 2: Hipoksi Kontrol 3: Hipoksi+TGF- $\beta$ , 4: Hipoksi+TGF- $\beta$ +SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 5: Hipoksi+TGF- $\beta$ +SP600125 (JNK inhibitörü), 6: Hipoksi+TGF- $\beta$ +PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 7: Hipoksi+TGF- $\beta$ +PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 8: Hipoksi+TGF- $\beta$ +Wortmannin (PI3K inhibitörü).

### 4.5.3 İnhibitor Çalışmalarında cDNA Eldesi ve Kontrolü

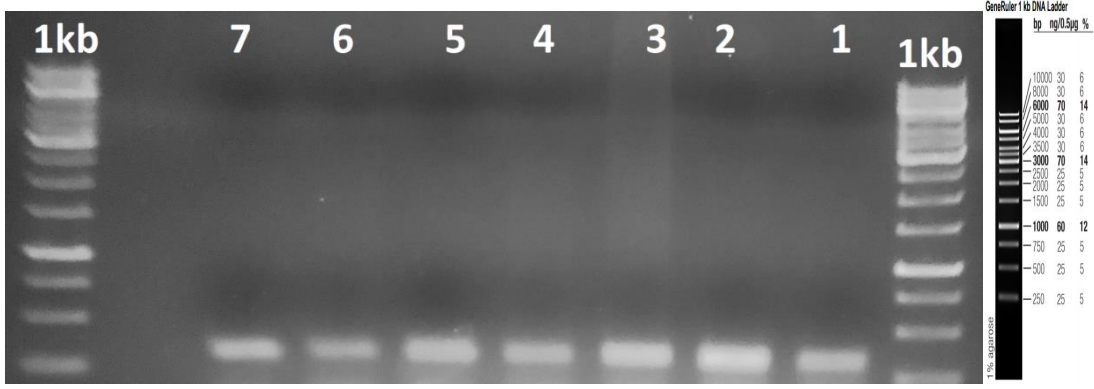
İzole edilen bu RNA'ların spektrofotometre ile RNA miktarı ve saflığı mikrodropda belirlendi. Bölüm 3.2.3.6' da anlatıldığı şekilde cDNA sentezi yapıldı. Tüm gruplardan elde edilen cDNA'ların çalıştığı tespit edildi (Şekil 4.52-55)



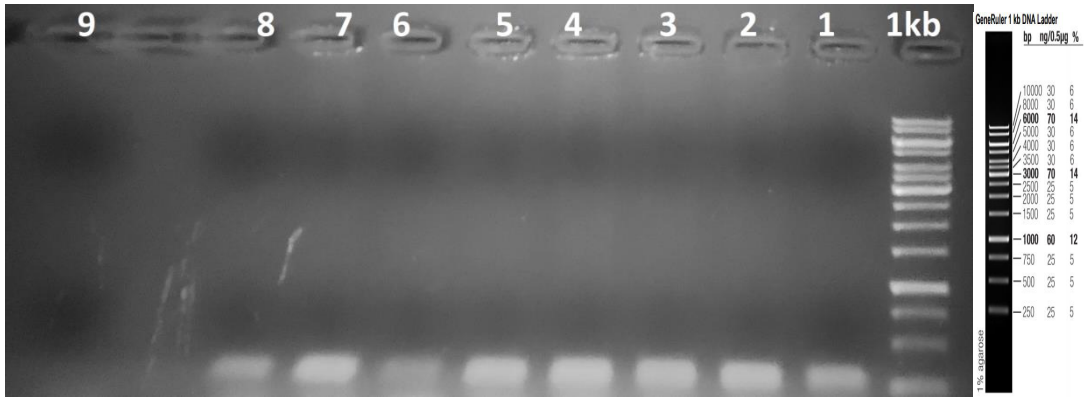
**Şekil 4.52:** PC-3 hücre hattında normal oksijen koşullarından izole edilen RNA'ların kontrolü için hβ2 PZR' ı jel görüntüsü. (1kb: Marker, 1: Kontrol, 2: TGF-β, 3: TGF-β+SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 4: TGF-β+SP600125 (JNK inhibitörü), 5: TGF-β+PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 6: TGF-β+PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 7: TGF-β+Wortmannin (PI3K inhibitörü), 8: Negatif Kontrol.



**Şekil 4.53:** PC-3 hücre hattında hipoksik koşullarda oluşturulan deney grubundan izole edilen RNA'ların kontrolü için hβ2 PZR' ı jel görüntüsü. (1: Normoksi Kontrol 2: Hipoksi Kontrol, 3: Hipoksi+TGF-β+SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 4: Hipoksi+TGF-β+SP600125 (JNK inhibitörü), 5: Hipoksi+TGF-β+PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 6: Hipoksi+TGF-β+PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 7: Hipoksi+TGF-β+Wortmannin (PI3K inhibitörü), 8: Hipoksi+TGF-β, 9: Negatif Kontrol.



**Şekil 4.54:** LNCaP hücre hattında normal oksijen koşullarından izole edilen RNA' ların kontrolü için hβ2 PZR' ı jel görüntüsü. (1kb: Marker, 1: Kontrol, 2: TGF-β, 3: TGF-β+SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 4: TGF-β+SP600125 (JNK inhibitörü), 5: TGF-β+PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 6: TGF-β+PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 7: TGF-β+Wortmannin (PI3K inhibitörü).



**Şekil 4.55:** LNCaP hücre hattında hipoksik koşullarda oluşturulan deney grubundan izole edilen RNA' ların kontrolü için hβ2 PZR' ı jel görüntüsü. (1: Normoksi Kontrol 2: Hipoksi Kontrol 3: Hipoksi+TGF-β, 4: Hipoksi+TGF-β+SİS3 (Smad 2/3 inhibitörü), 5: Hipoksi+TGF-β+SP600125 (JNK inhibitörü), 6: Hipoksi+TGF-β+PD169316 (P38 MAP kinaz inhibitörü), 7: Hipoksi+TGF-β+PD98059 (MEK-1 inhibitörü), 8: Hipoksi+TGF-β+Wortmannin (PI3K inhibitörü). 9: Negatif Kontrol.

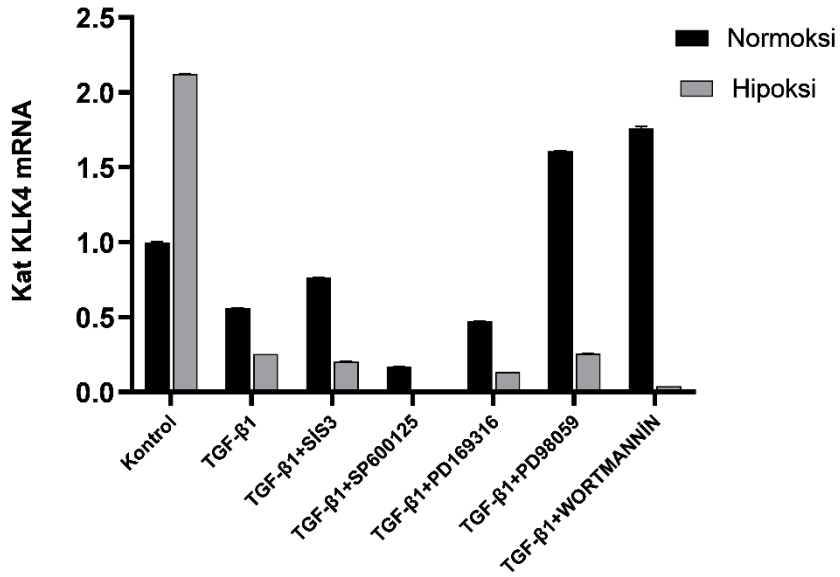
#### 4.5.4 Gerçek Zamanlı PZR

Elde edilen cDNA' ların kontrolünden sonra her deney seti için 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı (Bknz bölüm 3.2.3.8). Hβ2 geninin Ct değerleri ile örneklerin Ct değeri bölüm 3.2.3.8 de belirttiği gibi analiz edildi.

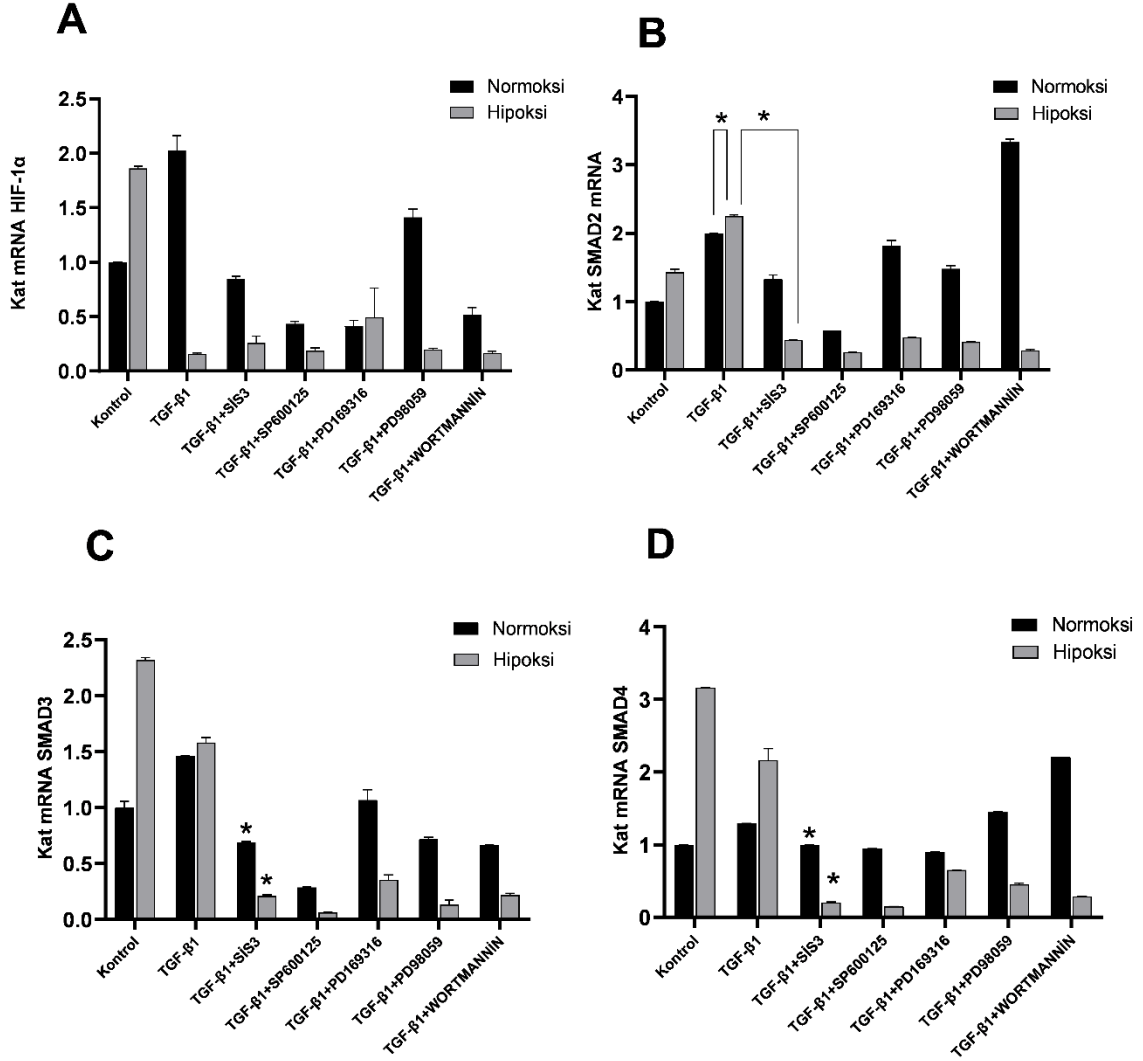
İnhibisyon sonuçları incelendiğinde PC-3 hücre hattında KLK4' ün ifadesinin hipoksik (CoCl<sub>2</sub>) gruplarda ifadesinin 2 kat arttığı TGF-β ve CoCl<sub>2</sub> birlikte uygulanan gruplarda ise



TGF- $\beta$ ' ya bağılı bir azalmanın olduğu görülmektedir (Şekil 4.56) Bu durum sitokin uygulanan gruplardaki mRNA ifadesiyle tutarlıdır ve burada tekrar teyit edilmiştir. SMAD yolunun inhibitörü olan SİS3 ve TGF- $\beta$ ' in birlikte uygulandığı gruplarda ise hem normoksik hemde hipoksik şartlar altında çalışılmıştır. Normoksik koşullarda SMAD yolunda bir inhibisyon görülmezken hipoksik koşullarda SMAD yolunun inhibe olduğu ve dolayısıyla bu yol kapandığında KLK4' ünde ifadesinin azaldığı görülmektedir. Bu da KLK4' ün hipoksik koşullarda TGF- $\beta$  bağımlı SMAD yolu üzerinden ifadesinin düzenlendiğinin göstergesidir. KLK4' ün ifadesi diğer yolak inhibisyonları için incelendiğinde ise, SAPK/JNK yolu inhibitörü olan SP600125 ve TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda hem normoksik hemde hipoksik koşullarda bu yolun inhibe olduğu ve KLK4' ünde ifadesinin azaldığı görülmektedir. P38/MAPK (PD169316), MEK (PD98059) ve PI3K (Wortmannin) yolak inhibitörlerinin uygulandığı gruplarda ise sadece hipoksik koşullarda bu azalmanın olduğu görülmektedir (Şekil 4.56). SMAD2, SAMAD3 ve SMAD4' ün SMAD inhibitörü olan SİS3 uygulanan gruplardaki ifadesine baktığımızda ise hem normoksik hem de hipoksik gruplarda inhibisyonun gerçekleştiği ve buna bağılı olarak SMAD2, SMAD3 ve SMAD4' ün ifadesinin de düştüğü görülmektedir (Şekil 4.57 B,C,D)



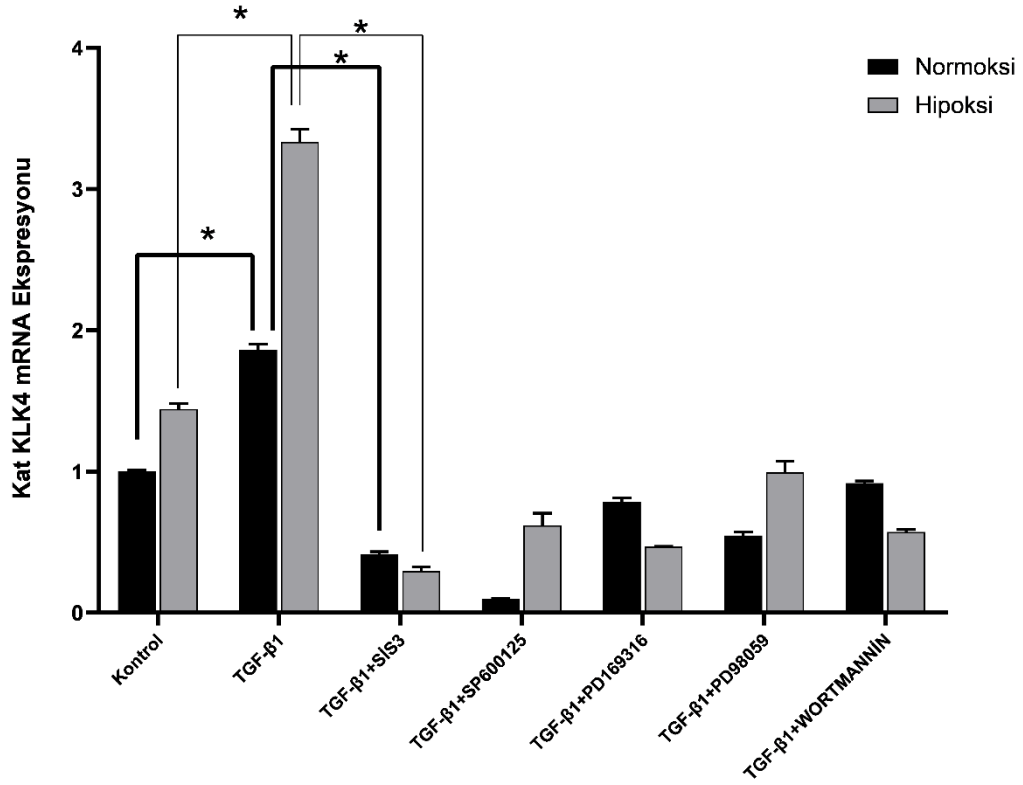
Şekil 4.56: PC-3 hücre hattında yolak inhibitörlerinin KLK4 mRNA seviyesine etkisi.



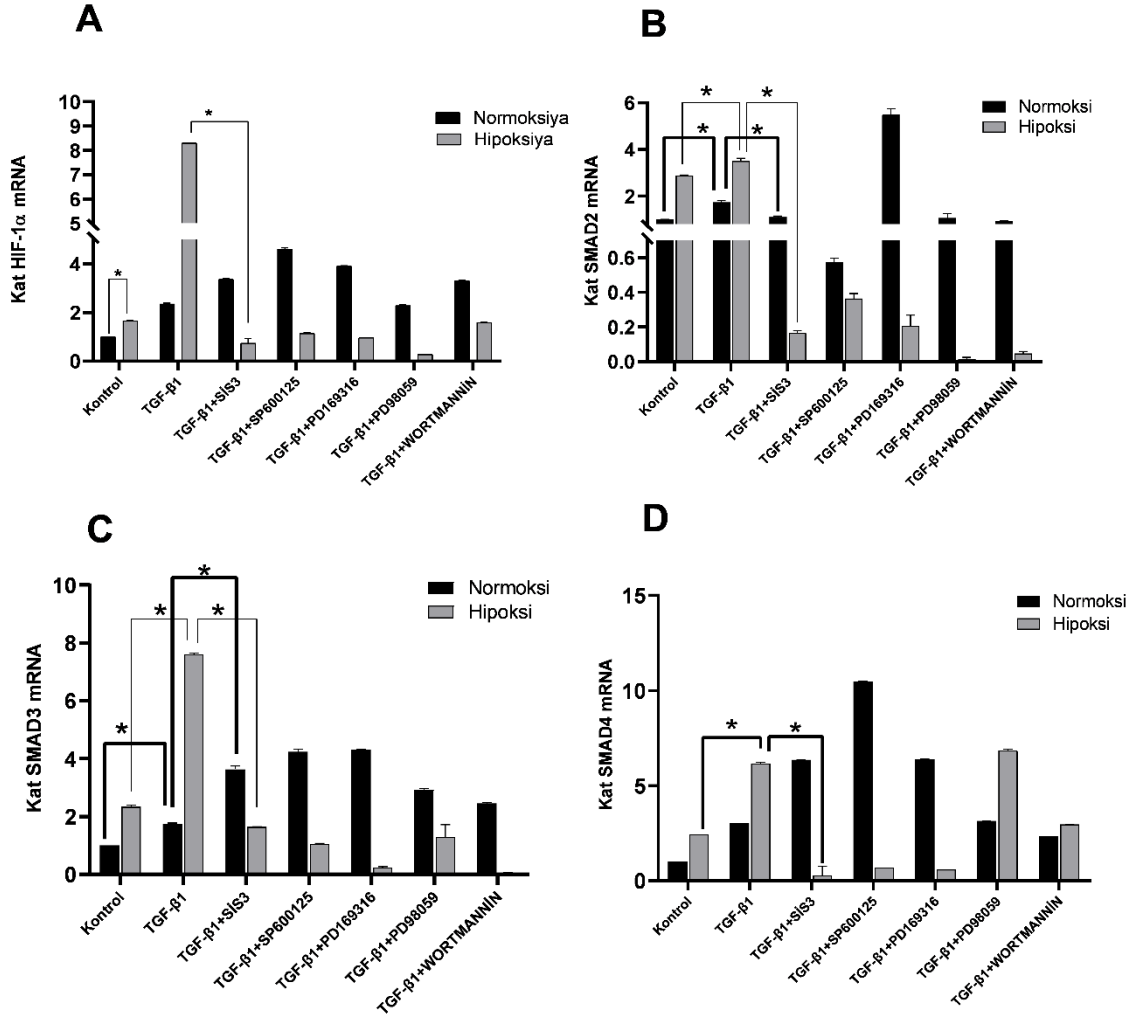
**Şekil 4.57:** (A) PC-3 hücre hattında tüm gruplarda HIF-1 $\alpha$  mRNA ifadesinin Real Time PZR ile analizi (B) PC-3 hücre hattında yolak inhibitörlerinin SMAD2 mRNA seviyesine etkisi (C) PC-3 Hücre Hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Real Time PZR ile analizi (D) PC-3 Hücre Hattında SMAD4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi.

LNCaP hücre hattında yapılan inhibisyon mRNA analizleri incelendiğinde, KLK4' ün ifadesinin hipoksik (CoCl<sub>2</sub>) koşullarda arttığı ayrıca hem normoksik hemde hipoksik şartlarda uygulanan TGF- $\beta$  sitokinine cevabı olduğu görülmektedir (Şekil 4.58). Özellikle hipoksik TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda hipoksik grup ile karşılaştırıldığında 2 katlık bir artış görülmektedir. SMAD inhibitörü olan SİS3 uygulanan gruplarda KLK4' ün ifadesine bakıldığında, hem normoksik hemde hipoksik koşullarda bu yol inhibe edildiğinde KLK4' ünde SMAD yolu ile birlikte ifadesi düşmüştür. Bu da yine KLK4' ün ifadesinin SMAD yolu ile düzenlendiğinin teyidi olmuştur. SMAD bağımsız yollar olan SAPK/JNK, MEK, P38/MAPK ve PI3K sinyal iletim yollarında KLK4 mRNA ifadesinin hem

normoksik hemde hipoksik TGF- $\beta$  gruplarında azaldığı görülmektedir (Şekil 4.58). SMAD yolu inhibe edildiğinde SMAD2' nin ifadesinin hem normoksik TGF- $\beta$  da hemde hipoksik TGF- $\beta$  da azaldığı, SMAD3 ve SMAD4' ün ise sadece hipoksik olan TGF- $\beta$  da ifadesinin azaldığı görülmektedir. Buda TGF- $\beta$ ' nın SMAD yolu ile ifadesinin, hipoksi üzerinden düzenlendiğini göstermektedir. (Şekil 4.59 B,C,D).



**Şekil 4.58:** LNCaP hücre hattında yolak inhibitörlerinin KLK4 mRNA seviyesine etkisi.



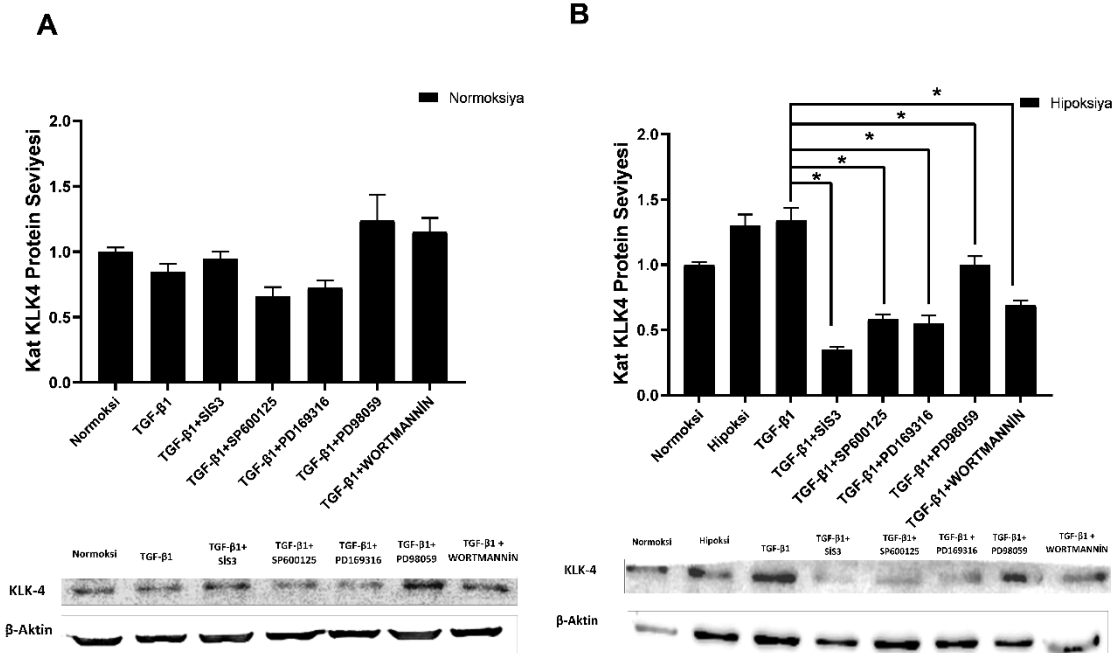
**Şekil 4.59:** (A): LNCaP Hücre Hattında tüm gruplarda HIF-1 $\alpha$  mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. (B): LNCaP hücre hattında yolak inhibitörlerinin SMAD2 mRNA seviyesine etkisi. (C): LNCaP Hücre Hattında SMAD3 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi. (D): LNCaP Hücre Hattında SMAD4 mRNA ifadesinin Gerçek Zamanlı PZR ile analizi.

#### 4.5.5 İnhibisyon Çalışmalarında Western Blot ile Proteinlerin Belirlenmesi

PC-3 ve LNCaP hücrelerine TGF- $\beta$  ve CoCl<sub>2</sub> uygulamaları sonucu hücrelerden 6 saat bitiminde yapılan protein izolasyonu sonunda, örnekler SDS jellere yüklendi ve jelde yürütüldü. Bu işlem sonunda jeller PVDF membranlara aktarılmak üzere transfere alınarak 1 gece +4 °C de transfere bırakıldı. Transfer sisteminden alınan membranlar sırasıyla bloklama ve yıkama işlemleri yapıldı. Membranlar KLK4 primer antikoruyla (1 $\mu$ g) 1 gece, SMAD2/3 antikorunu (1/500) ile 1-1,5 saat, PI3K, NFK $\beta$ , SAPK/JNK ve P38 MAPK (1/1000) antikorları ile ise 1 gece muamele edildikten sonra, 5 dakikalık sürelerle 3 kez tekrar yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra sekonder antikorla

(1/5000) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Fusion FX VILBER LOURMAT cihazında sonuçlar görüntülendi.

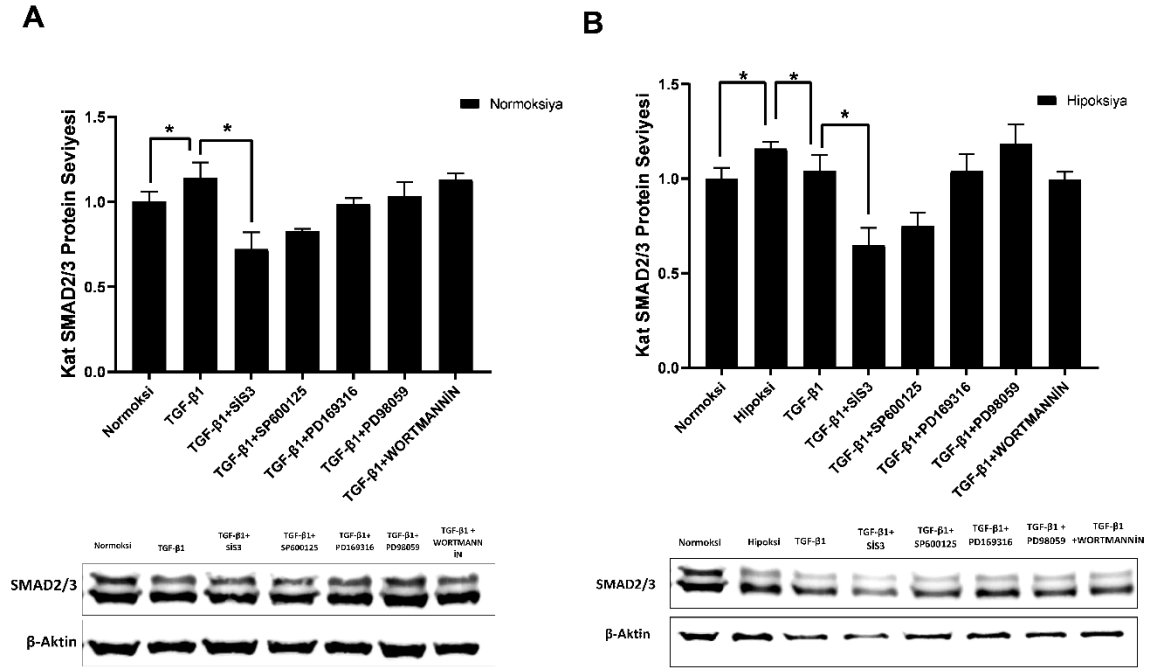
PC-3 hücrelerinde yapılan inhibisyon çalışmalarında KLK4' ün protein ifadesine baktığımızda, hipoksiyada ifadesinin arttığı, normoksik TGF- $\beta$  da ise ifadesinin azaldığı görülmektedir. TGF- $\beta$  daki bu azalma hipoksik koşulları baskıladığı için hipoksik TGF- $\beta$  da dolayısıyla belirgin olmayan bir artış gözlenmiştir. Ayrıca sitokin uygulan gruplarda verilen PC-3 6 saat protein sonuçlarıyla korelidir. Burada tekrar teyit edilmiştir. SMAD inhibitörü uygulanan gruplar incelendiğinde, normoksik TGF- $\beta$  da herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Hipoksik gruplarda ise SMAD inhibitörü olan SİS3 uygulaması sonucu hipoksik TGF- $\beta$  da inhibisyonun gerçekleştiği ve buna bağlı olarak KLK4 protein ifadesinde azalma görülmektedir. Diğer yolak inhibitörü uygulanan gruplarda ise hipoksik koşullarda KLK4' ün ifadesi incelendiğinde ise tüm gruplarda KLK4' ün ifadesinde azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.60).



**Şekil 4.60:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin KLK4 protein seviyesine etkisi.

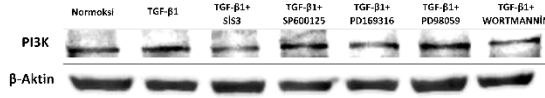
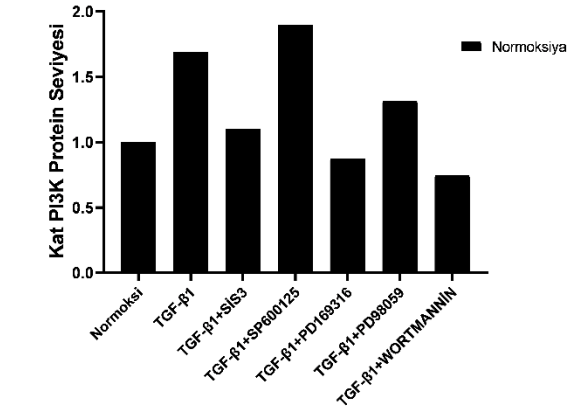
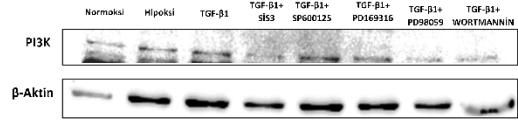
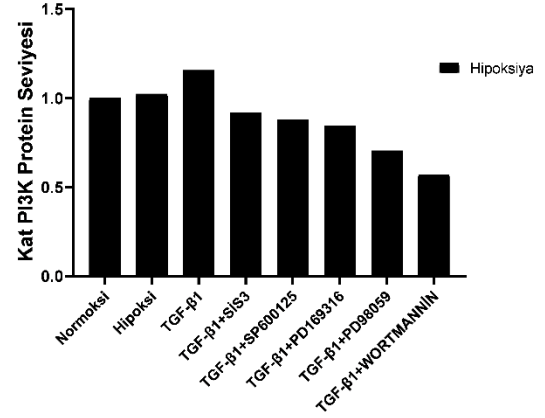
PC-3 hücrelerinde yapılan inhibisyon çalışmalarında SMAD2/3' ün protein ifadesine baktığımızda ise normoksik koşullarda yine daha önceki sonuçlarımızla korele olarak TGF- $\beta$  uygulanan gruplarda artış olduğu ve hipoksiyada normoksiye oranla bir artmanın

olduğu görülmektedir. Yine diğer sonuçlarımızla tutarlı olarak hipoksik TGF- $\beta$  da bu ifadenin azaldığı görülmektedir. SMAD inhibitörü uygulanan gruplara baktığımızda ise hem normoksik hemde hipoksik gruplarda bu ifadenin azaldığı görüldü (Şekil 4.61).

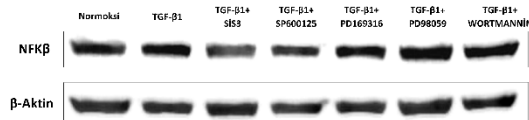
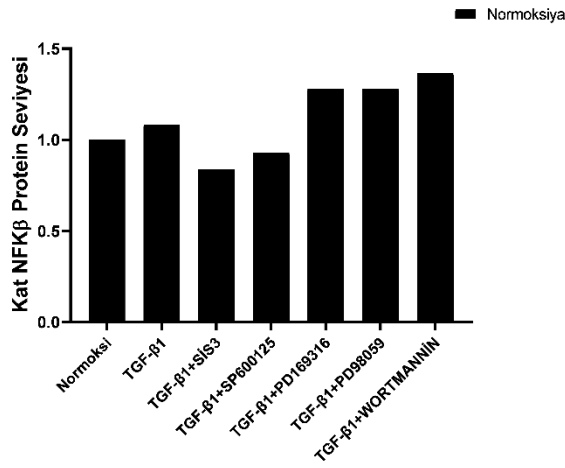
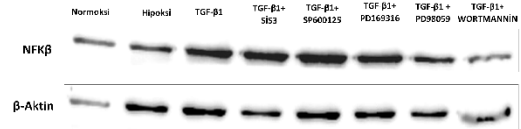
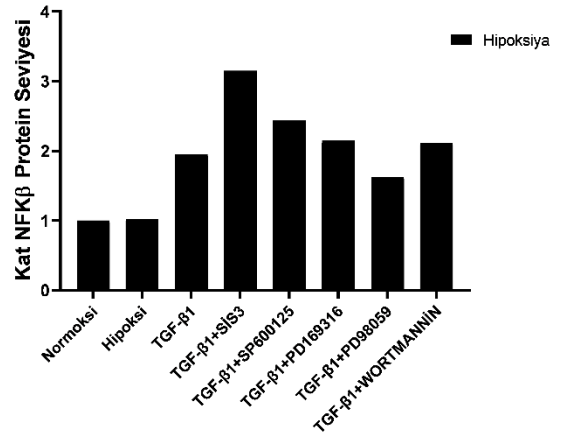


**Şekil 4.61:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SMAD2/3 protein seviyesine etkisi.

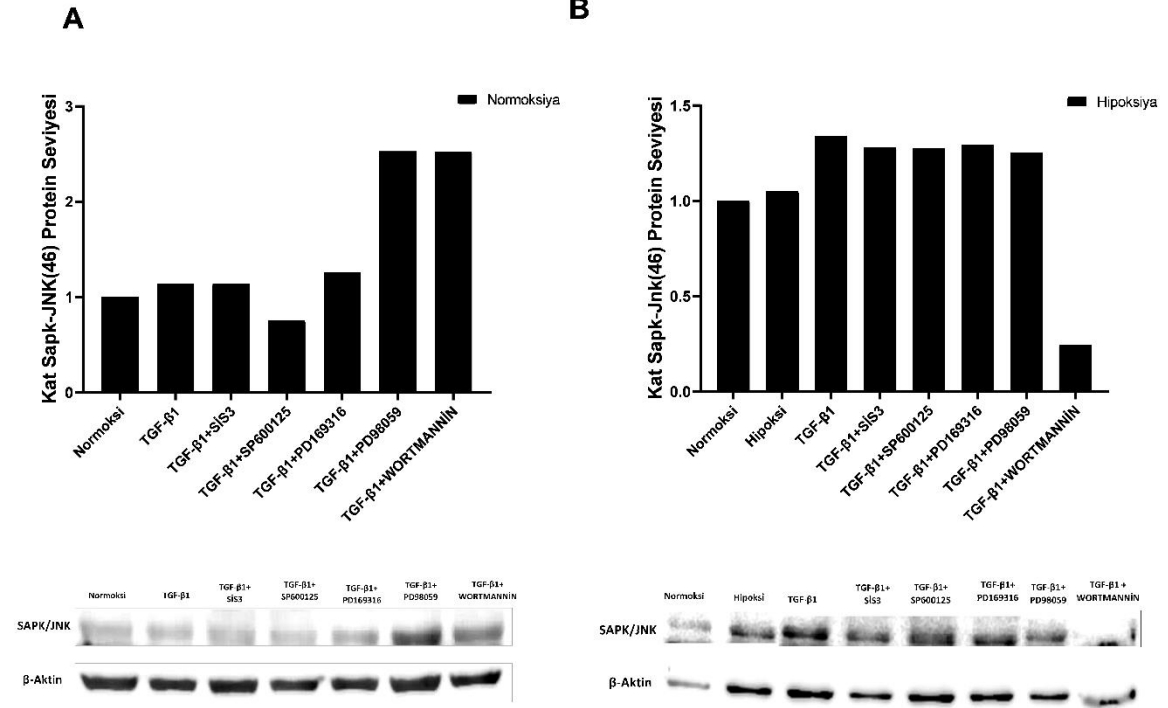
PC-3 hücrelerinde yapılan inhibisyon çalışmalarında SMAD bağımsız yolların protein ifadesi incelendiğinde, PI3K protein ifadesinin hem normoksik hemde hipoksik TGF- $\beta$  gruplarında inhibe olduğu ve ifadesinin de azaldığı görülmektedir (Şekil 4.62). SAPK/JNK 46 kDa ve SAPK/JNK 54kDa alt birimlerinin protein seviyesine baktığımızda, sadece normoksik grupta inhibisyonunun gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.64, Şekil4.65).

**A****B**

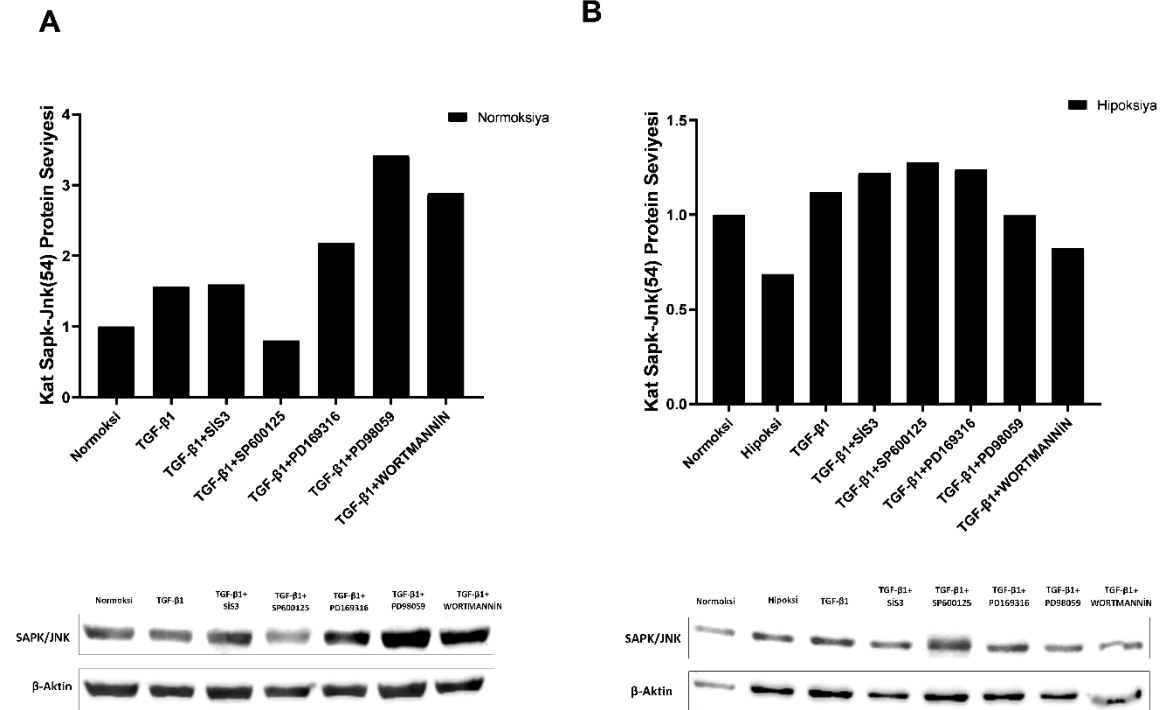
**Şekil 4.62:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin PI3K protein seviyesine etkisi.

**A****B**

**Şekil 4.63:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin NFKβ protein seviyesine etkisi.

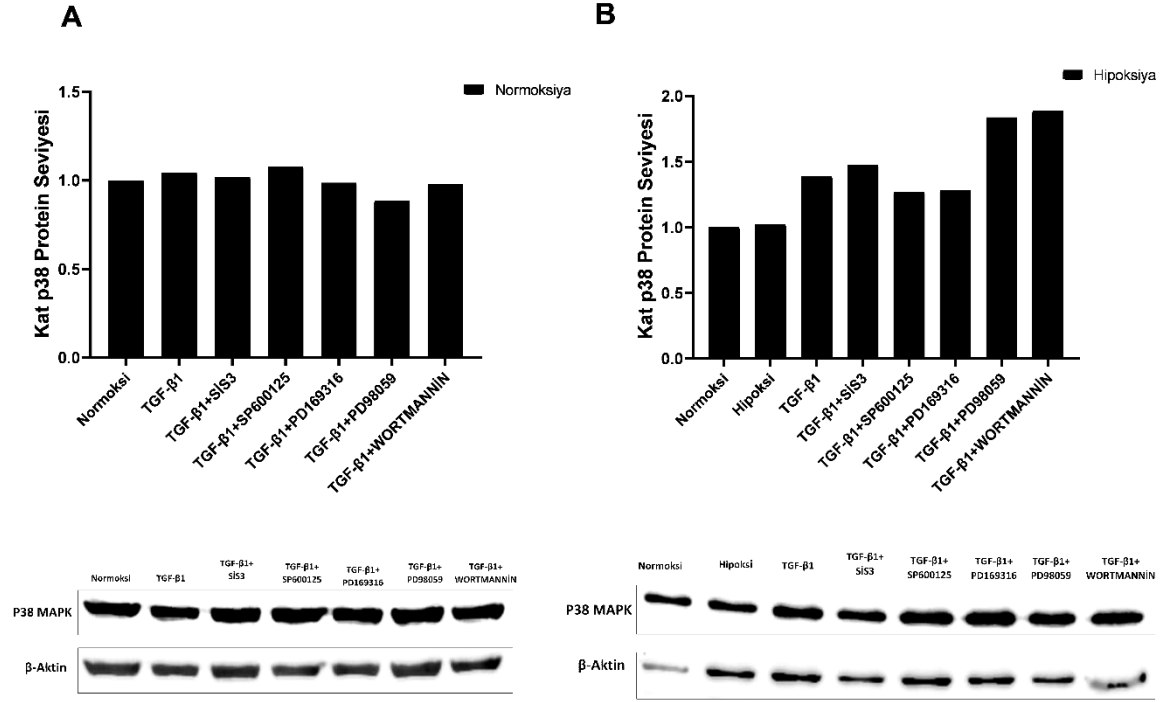


**Şekil 4.64:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 46 kDa protein seviyesine etkisi.



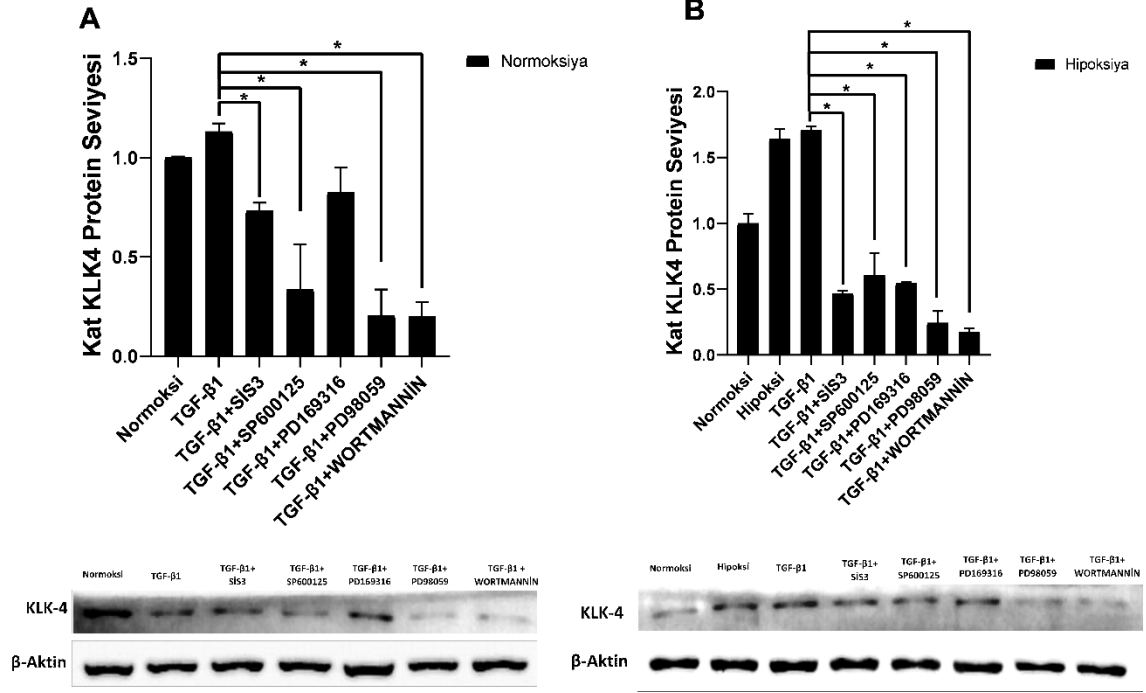
**Şekil 4.65:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 54 kDa protein seviyesine etkisi.





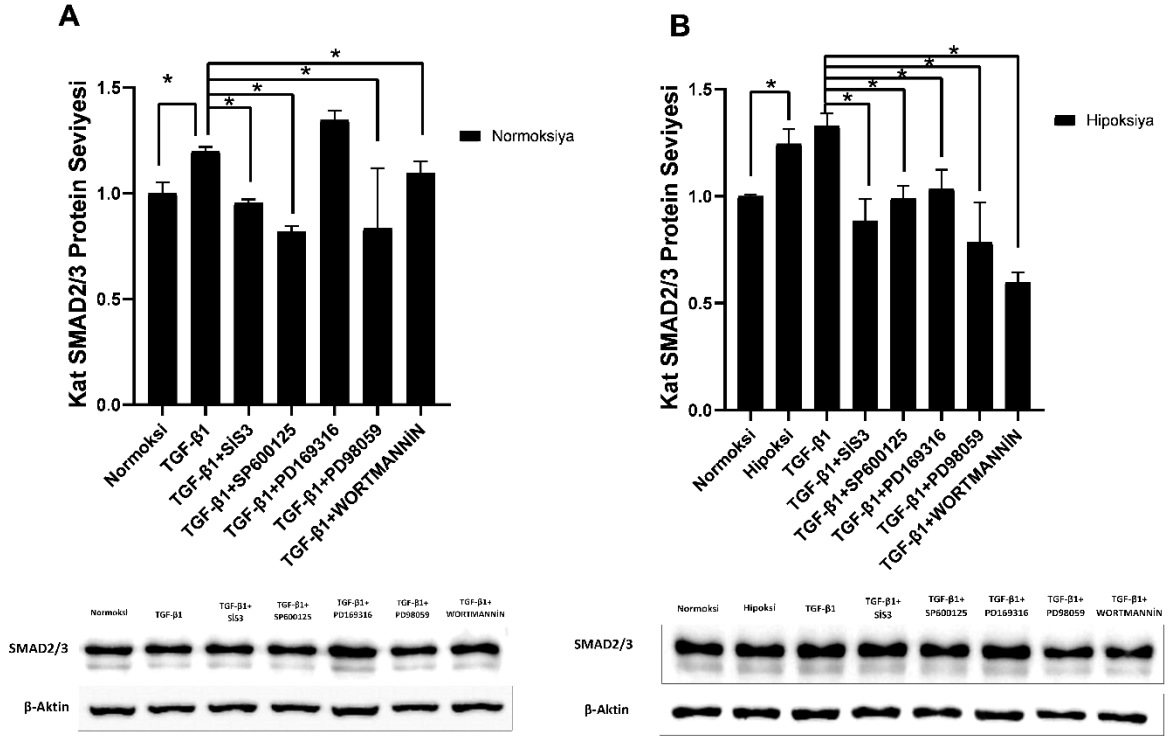
**Şekil 4.66:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin p38 MAPK protein seviyesine etkisi.

LNCaP hücre hattında yapılan inhibisyon protein deneylerinde KLK4' ün ifadesi incelendiğinde, hipoksida, normoksik TGF- $\beta$  da ve hipoksik TGF- $\beta$  da ifadesin arttığı görülmektedir (Şekil 4.67). Bu sonuçlar sitokin uygulamaları sonucu verilen 6 saat sonuçları ile tutarlıdır. SMAD inhibitörü olan SİS3 uygulanan gruplarda ise, inhibisyonun gerçekleştiği ve KLK4' ün de protein ifadesinde azalma olduğu görülmektedir. Bu da KLK4' ün ifadesinin TGF-  $\beta$  sinyal iletim yolu üzerinden SMAD bağımlı yoldan gerçekleştiğini göstermektedir. SMAD bağımsız yollar olan diğer yolak inhibitörleri uygulanan gruplar incelendiğinde ise KLK4' ün ifadesinin tüm yollarda azaldığı görülmektedir (Şekil 4.67).

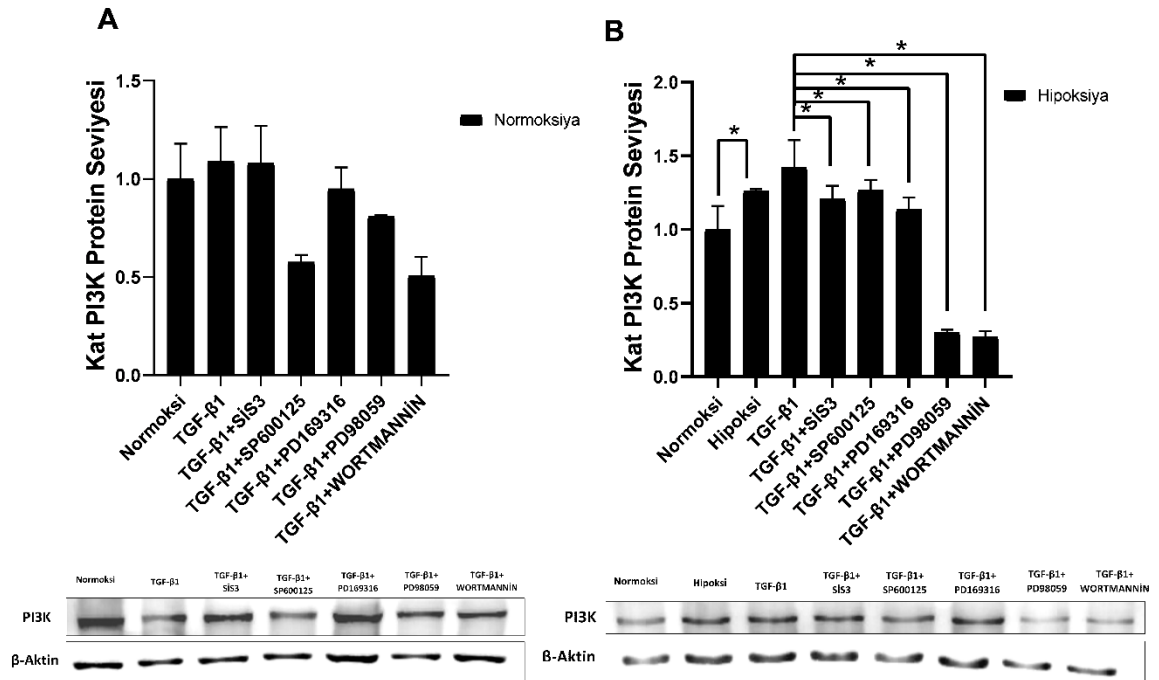


**Şekil 4.67:** LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin KLK4 protein seviyesine etkisi.

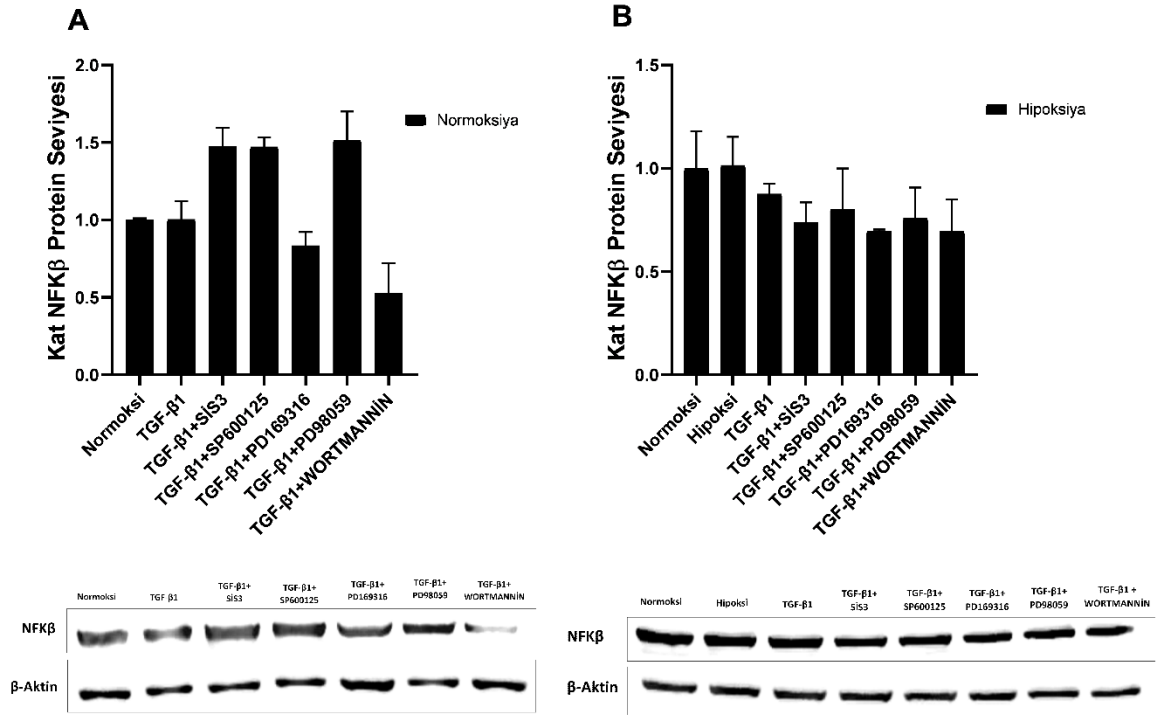
LNCaP hücre hattında yapılan inhibisyon çalışmalarında SMAD2/3 protein seviyesi incelendiğinde SMAD inhibitörü olan SİS3 uygulanan gruplarda hem normoksik hemde hipoksik koşullarda bu yolun inhibisyonunun gerçekleştiği ve SMAD protein seviyesinin buna bağlı olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 4.68). SMAD bağımsız yollar incelendiğinde PI3K, SAPK/JNK 46 kDa, SAPK/JNK 54 kDa, MEK ve p38/MAPK sinyal iletim yolunun ifadesinin hem normoksik hemde hipoksik koşullarda azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.69-73).



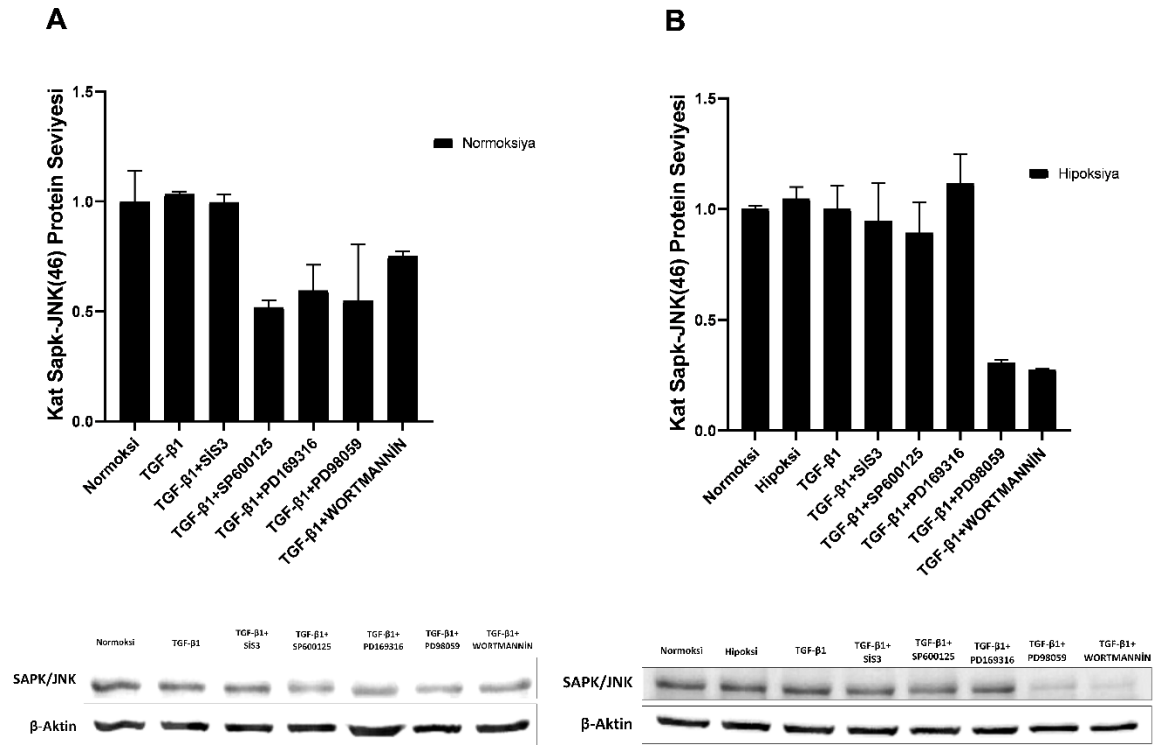
**Şekil 4.68:** LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SMAD2/3 protein seviyesine etkisi.



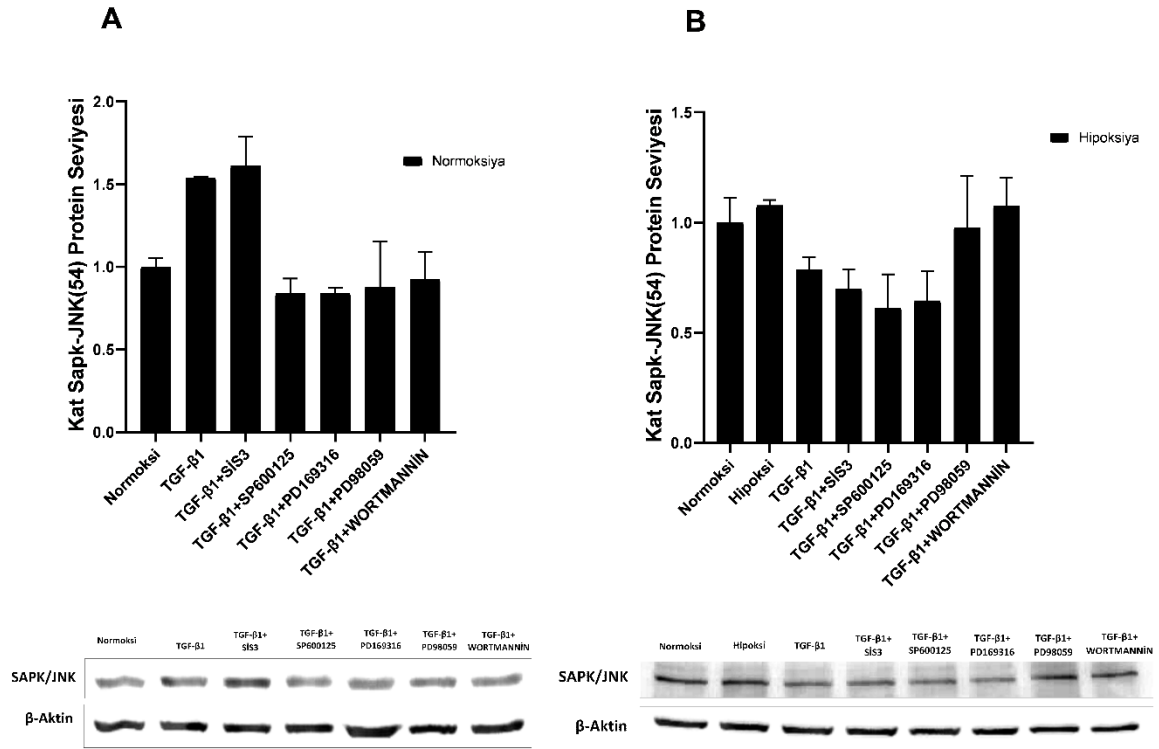
**Şekil 4.69:** LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin PI3K protein seviyesine etkisi.



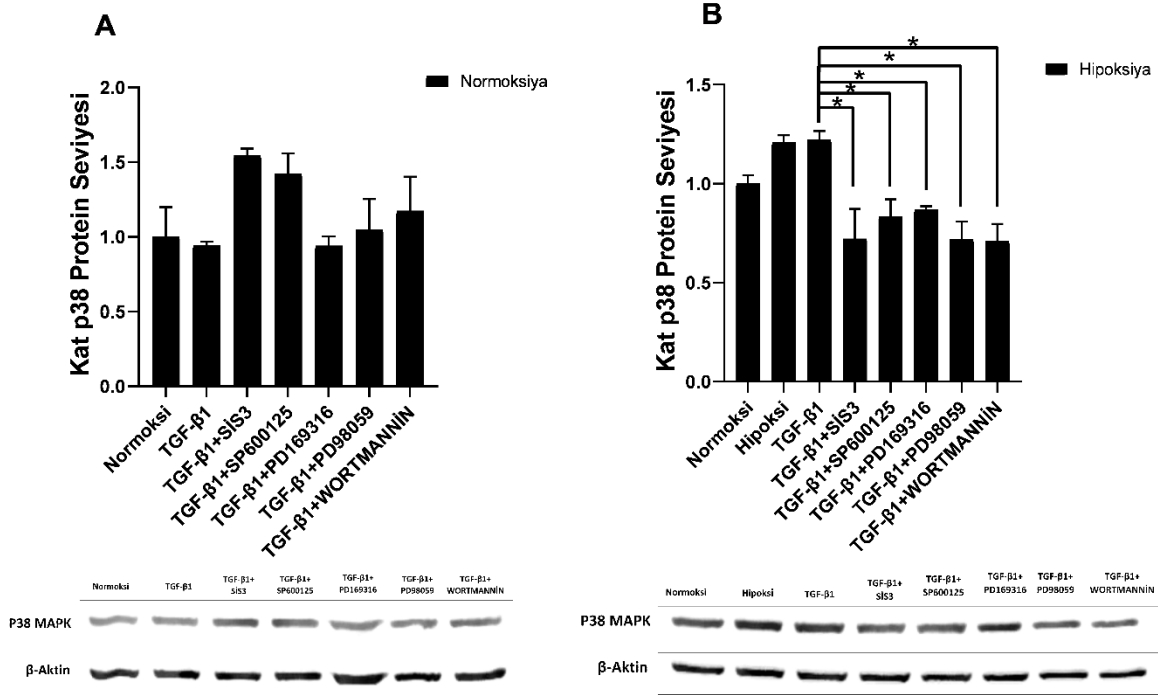
Şekil 4.70: LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin NFKβ protein seviyesine etkisi.



Şekil 4.71: LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 46 kDa protein seviyesine etkisi.



**Şekil 4.72:** LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin SAPK/JNK 54 kDa protein seviyesine etkisi.

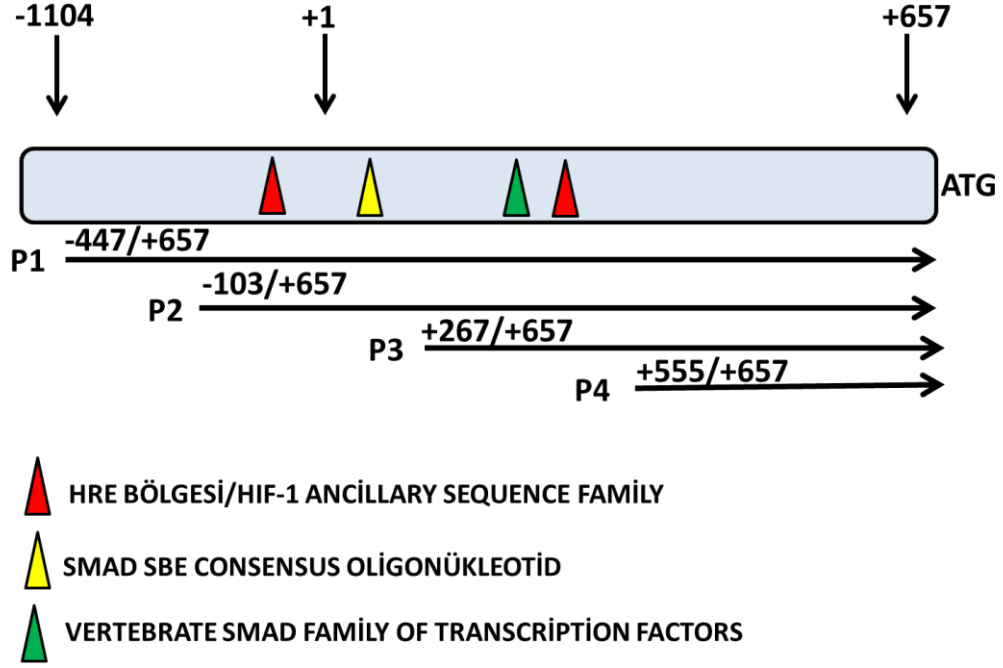


**Şekil 4.73:** LNCaP hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda yolak inhibitörlerinin p38 MAPK protein seviyesine etkisi.

## 4.6 İnsan KLK4 Promotor Parçalarının Klonlanması

### 4.6.1 KLK4 Promotor Biyoinformatik Analizleri

KLK4 promotor bölgesi için klonlama primerleri hazırlayabilmek için genin promotor bölgesi NCBI (National Center for Biotechnology Information) data bank kullanılarak bulundu. Promotor bölge için NCBI da 19. Kromozom üzerinde genomik sekansta NG\_012154.2 üzerinde çalışıldı. Bulunan dizide öncelikle genin ekzon bölgeleri bulundu. Olası 3 Transkripsiyon başlangıç bölgesi içeren KLK4 geninin 1. Ekzon üzerinde bulunan ATG yukarıdaki yaklaşık 2000 baz çiftlik dizi promotor bölge olarak seçildi. Bu bölgede hedef promotor parçalarının oluşturulabilmesi için dizi üzerinde olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri analiz edildi. Bu çalışmadaki hedefimiz hipoksik cevabı aydınlatmak olduğu için öncelikle HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri bulundu. Çalışmamızdaki bir diğer hedefimiz TGF- $\beta$  sitokin cevabının aydınlatılması olduğu için bu sitokinin kullandığı transkripsiyon faktörleri olan SMAD transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri ve HIF transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri, TF Matinspector programı ile biyoinformatik olarak belirlendi. Bu analizler sonucunda klonlama bölgeleri için primer dizaynı yapıldı. Primer dizaynında primerlerin KLK4 blast oranları, Tm sıcaklıkları ve hairpin yapıları analiz edildi.



**Şekil 4.74:** KLK4 Promotor (P) Parçalarının temsili şekli; P1: 1104 bç (-447/+657), P2: 760 bç (-103/+657), P3: 391 bç (+267/+657), P4: 102bç (+555/+657).

19. Kromozom üzerinde lokalize olan KLK4, 5 ekzondan oluşmaktadır. ilk ekzonu üzerinde bulunan ATG başlangıç kodonu bulunarak bu bölgenin 1104 baz çifti yukarıya tespit edilip ilk promotor parçası olarak seçildi. Ardından transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri dikkate alınarak kısaltılmış promotor parçaları belirlendi.

**Genomic context** See KLK4 in [Genome Data Viewer](#)

Location: 19q13.41

Exon count: 6

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
<a href="#">109</a>	current	GRCh38.p12 (GCF_000001405.38)	19	NC_000019.10 (50906352..50910745, complement)
<a href="#">105</a>	previous assembly	GRCh37.p13 (GCF_000001405.25)	19	NC_000019.9 (51409608..51413994, complement)





CACTTGCCCAAGGTTCCAAAAATAGTTCGTGATGTAGGCTGGATACGAACCTGGGGAAATTTGCTGGAGAAGCACAGAAAGAGA  
GGGATGAAGGAGGAGGGGAGAGAGAGAGAGATTTAATTTAAAAAGAGAAAGACATGAGAGAGAACAGGAGAGAAATGAGAGG  
AAATGAAGAAAACACGAGAAAAAATATGAGAGAGAGAAATGAGAGAAAAGAAAGAAAGAGAAAGAGAAATGAGAGATACAGG  
CAAGAGAGAGGTATCTCATGAGAGAGAAATAAGAACATGAAAAGAGAAAAGAAATGAGAGAGAGAGAGAGAAAAGAAAAGGAGAGTG  
GAGTCTAGGATCTGGGCAGGGGTCTCCTCCCTGGGTCCCTAGACCCTGCTGCCAGCCCCTTCTGGGCCCAACCACTGCCTGG  
TCAGAGTTGAGGCAGCCTGAGAGAATTGAGCTGGAAGTTTGAGCAGCCTGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGCAGGCCAGC  
CCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCAGGAGGCCCCCTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTGGAAATCCAGGA  
GCCCAGAGGTGGCCGGTAAGAGGCCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCTCCCTACAGCTCCA  
TGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTG  
TCTCTAGTTAGGGGTCTCTCTGTCTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGC  
ACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCAATTCA  
CAGATGGCTGATGCTTTCTCTAACTTTCCCTTCTACCTAGTTCTCTCTCTCTCTCTTTTCCCATCTCTCTCTCTTTTT  
CTCTCTCAGTCTCTAAATCTGTCTCTCTAGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTCTTGCCCTACCT  
AATAACGTCCAGAGGGGAAGAAAGGGAGGGACAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTC  
TCAGTCTCATCCCAGGTCTGACCTGATGGCCACAGCAGGAAATCCCTGGGGCTGGTTCCTGGGGTACCTCATCCTTGGTGT  
CGCAGGTATCTGAGTATGCGTGTGTCTGTCCGTGCTTGGGGCACAGTGTGTTAATGTTCCAGTGTGACTCAGTGTCC  
TCTTGCTTGTGACTGCAAGCTGCCTGTGAGACGGTACCGTGTATCCGTCCCCCATGGCTGTGCCCTGCAACTCCTGTATC  
GTGGTAAATTTGTGTGTGGCAGTGTGCCTGGGTGTGTGGTGTACCTGTGAGACTCTGACAGTTTGTGCCTCTGAATATCTGTT  
GGAGTGACAACAGTGTAAATGATGATATGGGGACAGGGGAAGCCGAGGTTGCAGGAGATTGTGTTTCTGGGGCTGATCCATTG  
CTGGGAATCTGTGCCTGCTTCTGGGTCTTCACTCCTGAGATCCCCCTCTCCATCCCCAAGGAACCTCACTCACAGGACTATA  
AAACGGTGTGTTGGTGTGCATGGGCTGTGGCTTGGTGTGACTGTGGGCAAGGCTGGGAGAGGATAGGAGTGAATCGGCCGAGG  
ACCGACTCTTTGAGCATCAGTCTGCGCAGACAAGTGACCCGATCCTTGCTCCCAGCAACAATCCACCCCTGAGCTTTAATTC  
ACCCCGAAGGACCCGATCTACTGCTATGAGCCTAGACTCCTCTGTTGAACCCCTCTGACCGTGGCTTTGACCCGATGGCA  
CCAGTCTCACCCTCAGAGCTCACCAGAGCCTGACTCCGCCCCAAGCCCTGTTCCAGCTCTGAGACTCCCTCTAGCCCTAGCC  
TAACCCAGCTCTTGAAGCCTTGAATGCGCCCCCTGCGCTGTAAACCCCAACCCCTAGGAGCACTGATCCCGCTTCTCAGCCACCC  
CCATGCCCTGACTCTCCTCCAGGAGCCCTGACTACCCTGAATCCCTGACCAGGCTCCTGCACCGTGTACCCGCCCTGGGAG  
CCCTAGGCCTATATCCTGGACCAGCCCTGAAGTCCGATCATGACCCTGCACCATAACCCACCCCCAGGAGCCCTGGGTCC  
GCCCCCTGGGCCCGCCCCAGCCCTGACTCGGCCCCCAAGAGTCTGACTGCTCCTGAAGCCCTGACCACGCCCTGTCTGGT  
AACCTCTCCCCAAGAGCCCTGGGCCGCTCCTGAGCCGCTTCCAGCCCTGACTCCGCCCGAGGAGCCCTGACTGCTCCTG  
AACCTCTGACCACGCCCTTCTCGGTAAAGCCCAACCCAGGAACCCCTGGGCCGCTCCTGGTCCCGATCCCATCCTGTACTCC  
GCCCTCAGGATCGCTCTGTCTCTGGTAGCTGCAGCCAATCATAACGGCGAGGACTGCAGCCCGCACTGCAGCCCTGGCAGGC  
GGCACTGGTATGAAAAACGAATGTTCTGCTCGGGCTCCTGGTGCATCCGCAGTGGGTGCTGTGAGCCGCACACTGTTTCCA  
GAAGTGAGTGCAGAGGTAGGGGGAGTGGGCAGGGCTGGGTCCGGGGGCGGGGCTAATATCAGGCTCATCTTGGGGTGTCTAG  
GGGAAACAGCGCTGAAGGCTCTGGGAGGAGGACGGAATGAGCTGGATCCGGGAGCCCCAGAGGGAAGGGCTGGGAGCGGG  
AATCTTGCTTCGGAAGACTCAGAGAGTCTGACTTGAATCTCAGCCAGTGTGAGTCTCTAGTGAACTAAGGCAAGTCTCT  
GTCCCTGAATTTTGTGAATGAGGATTTGAGACCATGGTAAAGTAGCTCTTAGGGTGTTTAGCGAAGAGGGTGGGGTGGGGT  
AGGAGATGGGGATGGGAATGGGGTTGAAGATGAGAATGGAGGTAAGGATGATGTTGCCAACAACACTGACCTGCCCTCCGTGGCC  
CACAGCTCCTACACCATCGGGCTGGGCCGTGCACAGTCTTAGGCCGACCAAGAGCCAGGGAGCCAGATGGTGGAGGCCAGCTC  
TCCGTACGCCACCCAGAGTACAACAGACCCTTGTCTGCTAACGACCTCATGCTCATCAAGTTGGACGAATCCGTGTCCGAGTCT  
GACACCATCCGGAGCATCAGCATTGCTTCGAGTGCCTACCCGCGGGAACCTTGGCTCGTTCCTGGCTGGGGTCTGTGCGCG  
AACGGTGAGCTCACGGGTGTGTCTGCCCTCTTCAAGGAGTCTCTGCCAGTCCGGGGGCTGACCCAGAGCTCTGCGTCC  
CAGGCAGAATGCTTACCGTGTGAGTGCCTGACCTGTGCGTGGTGTCTGAGGAGGCTGCAGTAAGCTCTATGACCCGCTGT  
ACCACCCAGCATGTTCTGCGCCGGCGAGGGCAAGACCAGAGGACTCCTGCAACGTGAGAGAGGGGAAAGGGGAGGGCAGGC  
GACTCAGGGAAGGGTGGAGAAGGGGGAGACAGAGACACACAGGGCCGATGGCGAGATGCAGAGATGGAGAGACACACAGGGG  
ACAGTGACAACCTAGAGAGAGAACTGAGAGAAACAGAGAAATAAACACAGGAATAAAGAGAAGCAAGGAAGAGAGAAACAGAA  
ACAGCATGGGGAGGCAGAAACACACACATAGAAATGCAAGTTGACCTTCCAACAGCATGGGGCTGAGGGCGGTGACCTCCA  
CCCAACAGAAAATCCTCTTATAACTTTGACTCCCCAAAACCTGACTAGAAATAGCCTACTGTTGACGGGGAGCCTTACCAAT  
AACATAAATAGTCGATTTATGCATACGTTTATGATTCATGATATACCTTTGTTGGAATTTTTGATATTTCTAAGCTACACA  
GTTCTGTGTGAATTTTTTAAATTTGCAACTCTCTAAATTTTTCTAATGTGTTTATTGAAAAAATCCAAGTATAAGTGG  
ACTGTGACAGTCAAACAGGGTGTTCAGGGTCAACTGTGTACCAGAGGGAACAGTGCACAGATTCATAGAGGTGAAC  
ACGAAGAGAAAACAGGAAAAATCAAGACTCTACAAAGAGCTGGCAGGGTGGCTCATGCTGTAATCCAGCCTTTGGGAGGC  
GAGGCAGGCAGATCACTTGAAGTAAGGAGTCAAGACCAGCCTGGCCAAAATGGTGAATCCTGTCTGACTAAAAATACAAAA  
GTTAGCTGGATATGGTGGCAGGCGCCTGTAATCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGAAGAAATGCTTGAATATGGGAGGCAG  
AGGTTGAAGTGAAGTGAATCAGACTACACCACTATACTCCAGCTGGGGCAACAGAGTAAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAA  
AAGACTTTACAAAGAGATGCAGAGACTGAGACAGATAAACCAAGCCACAAAGGAGACAAAGGAGAGACAGACAAACAGAAACA  
GACAGACCACAAGCCCAAGAGAAGCAGCCAGCATTGAGACATAGACATCGGGAAGCAGGATTAGATGAAGTCAGGGATCTGG  
AATGGGACTTCCAACAGATATGTTGCTGGGCTATGTTGTTATTGATGATGTTCTGTCTTTGTTTCTCAGTCTCATTTAGTTC  
TTTCTGAGCCACATCCATTTCCACCTCTCTGTGTTTTGAATTTGACTCTCCCTCTCTTCAACAGGGTGAATCTGGGGGGC  
CCCTGATCTGCAACGGTACTTGCAGGCGCTTGTGCTTTTCGAAAAGCCCCGTGTGGCCAAGTTGGCGTCCAGGTGTCTACA  
CCAACCTCTGCAAAATCACTGAGTGGATAGAGAAAACCGTCCAGGCCAGTTAACTCTGGGGACTGGGAACCCATGAATTTGACC  
CCCCAATACATCTCGGGAAGGAATCAGGAATATCTGTTCCAGCCCTCTCCCTCAGGCCAGGATCCAGGCCCCCGCC  
CCTCCTCCCTCAAACAGGGTACAGATCCCCAGCCCTCCTCCCTCAGACCCAGGAGTCCAGACCCCGCCCTCCTCCT  
CAGACCCAGGAGTCCAGCCCTCCTCCTCAGACCCAGGAGTCCAGACCCCGCCCTCCTCCTCAGACCCAGGAGTCCAG  
CCCTCCTCCTCAGACCCAGGAGTCCAGACCCCGCCCTCCTCCTCAGACCCAGGGTCCAGGCCCCCAACCCCTCCTC  
CCTCAGACTCAGAGTCCAGGCCCCCAACCCCTCCTTCCCAGACCCAGAGTCCAGGTCAGGCCCTCCTCCTCAGACCCA  
CGGTTCCAATGCCACTGACTCTCCTGTACACAGTGCACCCCTTGTGGCAGGTTGACCAACCTTACCAGTTGGTTTTTCAT  
TTTTGCTCCTTTCCCTAGATCCAGAAATAAAGTCTAAGAGAGCGCAGGTTCTGTTGTAGTGTCTCCTTCTCCTCCTCC  
ATTCAGAGATTCAGCAAAATGGCTTTCCCTCCATGGGTGCGATTTCCCTATCTGGGAAATGCGAGCTTTGACCAGGAGGCCA



T:A klonlama yapabilmek amacıyla ilk olarak promotor parçaları pGEMT Easy vektörüne atılması planlanmış ve ardından pMetLuc Reporter haberci vektörüne alt klonlama yapılacağı için, promotor bölgeleri için seçilen primer dizlerinin uç kısımlarına restriksiyon enzimi kesim bölgeleri konulmuştur. PGEMT-Easy (Şekil 3.1) ve pMetLuc (Şekil 3.1) vektörlerinde geni kesmeyen ve uyumlu kesim bölgeleri bulunmadığından klonlama primerlerine restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklendi. Bu enzimlerin seçiminde, enzimlerin genin içinden kesmemesine ve pMetLuc Reporter vektörünün MCS' si üzerinde yer almasına dikkat edildi. Bu strateji ile seçilen XhoI ve HindIII enzimleri (pGEMT Easy vektöründe olmayan fakat pMetLuc Reporter vektöründe bulunan) promotor bölgeleri için seçilen dizilerin uç bölgelerine eklendi. pGEMT Easy vektörüne klonlanan KLK4 promotor parçaları XhoI ve HindIII enzimleri ile kesilerek bu vektörden çıkartılması ve ardından bu vektörden çıkarılan promotor parçalarının, aynı enzimlerle kesilen pMetLuc Reporter haberci vektörüne kolaylıkla ligasyonlarının gerçekleştirilebilmesi planlanmıştır.



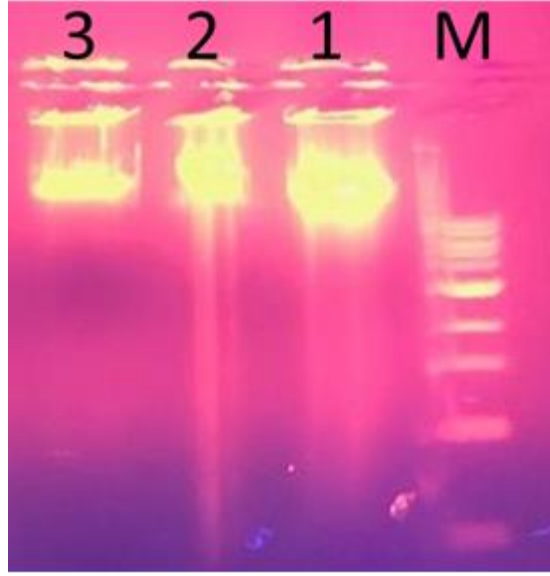
**Şekil 4.78:** Kullanılan restriksiyon endonükleaz Enzim dizileri.

**Tablo 4.9:** İnsan KLK4 promotor dizileri.

Primer Adı	%GC	Tm °C	Dizi (5'-3')	Ürün Büyüklüğü (bç)	Baz sayısı
KLK4pro1 104bç (P1)	48.1	57.9	<u>CTCGAG</u> GGAGAGAGAGAGAGATTTA' XhoI	1104	27
KLK4proF 760bç (P2)	55.2	64.4	<u>CTCGAG</u> GTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCAC XhoI	760	29
KLK4proF 391bç (P3)	50	58.4	<u>CTCGAG</u> ACTGTCTCTGAGGATATCT XhoI	391	26
KLK4proF 102bç (P4)	60	70.9	<u>CTCGAG</u> CAGAGGGAAGAAAGGGAGG-3 XhoI	102	25
KLK4proR	59.1	62	<u>AAGCTT</u> CACGTCAGCACCTGGG HindIII	Hepsi için ortak reverse primer	22

#### 4.6.2 Genomik DNA İzolasyonu

KLK4 Promotor bölgelerini klonlamak amacıyla PC-3 hücrelerinden genomik DNA izole edildi. Bu izolasyon için Analytik jena innuprep DNA Mini Kitin protokolü uygulandı. Genomik DNA % 0,8' lik agaroz jelde yürütüldü. Genomik DNA' ların miktar tayini için mikro drop kullanılarak ölçümler alındı.



**Şekil 4.79:** İzole edilen genomik DNA agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 1kb marker, 1-2 ve 3 genomik DNA).

#### 4.6.3 İnsan KLK4 Promotorlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Öncelikli olarak çalışmalarımızda kullanılacak tüm primerler 100ng/ $\mu$ L olacak şekilde steril ddH<sub>2</sub>O ile laminar flow içerisinde sulandırma işlemleri yapıldı. Ana stoklar ve her bir primer için en az 3 alikot etiketlenerek -20 °C' de saklandı. PZR çalışmalarında primerlerin çalışma koşullarının optimizasyonu için farklı stratejiler denendi. Öncelikle PZR' da bağlanma sıcaklığı hem manuel olarak hem de web bazlı programlar kullanılarak hesaplandı. Kalıp olarak farklı miktarlarda genomik DNA' lar, MgCl<sub>2</sub>' nin farklı konsantrasyonları ve farklı polimeraz enzimleri denenmiştir.

**Tablo 4.10:** KLK4 promotor çoğaltma PZR No:1 ve No:2 (One Taq.ile).

	1104bç	1104bç	760bç	760bç	391bç	391bç	Hβ2	Hβ2
<b>Tüp No</b>	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>gDNA (624ng)</b>	1.5	1.5	1.5	-	1.5	-	1(PC-372h)	-
<b>One Taq Master Mix</b>	25	25	25	25	25	25	25	25
<b>Forward Primer</b>	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Reverse Primer</b>	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	21.5	21.5	21.5	23	21.5	23	22	23
<b>Toplam</b>	50	50	50	50	50	50	50	50

Tüm miktarlar mikrolitre (µL) birimindedir.

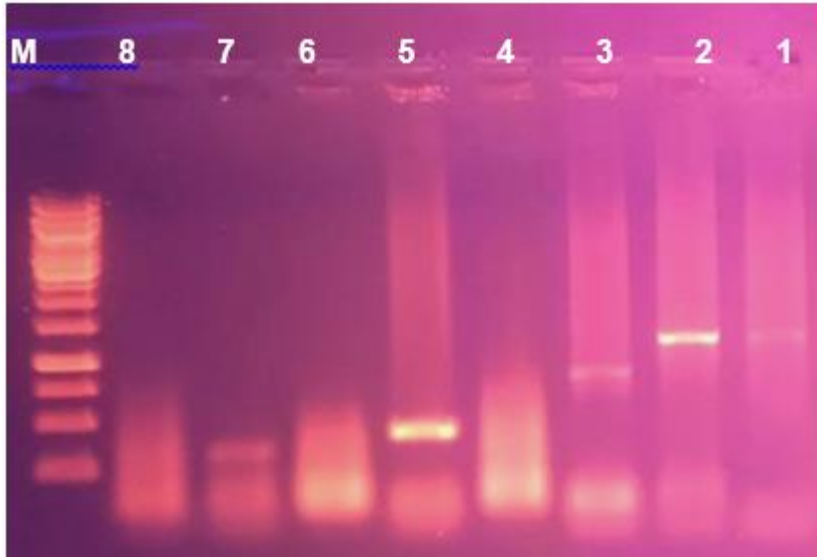
**Tablo 4.11:** KLK4 promotor çoğaltma PZR No:3 (One Taq.ile).

	102bç	102bç	102bç	102bç	102bç NK
<b>Tüp No</b>	1	2	3	4	5
<b>gDNA (624ng)</b>	2	2	2	2	-
<b>One Taq Master Mix</b>	25	25	25	25	25
<b>Forward Primer</b>	1	1	1	1	1
<b>Reverse Primer</b>	1	1	1	1	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	21	21	21	23	23
<b>Toplam</b>	50	50	50	50	50

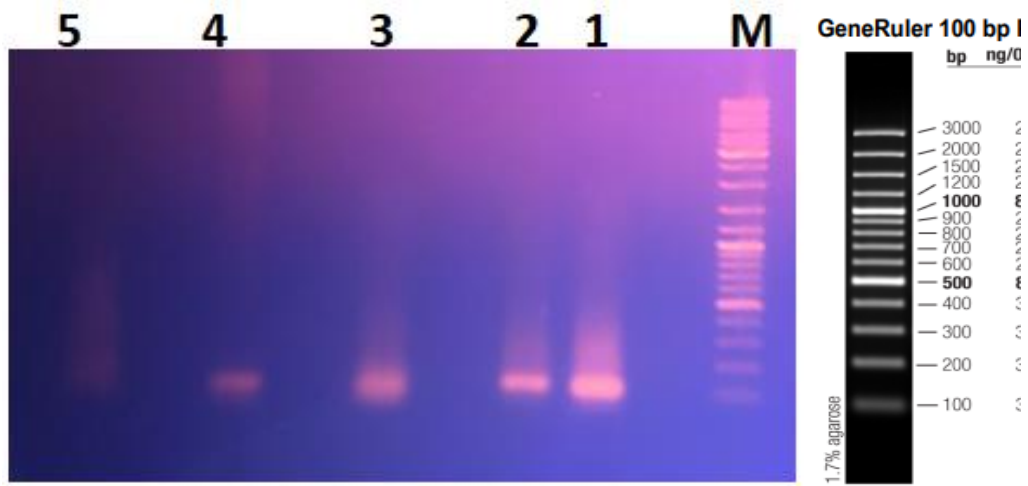
Tüm miktarlar mikrolitre (µL) birimindedir.

**Tablo 4.12:** KLK4 PZR No:1,2 ve No:3 döngü koşulları (One Taq ile).

<b>One Taq Polimeraz</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
<b>Denatürasyon</b>	94°C	30sn	1
<b>Denatürasyon</b>	94°C	30sn	35
<b>Bağlanma</b>	65°C	1dk	35
<b>Uzama</b>	68°C	1,5dk	35
<b>Final Uzama</b>	68°C	5dk	1

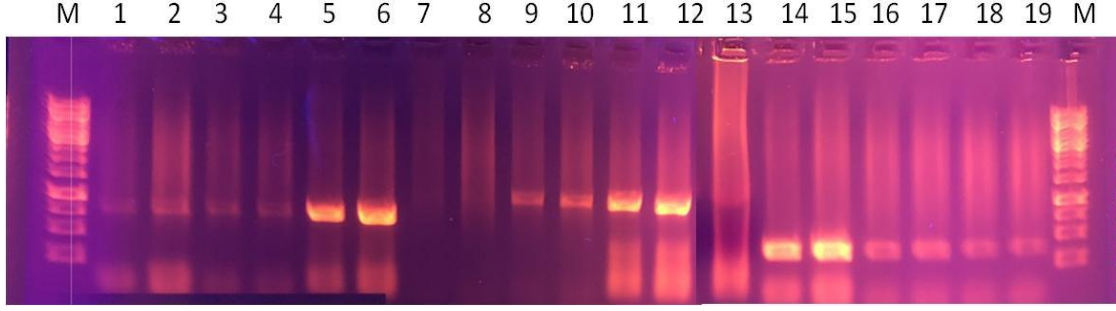


**Şekil 4.80:** PZR No:1 Agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Marker 1kb, 1 ve 2 1104bç promotor parçası, 3: 760 bç promotor parçası, 4: Negatif Kontrol 760bç, 5: 391 bç promotor parçası, 6:NK 391 bç, 7: PK H $\beta$ 2, 8: NK H $\beta$ 2).



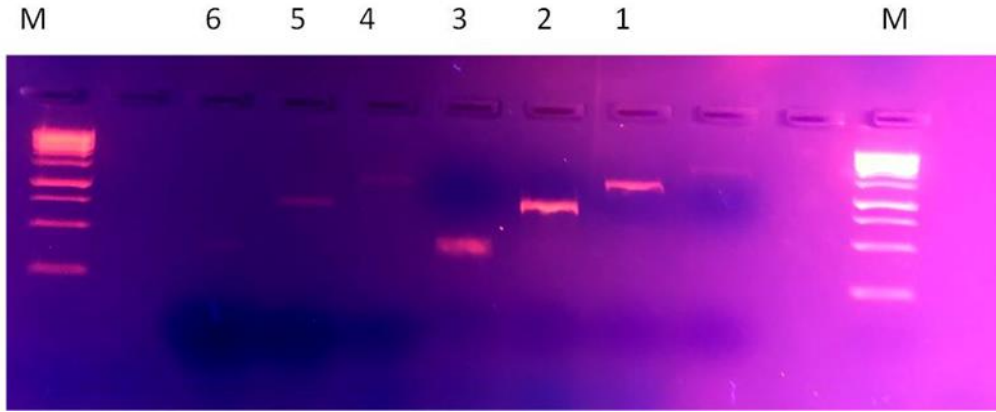
**Şekil 4.81:** KLK4 102 bç promotor primerinin PZR No: 3 agaroz jel elektroforez görüntüsü (1, 2, 3 ve 4 102 bç promotor parçası olan P4, 5: Negatif kontrol, M: 100 bç marker).

One Taq polimeraz enzimi ile primerlerimizin çalıştığından emin olduktan sonra aynı primerler ile bu kez yine aynı koşullarda ve yine One taq master mix ile tekrar PZR yapıldı. Buradaki amaç klonlamaya giderken elimizde daha fazla ürünün olmasının istenmesidir.

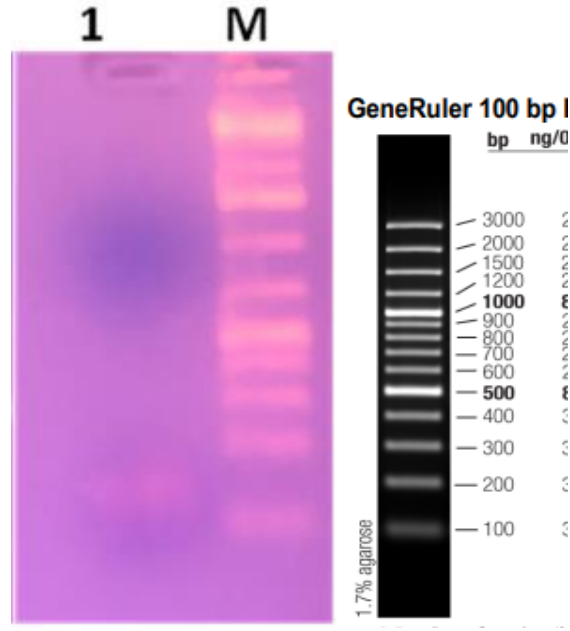


**Şekil 4.82:** KLK4 Promotor Parçaları PZR No:2 Agaroz jel Elektroforezi Görüntüsü ( M:Marker 1kb, 1-6 KLK4 760 bç promotor çoğaltımı, 7: NK 760bç primer, 8: NK 1104 bç primer, 9-12 KLK4 1104 bç promotor çoğaltımı, NK 391 bç primer, 14-19 KLK4 391 bç promotor çoğaltımı).

Şekil 4.81 ve 4.82’ de incelenebileceği gibi PZR çok tekrarlı yapıldı ve farklı uzunluklarda KLK4 promotor parçaları çoğaltıldı. Farklı 4 uzunlukta KLK4 promotor parçaları agaroz jelde yürütüldü. Çoğaltılan DNA bantları UV görüntüleme cihazında görüntülenerek kesildi ve jelden geri kazanma protokolü uygulandı. Elde edilen DNA’ ların 3 µl si tekrar jele yüklenerek kontrol edildi (Şekil 4.83 ve Şekil 4.84).



**Şekil 4.83:** Jelden geri kazanılan KLK4 promotor parçaları agaroz jel elektroforezi görüntüsü ( M: Marker 1kb, 1: 1104bç KLK4 promotor jel kazanımı, 2: 760 bç KLK4 promotor jel kazanımı, 3: 391 bç KLK4 promotor jel kazanımı, 4: 1104bç KLK4 promotor jel kazanımı 2.Elüsyon, 5: 760 bç KLK4 promotor jel kazanımı 2. Elüsyon, 6: 391 bç KLK4 promotor jel kazanımı 2.Elüsyon)



**Şekil 4.84:** Jelden geri kazanılan KLK4 promotor parçası (102 bç) agaroz jel elektroforezi görüntüsü ( M: Marker 100 bç, 1: 102 bç KLK4 promotor jel kazanım ürünü 1. Elüsyonu.

One taq. PZR No:2 ve No:3 den elde edilen bantlar geri kazanıldıktan sonra kalıp olarak kullanılarak Taq Pol. ile tekrar çoklu PZR yapıldı.

**Tablo 4.13:** KLK4 Promotor çoğaltma Taq DNA Polimeraz ile PZR No:4

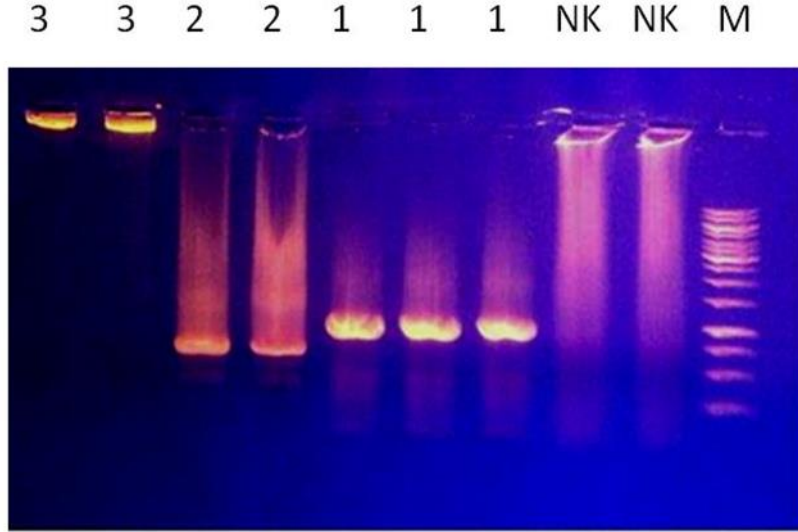
	1104 bç NK X3	760 bç X2	391 bç X2	N.K
<b>Tüp No</b>	1	2	3	4
<b>One Taq PZR ürünü (150-200ng)</b>	3	3	3	-
<b>Taq Polimeraz</b>	0,5	0,5	0,5	0,5
<b>Taq Buffer</b>	5	5	5	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2	2	2	2
<b>Forward Primer</b>	1	1	1	1
<b>Reverse Primer</b>	1	1	1	1
<b>dNTP</b>	1	1	1	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	36.5	36.5	36.5	39.5
<b>Toplam</b>	50	50	50	50

Tüm miktarlar mikrolitre (µL) birimindedir.



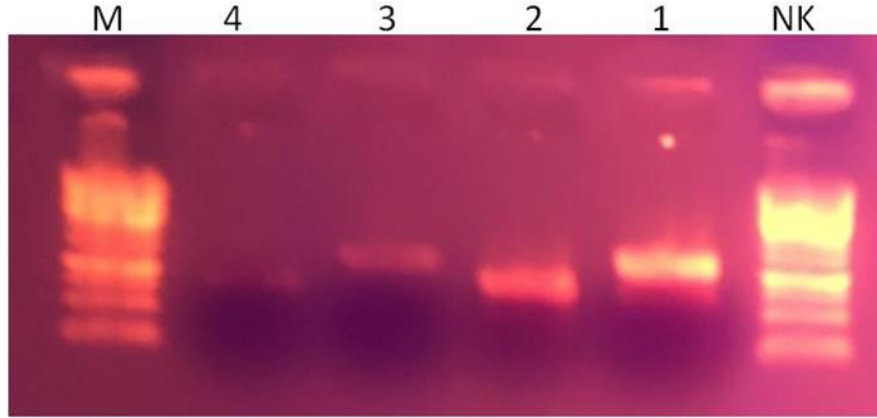
**Tablo 4.14:** KLK4 Promotor oğaltma Taq ile PZR No:4 Koşulları.

Taq Polimeraz	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95°C	30sn	1
Denatürasyon	95°C	10sn	35
Bağlanma	60°C	30sn	35
Uzama	72°C	30sn	35
Final Uzama	72°C	2dk	1



**Şekil 4.85:** KLK4 Promotor Parçaları PZR No:4 Agaroz jel Elektroforezi Görüntüsü (M:Marker 1kb, 1: KLK4 1104 bç promotor çoğaltımı, 2: 760 bç promotor çoğaltımı, 3: 391 bç promotor oğaltımı, NK: Negatif Kontrol).

Şekil 4.85’ de görüldüğü gibi Taq pol. ile yapılan bu PZR’ da sadece 1104 bç ve 760 bç oğaltılabildi. Bu bantlar jelden geri kazanılarak tekrar jele yüklenerek kontrolleri gerçekleştirildi (Şekil 4.86).



**Şekil 4.86:** Jelden geri kazanılan KLK4 promotor parçaları agaroz jel elektroforezi görüntüsü ( M: Marker 1kb, 1: 1104bç KLK4 promotor jel kazanımı, 2: 760 bç KLK4 promotor jel kazanımı, 3: 1104bç KLK4 promotor jel kazanımı 2. Elusyon, 4: 760 bç KLK4 promotor jel kazanımı 2.Elusyon).

#### 4.6.4 İnsan KLK4 Promotorlarının pGEM-T-Easy Vektörüne Klonlanması

PZR ile doğru büyüklükte bantlar elde edilen promotorlardan jelden geri kazanılan bantlar ANZA T4 DNA Ligase Master Mix ile belirtilen koşullar altında pGEM-T Easy vektörüne (Promega) ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyonda 1104 bç için hem one taq. İle yapılan PZR ürünü hem de Taq. Polimeraz ile yapılan PZR ürünü ile ligasyonlar yapıldı. 760 bç, 391 bç ve 102 bç için sadece One taq. Polimeraz ile çoğaltılan ürünler kullanıldı.

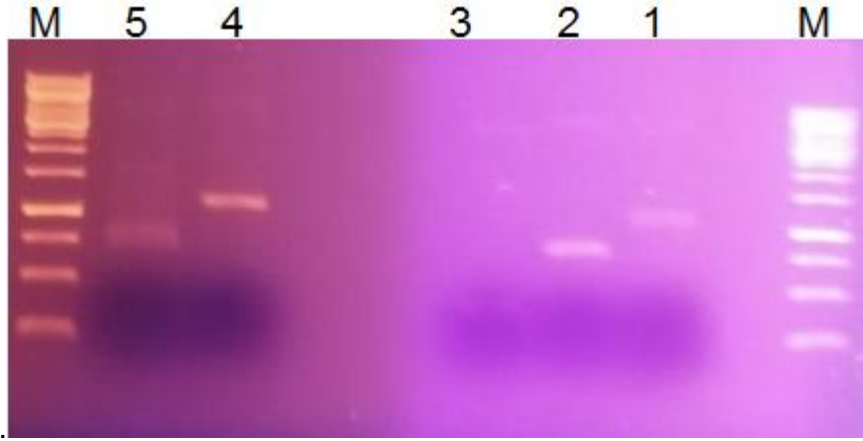
**Tablo 4.15:** pGEM-T Easy vektörüne ligasyon koşulları.

pGEM-T Easy Vektörü	Ligasyon Koşulları
Nükleaz free dH <sub>2</sub> O	7 µL
Lineer Vektör ( pGem T easy vektör)	2 µL (10-100ng)
DNA insert	6 µL(3:1)
ANZA T4 DNA Ligaz Master Mix	5 µL
<b>Toplam</b>	<b>20 µL</b>

Ligasyon işlemi için 3/1 oranında DNA kullanıldı. Ligasyon ürününün 3µL' si jele yüklenerek ligasyon işlemi kontrol edildi (Şekil 4.87). Her bir ligasyon ürünü hem *XLI-Blue* hem de *JM109* kompetant hücrelerine transforme edildi.

Bu hücreler CaCl<sub>2</sub> ile ısı muamelesi sonucu kompetant hale getirilmiş ve uzun dönemde -80 °C'de saklanmaktadır. Bu hücrelerin etkinlik değerleri hesaplanmış ve literatürde

önerilen aralıkta oldukları tespit edildikten sonra kullanılmıştır. Bu kompetant hücrelerine ligasyon ürününden 5' er mikrolitre verildi. Ampicilinli petri kaplarına transformasyondan önce Xgal ve IPTG yayıldı ve böylece mavi-beyaz koloni seçimi yapılmıştır.



**Şekil 4.87:** Ligasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Marker 1kb, 1: KLK4 1104 bç One Taq ligasyon ürünü, 2: 760 bç One Taq ligasyon ürünü, 3: 391 bç One Taq ligasyon ürünü, 4: Taq Polimeraz 1104 bç ligasyon ürünü, 5: Taq Polimeraz 760 bç ligasyon ürünü).

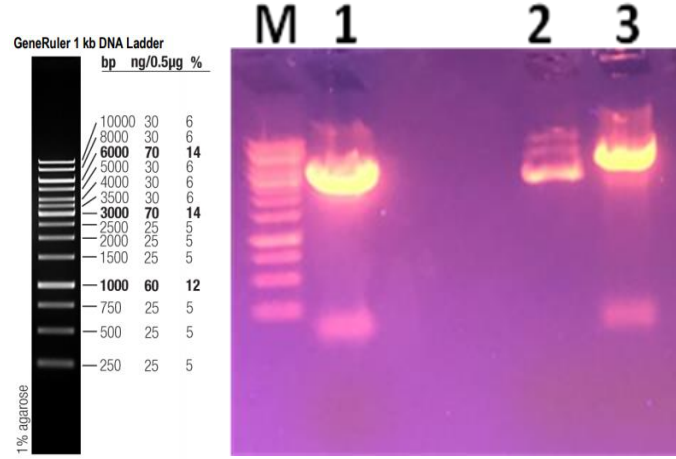
1104 bç 760bç ve 391 bç için toplamda 10 adet petriye ekim yapıldı. 102 bç için ise toplamda 4 adet petriye ekim yapıldı. Bir gece sonunda, petrilerden mavi beyaz koloni seçimi yapıldı. Beyaz koloniler olası KLK4 promotor parçalarını içeren pGEM-T-Easy vektörlerini taşıyan kolonilerdir. Oluşan beyaz kolonilerin rekombinant olduğu düşünülerek, plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Plazmit izolasyonları önceden primer uçlarına eklenen (HindIII ve XhoI) kesim bölgelerine uygun olarak ilgili restriksiyon endonükleaz enzimleri ile plazmitlerin kontrol kesimleri gerçekleştirildi. Kesim işlemi 37 °C' de 15 dk bırakılarak gerçekleştirildi. Kesim sonunda hem kesilmiş hemde kesilmemiş plazmit izolasyon örnekleri jele yüklendi. Görüntüleme sonunda (Şekil 4.88 ve 4.89) 1104 bç içeren 6 koloninin rekombinant olduğu ve doğru büyüklükte olduğu, 1 koloninin 391 bç içerdiği ve izolasyonu yapılan 2 koloninin de 760 bç içerdiği, 102 bç içeren 1 ve 3 numaralı 2 koloninin rekombinant olduğu ve doğru büyüklükte olduğu, tespit edildi. Bu kolonilerden seçilenleri Sentebiolab (1104 bç, 760 bç ve 391 bç) ve BM Lab' a (102 bç) sekanslamaya gönderilerek analizleri gerçekleştirildi. Dizi analizi sonucu ve gen bankasında bulunan dizinin karşılaştırılması BioEdit programı

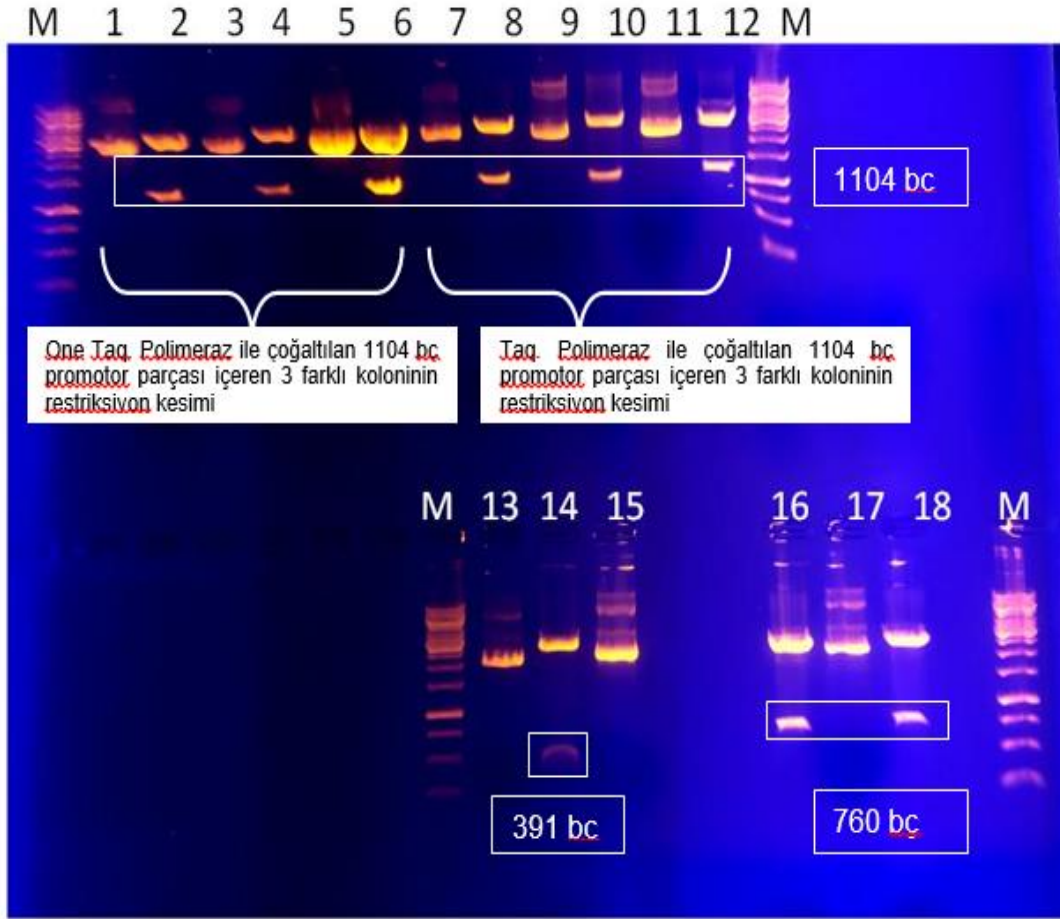
ile yapılmıştır. Plazmitlerin KLK4 promotor parçalarını içerdikleri tespit edildiğinden, seçilen kolonilerden alt klonlama çalışmalarına geçildi.

**Tablo 4.16:** KLK4 promotorlarının pGEM-T Easy vektöründen kesim koşulları.

Kesim koşulları	Miktar
Plazmit	5 µL
Green Buffer	2 µL
XhoI	1 µL
HindIII	1 µL
dH <sub>2</sub> O	11 µL
Toplam	20 µL



**Şekil 4.88:** pGEM-T-Easy vektörüne klonlanan KLK4 102 bç promotor parçasının agaroz elektroforezde kesim görüntüsü (M:Marker, 1: 102 bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon kesimi, 2: 102 bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon kesimi, 3: 102 bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy vektörünün restriksiyon kesimi).



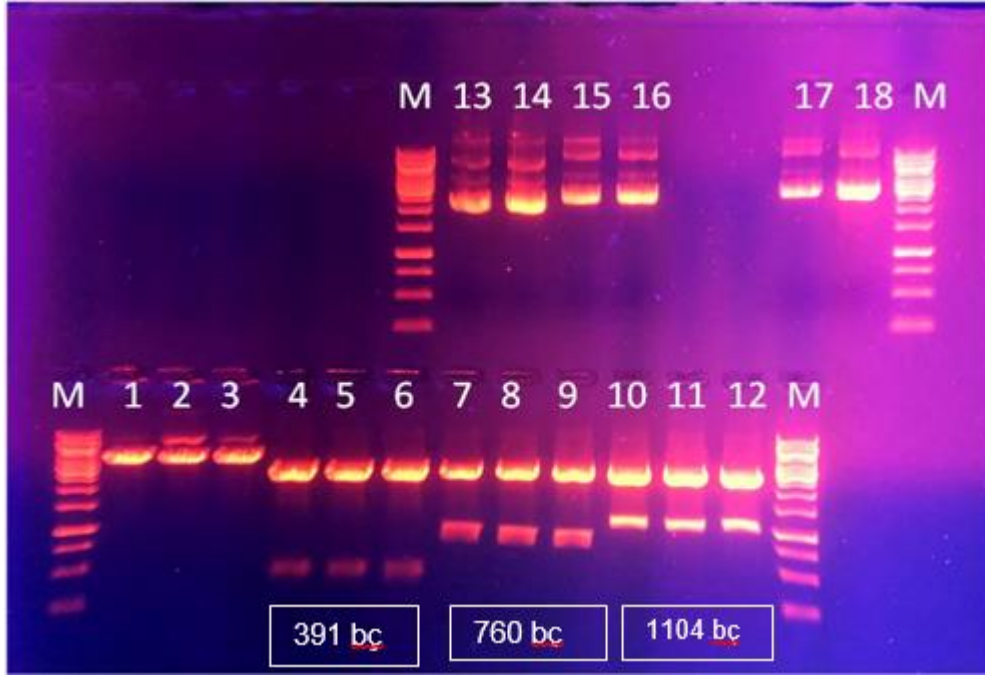
**Şekil 4.89:** pGEM-T easy kesim sonuçları (M:Marker, 1: One Taq. İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 2: One Taq. İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 3: One Taq. İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 4: One Taq. İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 5: One Taq. İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 6: One Taq. İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy plazmit restriksiyon kesimi, 7: Taq. polimeraz İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 8: Taq. polimeraz İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 9: Taq. polimeraz İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 10: Taq. polimeraz İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 11: Taq. polimeraz İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 12: Taq. polimeraz İle çoğaltılan 1104bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 13: One Taq. İle çoğaltılan 391 bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 14: One polimeraz İle çoğaltılan 391 bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 15: One Taq. İle çoğaltılan 760 bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 16: One polimeraz İle çoğaltılan 760 bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi, 17: One Taq. İle çoğaltılan 760 bç promotor parçası içeren kesilmemiş pGEM-T Easy, 18: One Taq polimeraz İle çoğaltılan 760 bç promotor parçası içeren pGEM-T Easy restriksiyon kesimi.

#### 4.6.5 İnsan KLK4 Promotorlarının pMetLuc Haberci Vektörüne Alt Klonlaması

KLK4 promotor parçalarının dizi analizi sonucu pGEM-T-Easy vektörüne başarılı bir şekilde klonlanmasından sonra, promotor parçalarının fonksiyonel aktivitelerini anlayabilmek amacıyla pMet-Luc Reporter haberci vektörüne alt klonlamaları yapıldı. Bunun için pGEMT-Easy+1104 bç KLK4 promotor, pGEMT-Easy+760 bç KLK4 promotor, pGEMT-Easy+391 bç KLK4 promotor, pGEMT-Easy+102 bç ve pMetLuc Reporter vektörü (boş vector) HindIII ve Xho I enzimleri ile 37 derecede 30 dk' lık kesime bırakıldı. (Şekil 4.90 ve 4.91). Kesimler 3 tekrarlı olarak kuruldu. Bunun sebebi elimizdeki ürün miktarını artırarak pMetLuc Ligasyonuna gitmektir. Kesim sonuçları agaroz jelde yürütülerek UV altında görüntülendi.

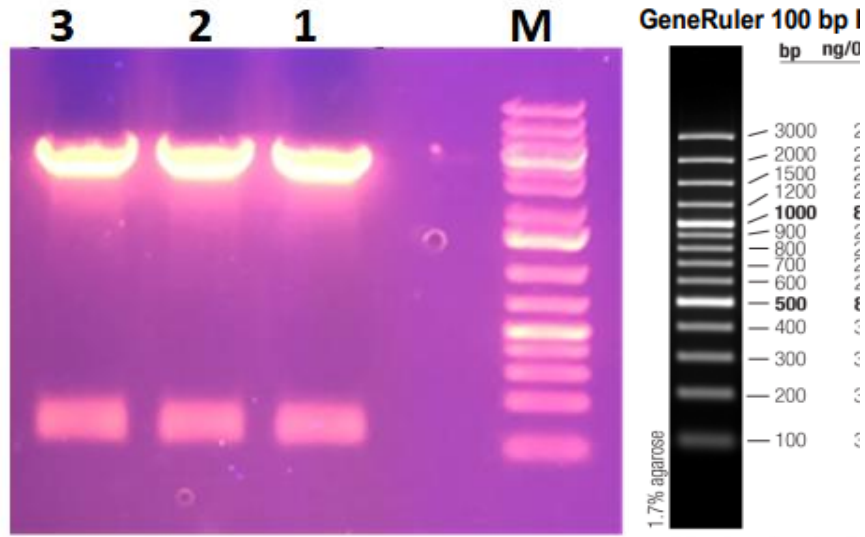
**Tablo 4.17:** KLK4 promotorlarının pGEM-T Easy vektöründen kesim koşulları.

Kesim koşulları	Miktar
Plazmit	5 µL
Green Buffer	2 µL
XhoI	1 µL
HindIII	1 µL
dH <sub>2</sub> O	11 µL
Toplam	20 µL



**Şekil 4.90:** KLK4 promotor parçası içeren pGEMt-Easy ve boş pMetLuc Vektörlerinin Restriksiyon Kesimi (M: 1kb Marker, 1-3: boş pMetLuc Reporter Haberci Vektör

XhoI/Hind III Kesimi, 4-6: 391 bç KLK4 promotor parçası içeren PGEMT-Easy XhoI/Hind III Kesimi, 7-9 760 bç KLK4 promotor parçası içeren PGEMT-Easy XhoI/Hind III Kesimi, 10-12 1104 bç KLK4 promotor parçası içeren PGEMT-Easy XhoI/Hind III Kesimi, 13: 391 bç KLK4 içeren kesilmemiş pGEMT-Easy mini prep. 2.elusyon, 14: 391 bç KLK4 içeren kesilmemiş pGEMT-Easy mini prep. 1.elusyon, 15: 760 bç KLK4 içeren kesilmemiş pGEMT-Easy mini prep. 2.elusyon, 16: 760 bç KLK4 içeren kesilmemiş pGEMT-Easy mini prep. 1.elusyon, 17: 1104 bç KLK4 içeren kesilmemiş pGEMT-Easy mini prep. 2.elusyon, 18: 1104 bç KLK4 içeren kesilmemiş pGEMT-Easy mini prep. 1.elusyon.



**Şekil 4.91:** KLK4 102 bç promotor parçası içeren pGEMt-Easy vektörlerinin restriksiyon kesim görüntüsü (M: 100 bç marker; 1,2,3 102bç KLK4 promotor parçası içeren PGEMT-Easy XhoI/Hind III Kesimi).

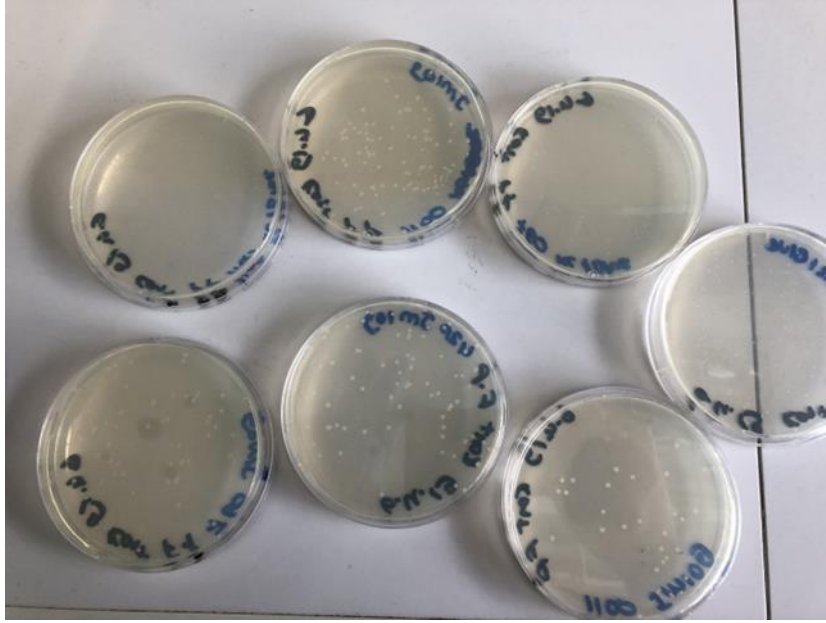
Görüntülemenin sonunda kesimleri gerçekleşen promotorların ve boş pMet-Luc Reporter haberci vektörü ayrı ayrı agaroz jelden geri kazanıldı. Geri kazanılan tüm ürünlerin yeniden agaroz jel elektroforezinde kontrolleri yapıldıktan sonra pMet-Luc Reporter haberci vektörüne ligasyonları gerçekleştirildi. Tüm promotor parçaları için aynı koşullarda ligasyon kuruldu (Tablo 4.18). Ligasyonlar oda ısısında 15 dk bırakıldıktan sonra bir gece +4 derecede bırakıldı.

**Tablo 4.18:** KLK4 promotorlarının pMET-Luc Reporter vektörüne ligasyon koşulları.

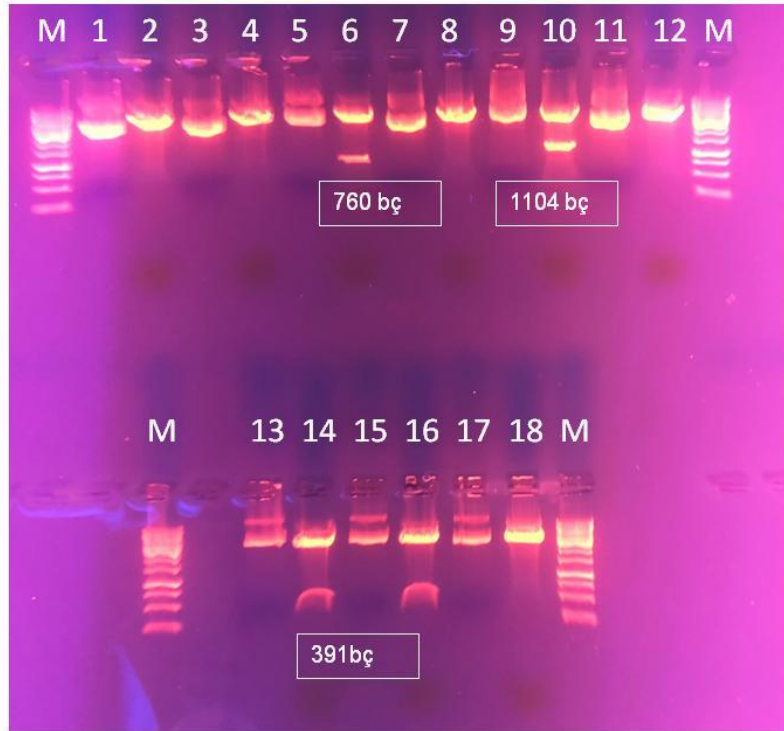
<b>Ligasyon Koşulları</b>	<b>Miktar</b>
<b>Nükleaz free dH<sub>2</sub>O</b>	7 µL
<b>pMet-Luc Reporter (Xho1 ve HindIII ile kesilmiş)</b>	2 µL (10-100ng)
<b>DNA insert (Xho1 ve HindIII ile kesilmiş KLK4 promotorları)</b>	6 µL(3:1)
<b>ANZA T4 DNA Ligaz Master Mix</b>	5 µL
<b>Toplam</b>	20 µL

Ligasyondan alınan örneklerin her biri hem *E. coli XL1Blue* hem de *E. coli JM109* kompetant hücrelerine 5' er mikrolitre transforme edildi. Transformasyon sonrası bakteriler, kanamisin içeren petrilere ekildi ve bir gece 37 °C' de inkübe edildi. Bir gece sonunda petrilere kontrol edildi ve koloniler gözlemlendi (Şekil 4.92). Her bir promotor parçası için 3'er koloni seçilerek kanamisin içeren LB sıvı besi yerine ekimleri gerçekleştirildi ve 1 gece 37 °C' de çalkalamalı inkübatöre bırakıldı. Ertesi gün sıvı kültürlerden önce gliserol stok yapılarak -80 °C' de stoklar oluşturuldu. Daha sonra sıvı kültürlerden Plasmid DNA purification NucleoBond Miniprep (Macherey-Nagel) kiti ile plazmit izolasyonları yapıldı. Plazmit eldesi sonrası miktar ve saflık kontrolleri yapıldıktan sonra plazmitlerin restriksiyon kesimleri gerçekleştirildi. Xho I ve Hind III ile restriksiyon kesimleri yapılarak pMetLuc vektöründeki promotor parçalarının kontrolleri yapıldı. UV de görüntülendi (Şekil 4.93 ve 4.94).

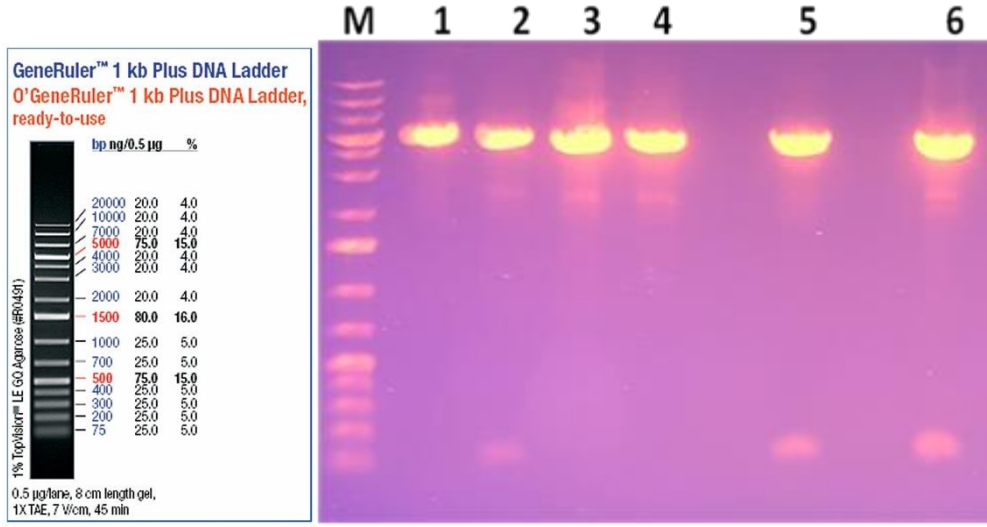




**Şekil 4.92:** Kanamisin içeren LB Agar ile hazırlanan besi yerine ekilen pMetLuc Reporter+promotor parçası içeren koloniler.



**Şekil 4.93:** KLK4 promotor parçası içeren pMetLuc Vektörlerinin Restriksiyon Kesimi, sıralamada ilk kuyu kesilmemiş vektör sonraki aynı vektörün kesimi (M: Marker, 1-6: pMetLuc Reporter Haberci Vektör+760 bç içeren 3 koloninin XhoI/Hind III Kesim, 7-12 pMetLuc Reporter Haberci Vektör+1104 bç içeren 3 koloninin XhoI/Hind III Kesim, 13-18: pMetLuc Reporter Haberci Vektör+391 bç içeren 3 koloninin XhoI/Hind III Kesimi).



**Şekil 4.94:** 102 bç promotor parçası içeren pMetLuc vektörlerinin restriksiyon kesimi, (M: 1kb plus Marker, 1-6: 102 bç içeren pMetLuc Reporter vektörünün XhoI/Hind III enzimleri ile kesilmiş vektör görüntüsü.

#### 4.6.6 Dizi Analizleri

Dizi analizi sonuçları Ekler bölümünde incelenebilir. NCBI blast ile diziler doğrulandı. Tüm diziler kullanılarak bioedit programında karşılaştırmalar da ayrıca yapıldı. Tüm promotor parçalarının başarıyla klonlandığı görülmektedir (EK C).

#### 4.7 Geçici Transfeksiyon Deneyleri

##### 4.7.1 Büyük Ölçekli Plazmit Eldesi

Çalışmalarımızda kullanılan tüm vektörlerin büyük ölçekli eldesi için Macherey-Nagel Plasmid DNA purification kit kullanıldı.

##### 4.7.2 Plazmitlerin Kontrolü

Plazmit eldesi sonrası tüm promotor içeren vektörlerin ve kontrol vektörlerinin restriksiyon kesimi ile kontrolleri yapıldı. Bunun için vektörlerden uygun restriksiyon enzim seçimleri gerçekleştirilerek 37 °C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. pMetLuc reporter için tablo 4.19' de verilen koşullarda kesimler yapıldı. Kontrol vektörleri için kesim koşulları Tablo 4.20 ve 4.21' de verilmiştir. Transfeksiyon çalışmaları öncesinde tüm vektörlerin kesimleri yapılmış ve agaroz jel elektroforezinde elde edilen bant büyüklükleri ile kontrolleri

sağlandı. Kesim sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.95 ve 4.96' da incelenebilir.

**Tablo 4.19:** KLK4 1104 bç, 760bç, 391 bç ve 102 bç için kesim koşulları.

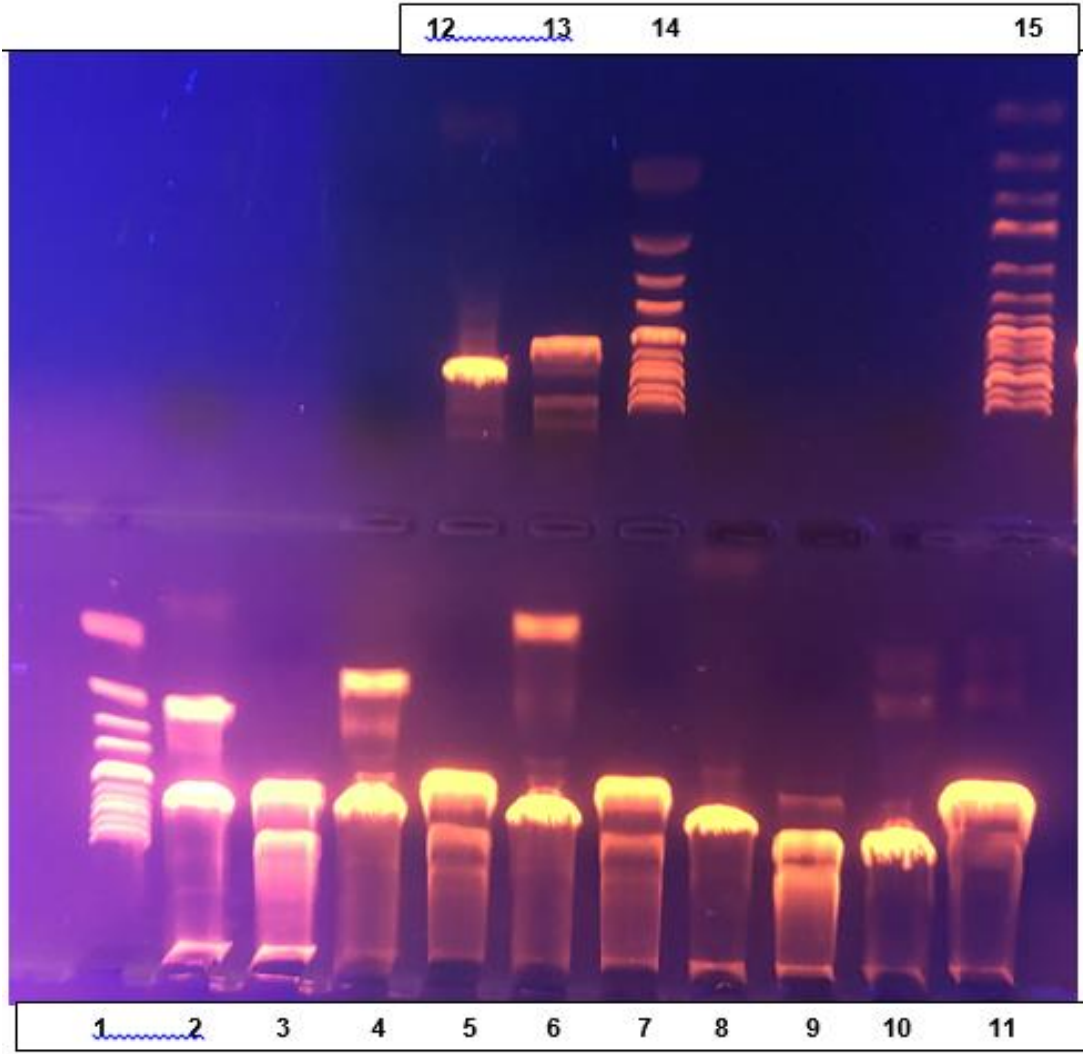
<b>KLK4 1104 bç, 760bç, 391 bç ve 102 bç için kesim koşulları</b>	
<b>Plazmit</b>	5 µl
<b>Green Buffer</b>	2 µl
<b>Xho1</b>	1 µl
<b>Hind III</b>	1 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	11 µl
<b>Toplam</b>	20 µl

**Tablo 4.20:** pMETLuc kontrol vektörü için kesim koşulları.

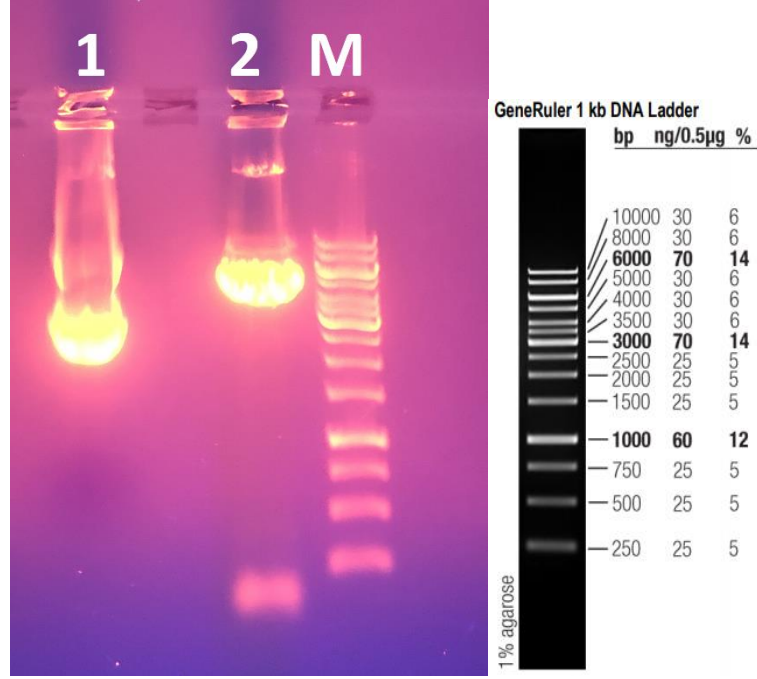
<b>pMETLuc kontrol vektörü için kesim koşulları</b>	
<b>Plazmit</b>	5 µl
<b>Green Buffer</b>	2 µl
<b>SmaI</b>	1 µl
<b>NotI</b>	1 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	11 µl
<b>Toplam</b>	20 µl

**Tablo 4.21:** pSEAP2 kontrol vektörü için kesim koşulları

<b>pSEAP2 kontrol vektörü için kesim koşulları</b>	
<b>Plazmit</b>	5 µl
<b>Green Buffer</b>	2 µl
<b>EcoRI</b>	1 µl
<b>Xho1</b>	1 µl
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	11 µl
<b>Toplam</b>	20 µl



**Şekil 4.95:** Yüksek kopyalı plazmit eldesi kesim agaroz jel görüntüsü. 1: 1kb marker, 2: 1104 bç midi prep. kesim, 3: 1104 bç midi prep., 4: 760 bç midi prep. kesim, 5: 760 bç midi prep., 6: 391bç midi prep. kesim, 7: 391 bç midi prep. 8: pMetLuc Reporter midi prep. kesim, 9: pMetLuc Reporter midi prep., 10: pMetLuc kontrol midi prep. kesim, 11: pMetLuc kontrol midi prep. 12: pSeap2 midi prep. Kesim, 13: pSeap2 midi prep. 14: 1kb marker, 15: 1kb marker.



**Şekil 4.96:** 102 bç Midi Prep. Elektroforez Jel Görüntüsü (1: 102 bç içeren pMetLuc Reporter vektörünün Midi Prep. Kesilmemiş görüntüsü, 2: 102 bç içeren pMetLuc Reporter vektörünün Midi Prep. XhoI/Hind III enzimleri ile kesilmiş vektör görüntüsü, M: 1kb Marker).

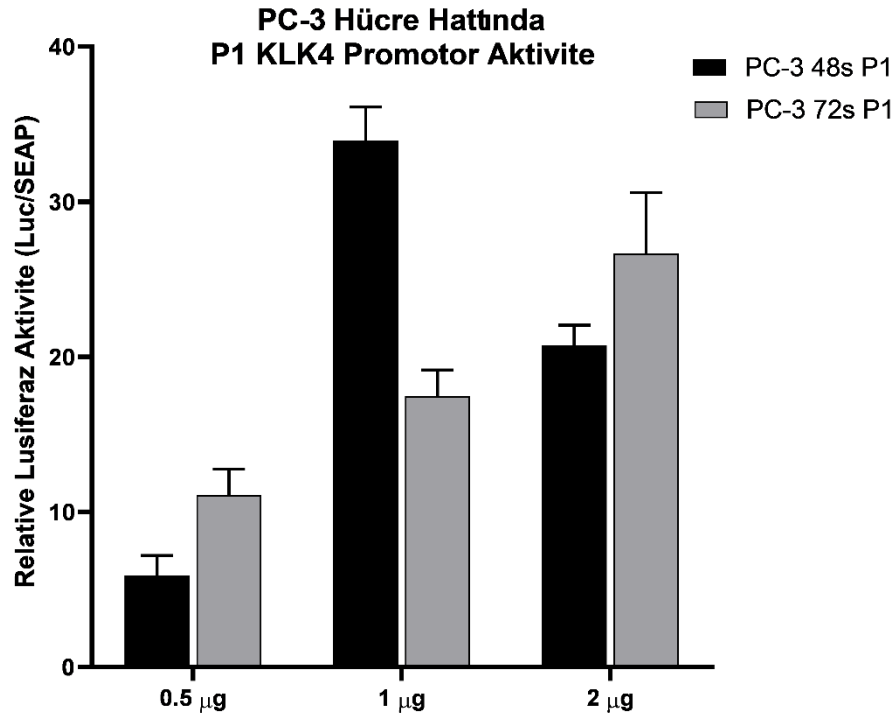
Transfeksiyon etkinliğinin ölçülebilmesi için internal kontrol olarak SEAP2 vektörü, promotor içeren pMetLuc reporter vektörü ile birlikte hücrelere transfekte edildi. Ayrıca lusiferaz ve alkalın fosfataz aktivitelerinin kontrolü için bir grup hücreye sadece pMetLuc kontrol ve SEAP kontrol vektörleri (Şekil 3.1 ve 3.2) transfekte edildi.

#### 4.7.3 Geçici Transfeksiyon ile KLK4 Promotor Parçalarının Bazal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

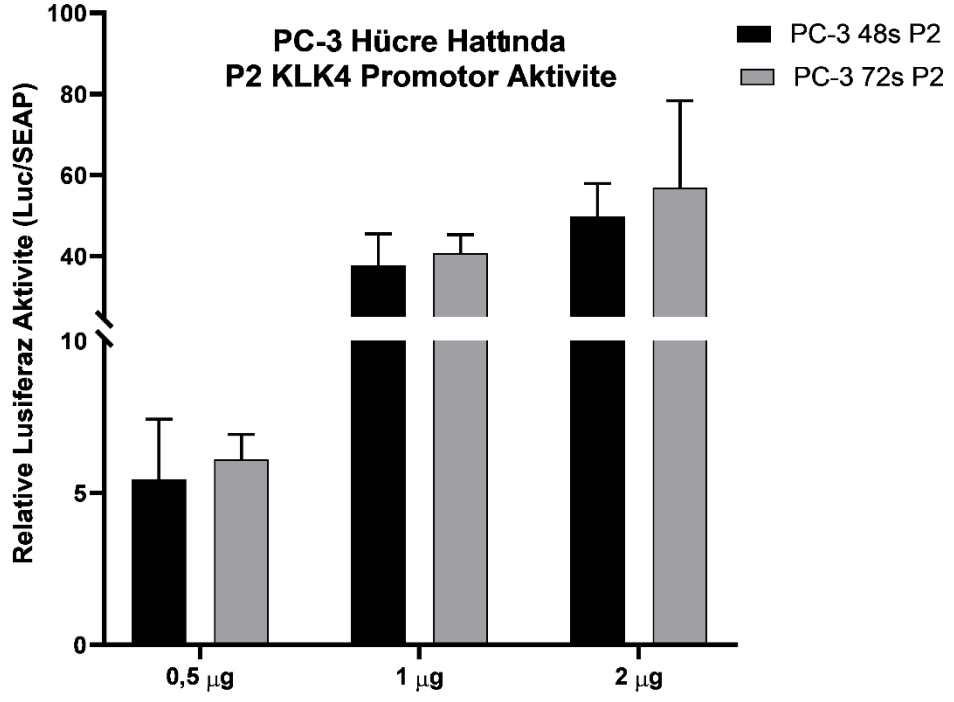
Transfeksiyon çalışması için hücre sayımından sonra hücreler, 250.000 hücre olarak 12 well plakalara ekildi. % 10 FCS içeren DMEM F12 ortamında ve son konsantrasyonu 1X olacak şekilde Antibiyotik-Antimikotik içeren besiyeri içerisine hücreler yayıldı. LNCAP hücreleri için ise % 10 FCS içeren RPMI ve 1X olacak şekilde Antibiyotik-Antimikotik içeren besi ortamına hücreler yayıldı. 24 saat sonra tüm antibiyotikli besi ortamı değiştirilerek PC-3 hücre hattı için FCS ve DMEM F12 ortamına LNCAP hücre hattı için ise FCS ve RPMI besi ortamına alındı fakat antibiyotik kullanılmadı. Ardından transfeksiyon deneyi kuruldu. Transfeksiyon işlemi için Promega ViaFect™ Transfection Reagent Kit kullanıldı.

Öncelikle bu kitin datasheet de önerdiği bazı oranlar bulunmaktadır. Bu oranların optimizasyonu için KLK4 promotoru olan 1104 bç ile 1,5:1, 2:1, 3:1 ve 4:1 oranında kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu optimizasyon sonucunda bütün transfeksiyonlarda kitin 3:1 oranının kullanılmasına karar verildi. Ayrıca promotor parçalarının bazal aktiviteleri için de optimizasyon deneyleri kuruldu. Bunun için hem PC-3 hücrelerinde hem de LNCaP hücrelerinde KLK4 promotorları olan 1104bç, 760 bç ve 391 bç' nin transfeksiyonu yapıldı. Bu optimizasyon işleminde tüm konstraklar 0.5µg, 1µg ve 2µg olacak şekilde transfekte edildi. 48 ve 72 saat sonunda medyumlar toplanarak luminometrede ölçüldü.

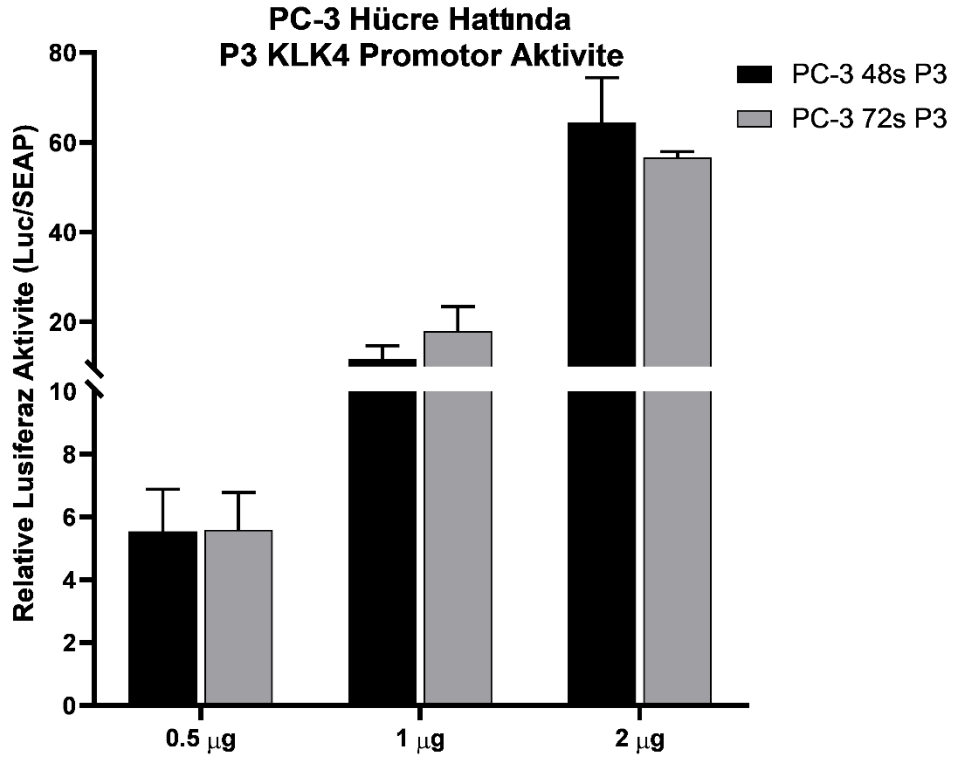
Tüm bu işlemler sonucunda en uygun doz 1µg olarak karar verildi (Şekil 4.97- 4.102).



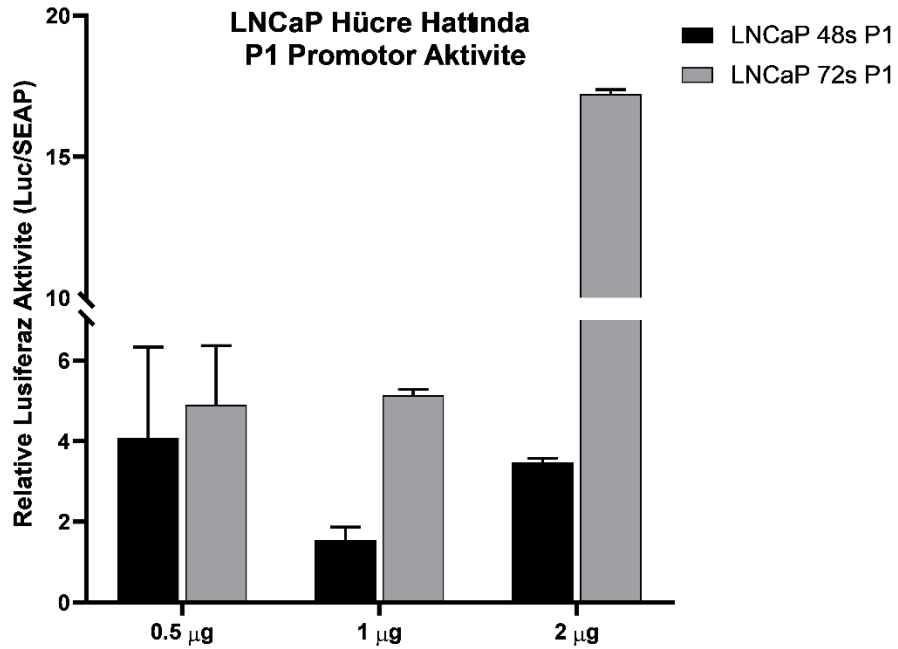
**Şekil 4.97:** PC-3 hücre hattında 1104 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.



**Şekil 4.98:** PC-3 hücre hattında 760 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.

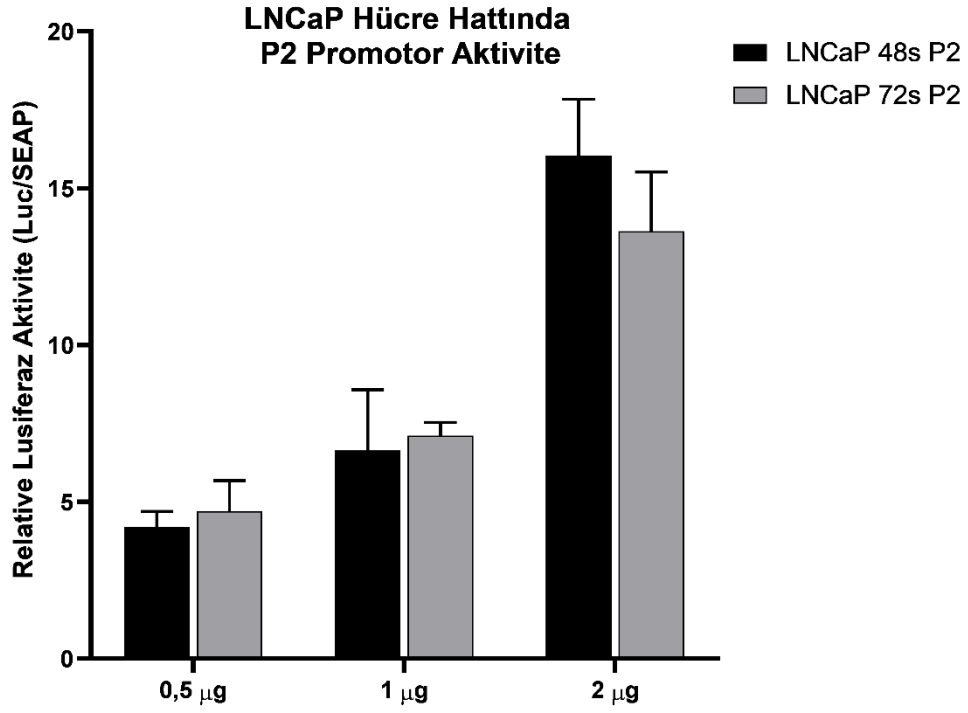


**Şekil 4.99:** PC-3 hücre hattında 394 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.

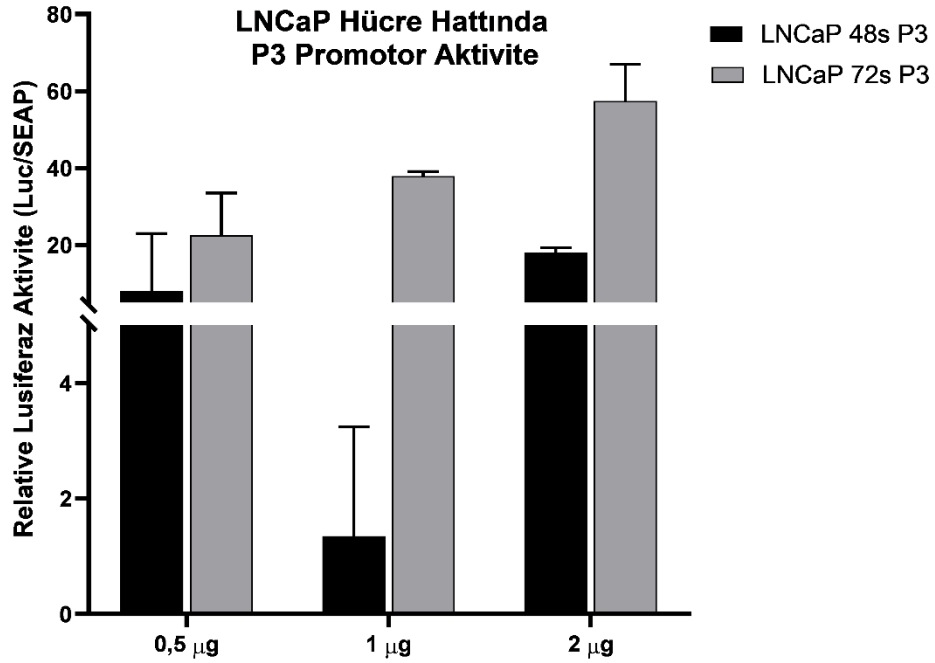


**Şekil 4.100:** LNCaP hücre hattında 1104 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0.5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.





Şekil 4.101: LNCaP hücre hattında 760 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0,5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.



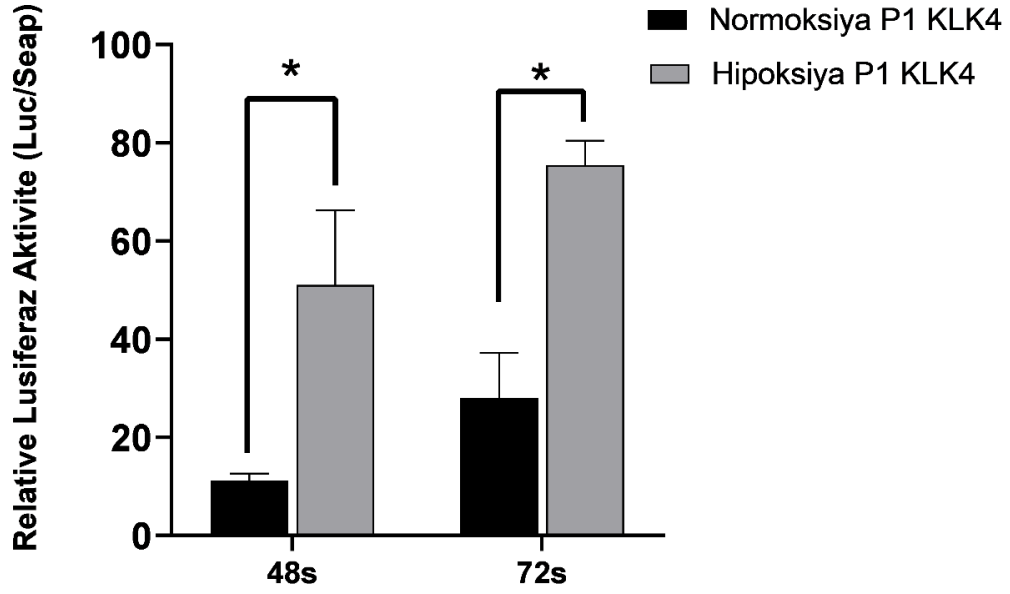
Şekil 4.102: LNCaP hücre hattında 391 bç KLK4 promotor içeren vektör optimizasyon deneyi (0,5µg, 1µg ve 2µg vektör uygulanması) ile bazal aktivite tespiti.

#### **4.7.4 Geçici Transfeksiyon ile Promotor Parçalarının Hipoksik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi**

KLK4 promotorların bazal aktivite deneyleri için PC-3 hücreleri DMEMF12, %10 FCS ve son konsantrasyonda 1X antibiyotik-antimikotik içeren ortamda büyütüldü. Ardından 12 well plakalara 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler yayıldı. Antibiyotiksiz ortama alınan hücrelere tüm promotorlar (1104bç, 760bç, 391bçve 102bç) 1µg + 0.5µg SEAP2 kontrol plazmiti, 3 tekrarlı olarak uygulandı. Transfeksiyon etkinliğinin ve lusiferaz ölçümlerinin kontrolü için herhangi bir promotor içermeyen boş pMetLuc Reporter 0.5µg + Seap2 0.5µg ve pMetLuc Kontrol plazmiti 0.5µg + Seap2 0.5µg farklı kuyulara uygulandı. Transfeksiyondan 2 saat sonra hipoksik plakalara 150 µM olacak şekilde kimyasal hipoksi oluşturan CoCl<sub>2</sub> uygulandı. 48 ve 72 saat sonunda kuyulardan medyumlar ölçüm için toplandı. Luminometre ile ölçümleri yapıp ve analizleri yapıldı.

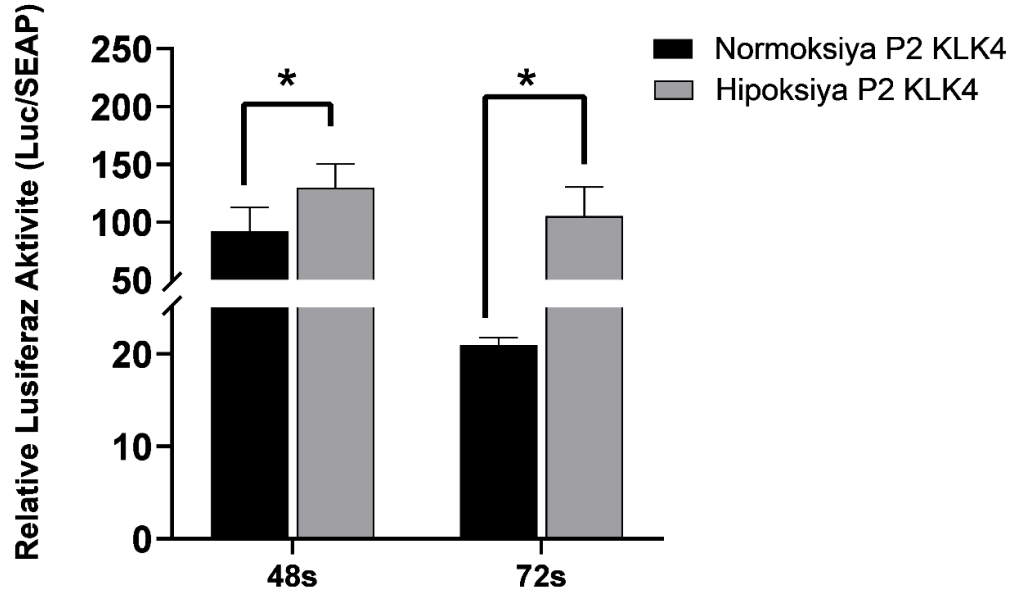
Herbir promotor parçasının normal koşullardaki aktivitesi, CoCl<sub>2</sub> uygulanmış kimyasal hipoksi modelindeki aktivitesi ile karşılaştırıldı. Tüm promotor parçalarının hipoksik koşullarda özellikle 48 saatte aktivitelerinin arttığı tespit edildi (Şekil 4.103-106.) 48 saatte bazal aktivitesi en yüksek promotor parçası 760 bç (P2) olarak tespit edildi.

### PC-3 Hücre Hattında P1 KLK4 Promotor Hipoksik Aktivite

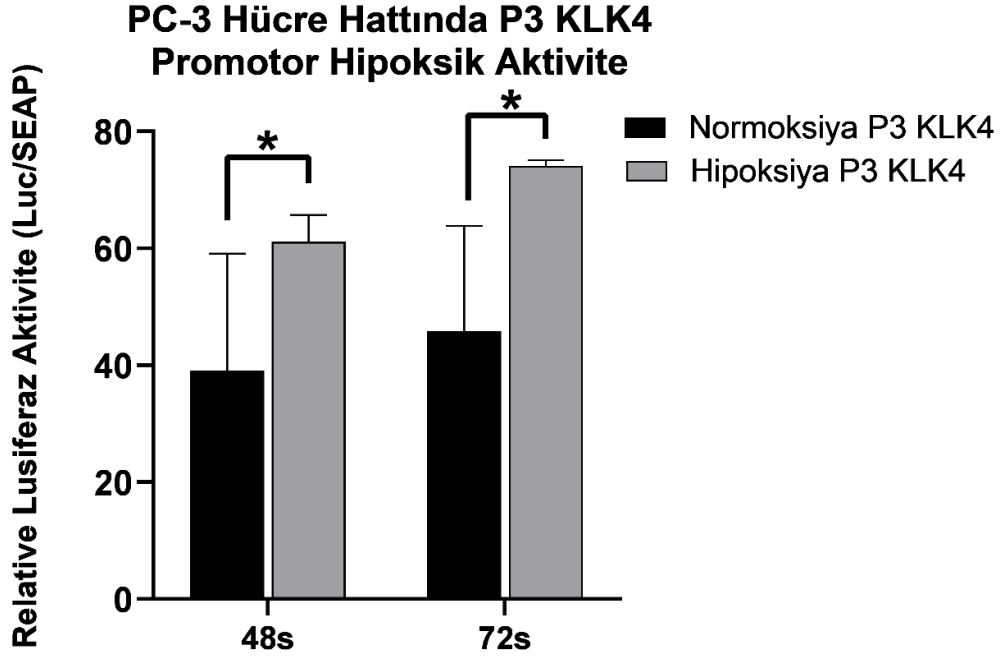


Şekil 4.103: 1104 bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler.

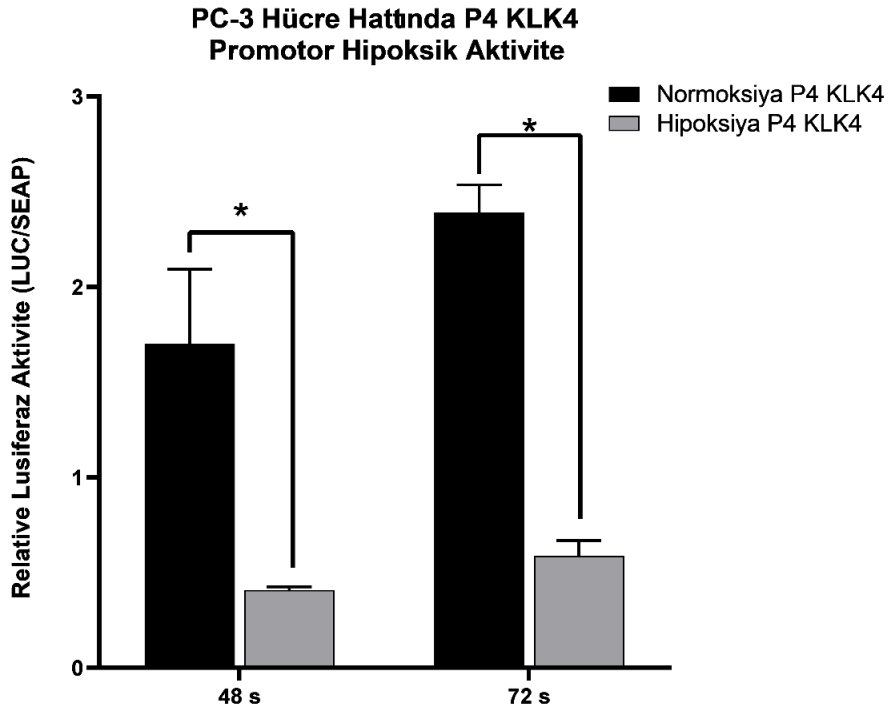
### PC-3 Hücre Hattında P2 KLK4 Promotor Hipoksik Aktivite



Şekil 4.104: 760 bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler.



Şekil 4.105: 391bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler.



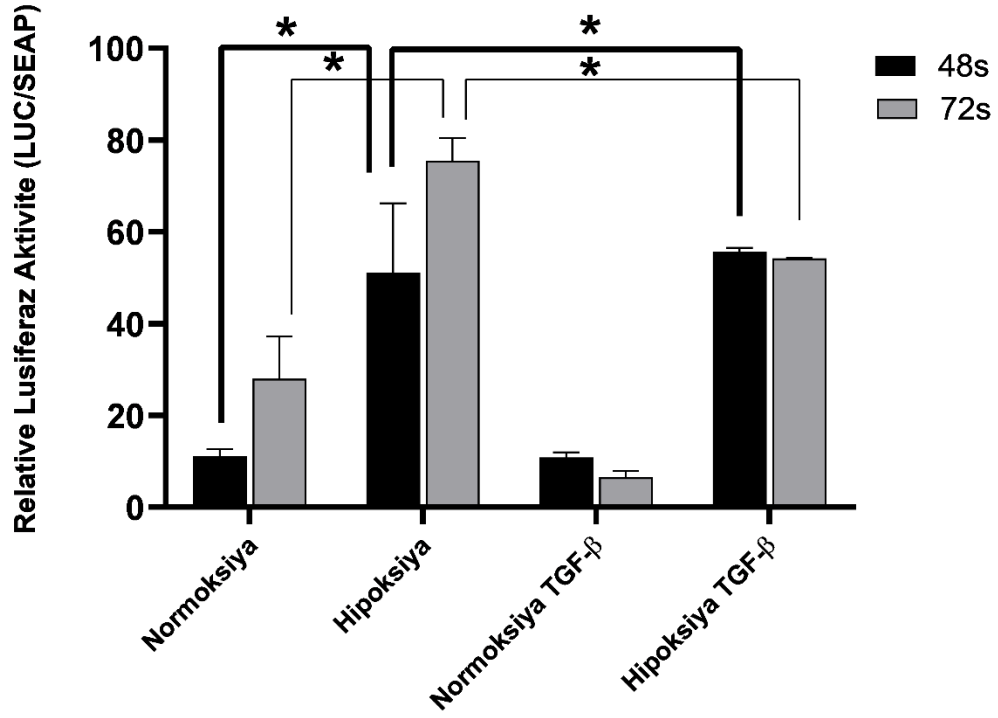
Şekil 4.106: 102bç KLK4 Promotoru Hipoksik Aktivite 48 ve 72 saatler.

#### 4.7.5 TGF- $\beta$ ' nın Promotor Parçalarının Normoksik ve Hipoksik Aktivitelerine Etkisi

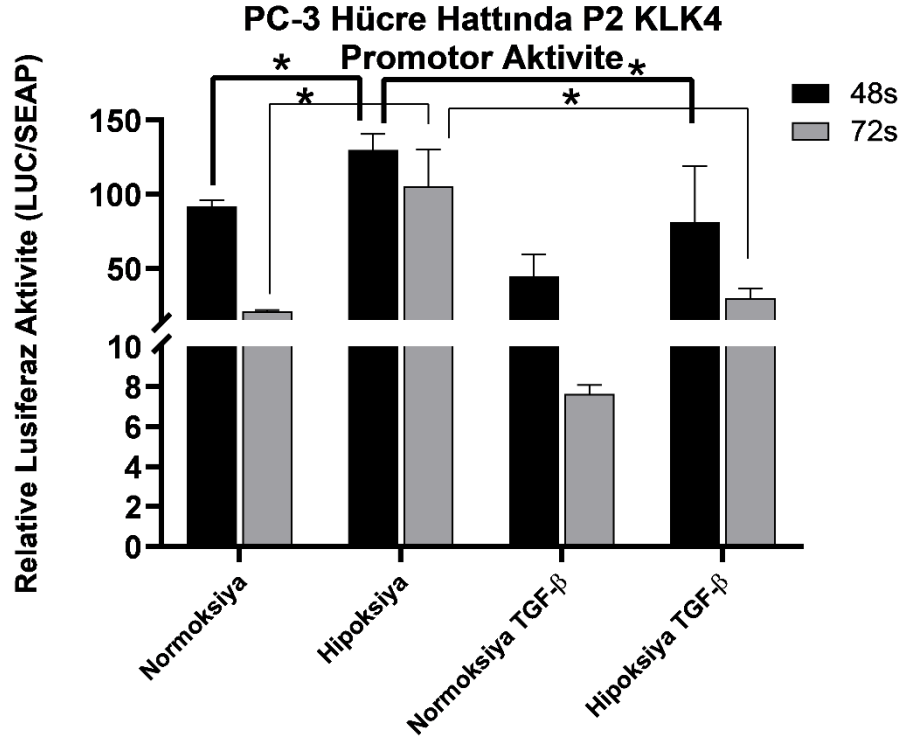
TGF- $\beta$ ' nın KLK4 promotorlarına normal ve hipoksik koşullardaki etkisi için büyütülen PC-3 hücreleri 250.000 hücre olacak şekilde bir gün öncesi plakalara yayıldı. Daha sonra tüm promotorlar (1104bç, 760bç, 391bç ve 102bç) 1 $\mu$ g + 0.5 $\mu$ g SEAP2 kontrol plazmiti, 3 tekrarlı olarak uygulandı. Transfeksiyondan 2 saat sonra 500 $\text{Ü}$  (20ng/mL) TGF- $\beta$  sitokini uygulaması yapıldı. Bu işlemler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 48 ve 72 saat sonunda kuyulardan medyumlar ölçüm için toplandı. Bu analizler sonucunda en yüksek doz olan 500 $\text{Ü}$ /ml (20ng) Human TGF- $\beta$  kullanılmasına karar verildi. Ardından tüm KLK4 promotorları için TGF- $\beta$  sitokininin etkisi için transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Yine 12 well plakalara yayılan hücrelere 24 saat sonunda 1 $\mu$ g promotor+0.5 $\mu$ g SEAP2 uygulandı. Ayrıca transfeksiyon etkinliği ve Lusiferaz ölçümlerinin kontrolü için pMetLuc Kontrol plazmiti (0.5 $\mu$ g) ve herhangi bir promotor parçası içermeyen boş pMetLuc Reporter vektörü 0.5 $\mu$ g + 0.5 $\mu$ g SEAP2 kontrol plazmiti de farklı bir grup hücreye uygulandı. Tüm kuyular 3 tekrarlı olarak çalışıldı. 48 ve 72 saat sonunda medyumlar toplanarak luminometrede ölçümleri gerçekleştirildi.

1104bç promotor parçası üzerinde 500 $\text{Ü}$  TGF- $\beta$ ' nın normal koşullarda özellikle 72 saatte aktivite azalışına sebep olduğu tespit edildi. Hipoksi ve TGF-  $\beta$ ' nın etkisi analiz edildiğinde yine 72 saatte azaltıcı etkisinin sadece hipoksik grupla karşılaştırıldığında korunduğu ancak hipoksinin etkisi ile bu azaltıcı etkinin keskin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.107). 760bç promotor parçası incelendiğinde TGF-  $\beta$ ' nın normal ve hipoksik koşullarda bazal aktivite üzerinde azaltıcı etkisi tespit edildi (Şekil 4.108). 391bç incelendiğinde ise TGF-  $\beta$ ' nın azaltıcı etkisinin hem normal hemde hipoksik grupta en güçlü olduğu görüldü (Şekil 4.109). 102 bç incelendiğinde ise normal koşullarda TGF- $\beta$ ' nın azaltıcı etkisinin çok güçlü olduğu görülmektedir (Şekil 4.110).

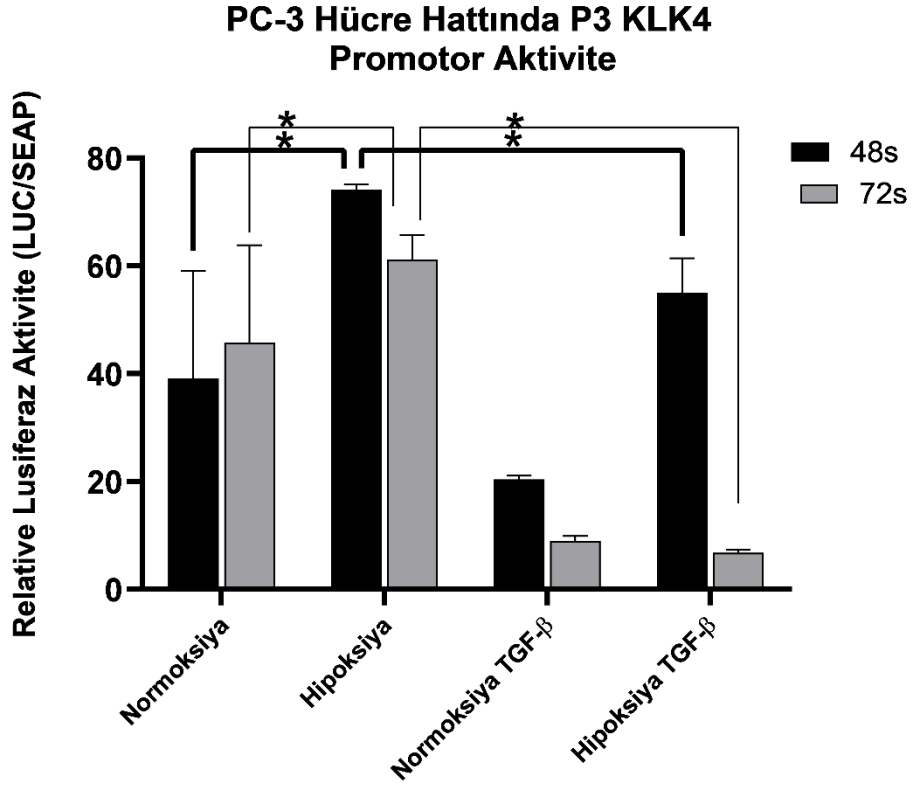
### PC-3 Hücre Hattında P1 KLK4 Promotor Aktivite



Şekil 4.107: 1104bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl<sub>2</sub>) etkisi



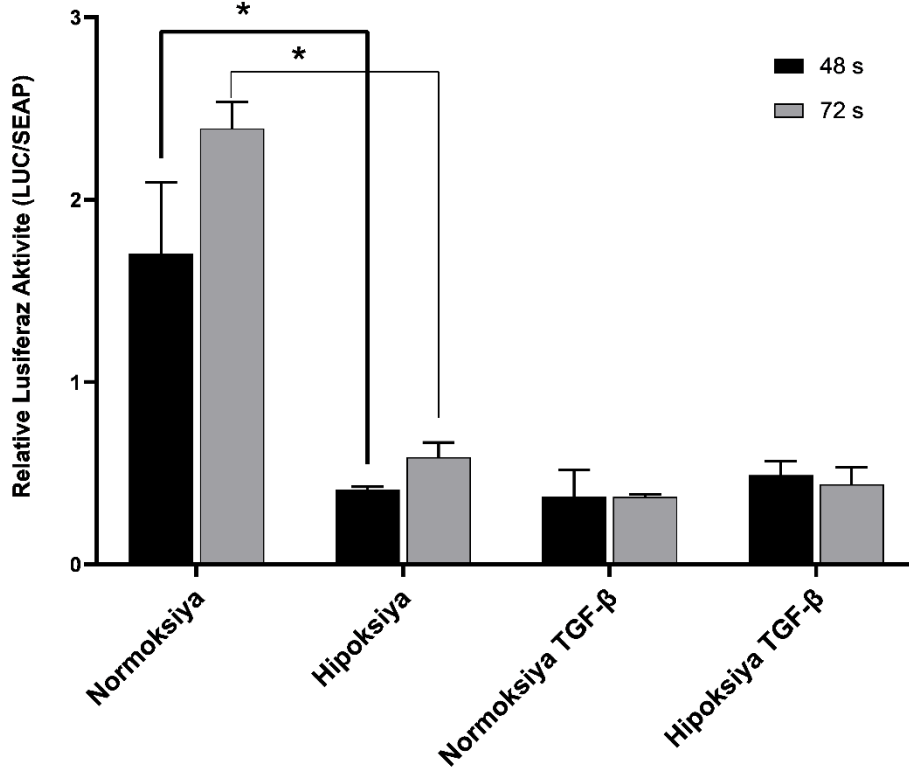
**Şekil 4.108:** 760bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl<sub>2</sub>) etkisi



Şekil 4.109: 391bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl<sub>2</sub>) etkisi



### PC-3 Hücre Hattında P 4 KLK4 Promotor Aktivite

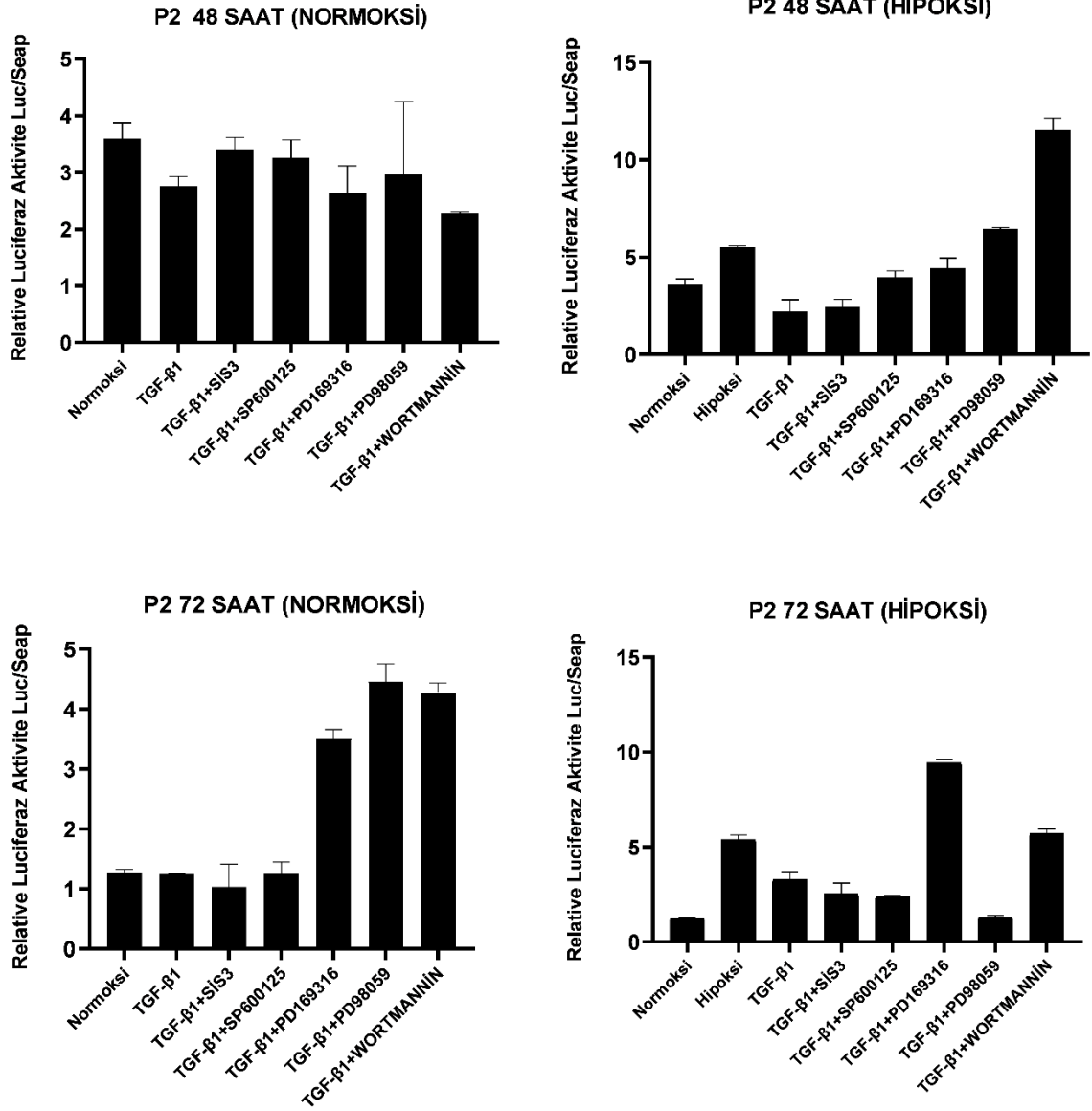


Şekil 4.110: 102bç KLK4 promotor parçası üzerinde TGF-β (500Ü)ve hipoksinin (150µM CoCl<sub>2</sub>) etkisi.

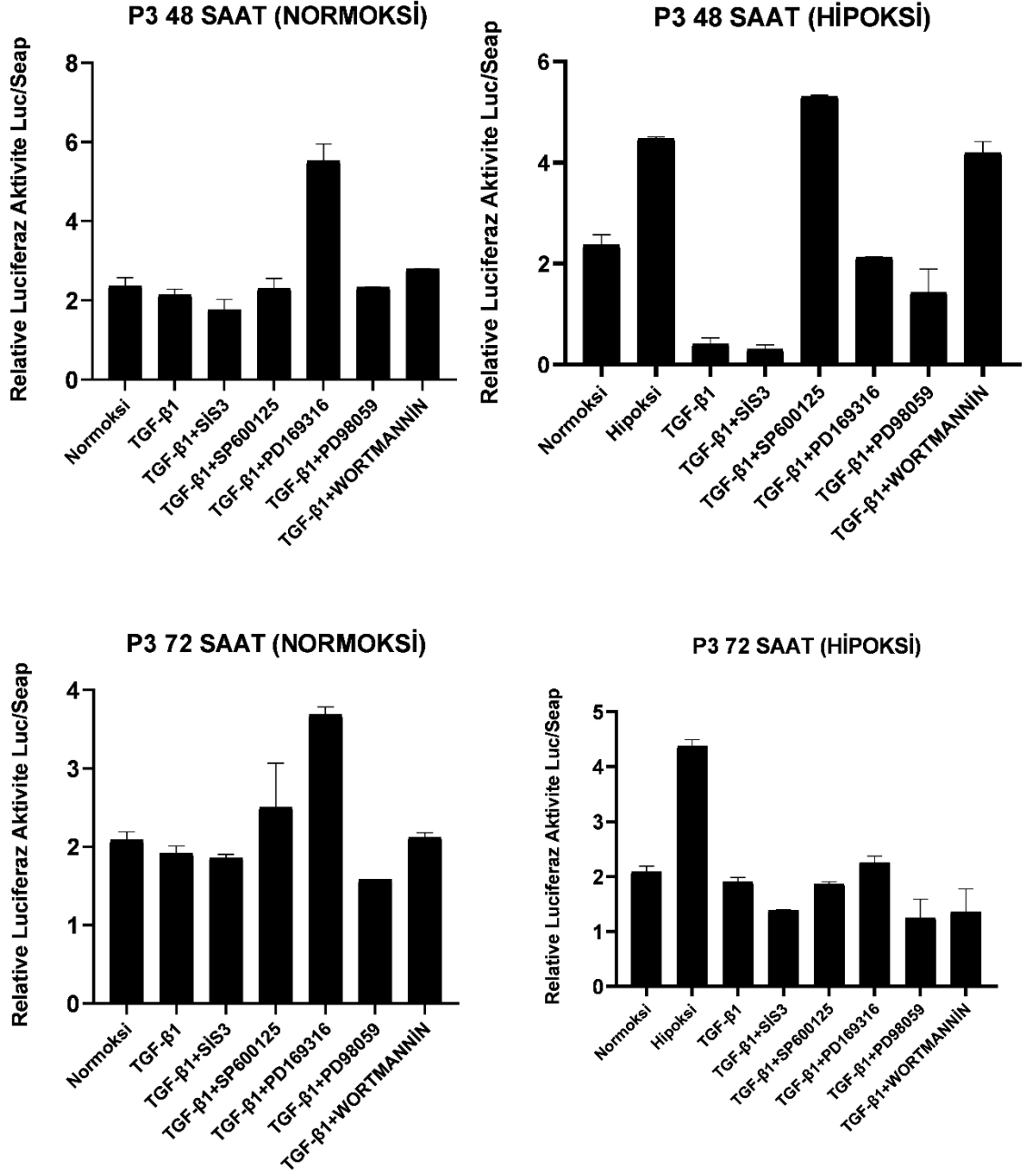
#### 4.7.6 KLK4 760 bç ve 391bç Promotor Parçalarının İnhibisyon Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Yolak inhibitörlerinin KLK4 promotorlarına normal ve hipoksik koşullardaki TGF-β' nın etkisi için PC-3 hücreleri DMEMF12 Mix, % 10 FCS ve son konsantrasyonda 1X antibiyotik-antimikotik içeren ortamda büyütüldü. Ardından 6 well plakalara hücreler yayıldı ve bir gün sonra sitokin içeren kuyular % 0,1 BSA (Bovine Serum Albumin) içeren medyuma ve antibiyotiksiz ortamda promotorların transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 1 saat sonra 150 µM CoCl<sub>2</sub> ve 1 saat sonra ise 500Ü/ml (20ng/ml) TGF-β sitokini uygulaması yapıldı. Bir sonraki gün hücreler tekrar kaldırılıp sayılarak 96 well plakalara yayıldı. Bu işlemler 8 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 48 ve 72 saat sonunda kuyulardan medyumlar Lusiferaz ve SEAP ölçümleri için toplandı. Luminometre ile ölçümleri yapıldı ve analizleri yapıldı.

KLK4 promotorlarından en yüksek bazal aktiviteye sahip olan 760 bç ve 391 bç' lik promotorlarının PC-3 hücrelerindeki ifadeleri incelendiğinde, 760 bç lik promotorun 48 saat ve 72 saatte hipoksik koşullarda ifadesinin arttığı, yine 48 ve 72 saatte normoksik ve hipoksik TGF- $\beta$  da ise ifadesinde azalma olduğu görülmektedir. SMAD inhibitörü olan SİS3 uygulanan gruplarda ise hipoksik koşullarda inhibisyonun gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.111). 391 bç' lik promotorun ifadesi incelendiğinde, 48 ve 72 saat dilimlerinde normoksik ve hipoksik TGF- $\beta$  da ifadesinin azaldığı, hipokside ise aktivitesinin 6 kat arttığı görülmektedir. SMAD yolu inhibisyonu için uygulanan SİS3 grupları incelendiğinde ise, normoksik ve hipoksik koşullarda her iki saat diliminde de aktivitesinin azaldığı görülmektedir (Şekil 4.112).



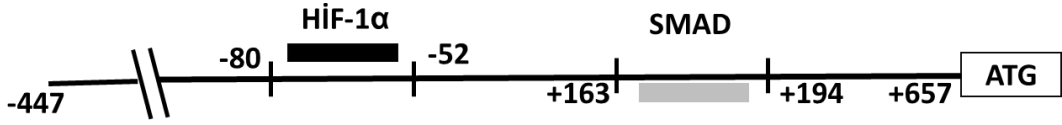
**Şekil 4.111:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda KLK4 760bç promotörünün, yolak inhibitörleri üzerindeki transkripsiyonel aktivitesi.



**Şekil 4.112:** PC-3 hücre hattında normoksik ve hipoksik koşullarda KLK4 391bc promotorunun, yolak inhibitörleri üzerindeki transkripsiyonel aktivitesi.

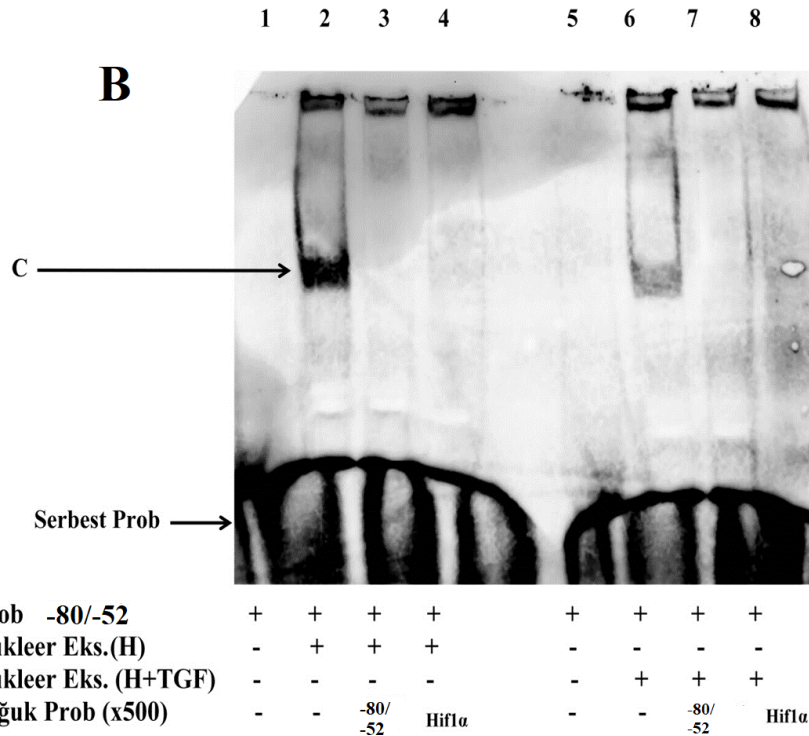
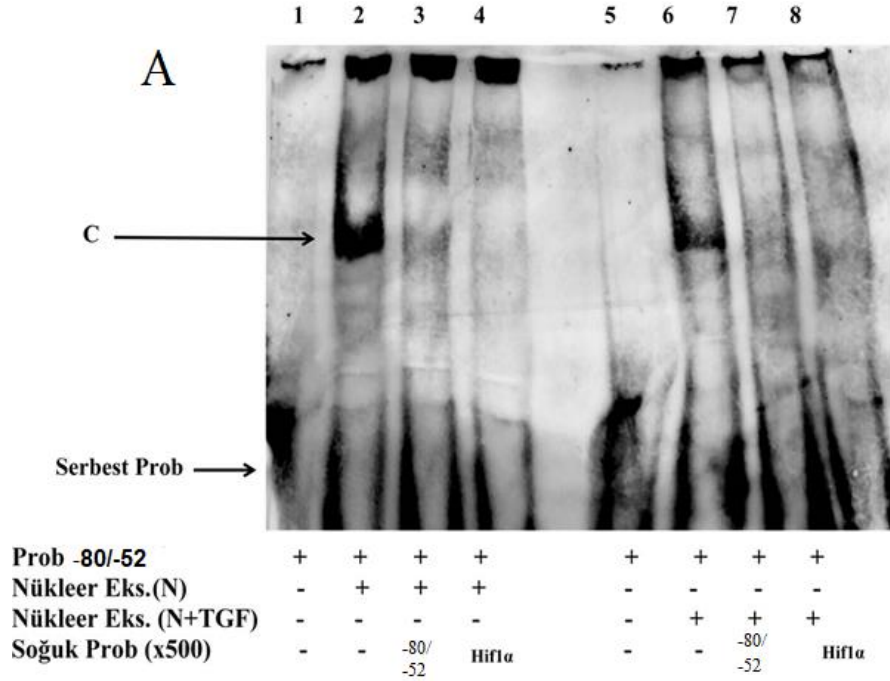
#### 4.8 EMSA Çalışmaları

Emsa çalışmaları için yapılan tüm işlemler bölüm 3.2.14' de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. EMSA'da analiz edilmek üzere KLK4 promotor bölgesinde olası transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri analiz edildi ve olası SMAD ve HİF-1α bölgesi belirlendi. Belirlenen bölgeler Şekil 4.113' de gösterilmiştir. Bu bölgelere ait problr biotinlenerek EMSA analizleri gerçekleştirildi.



**Şekil 4.113:** KLK4 promotorunda dizayn edilen EMSA primerlerinin temsili şekli.

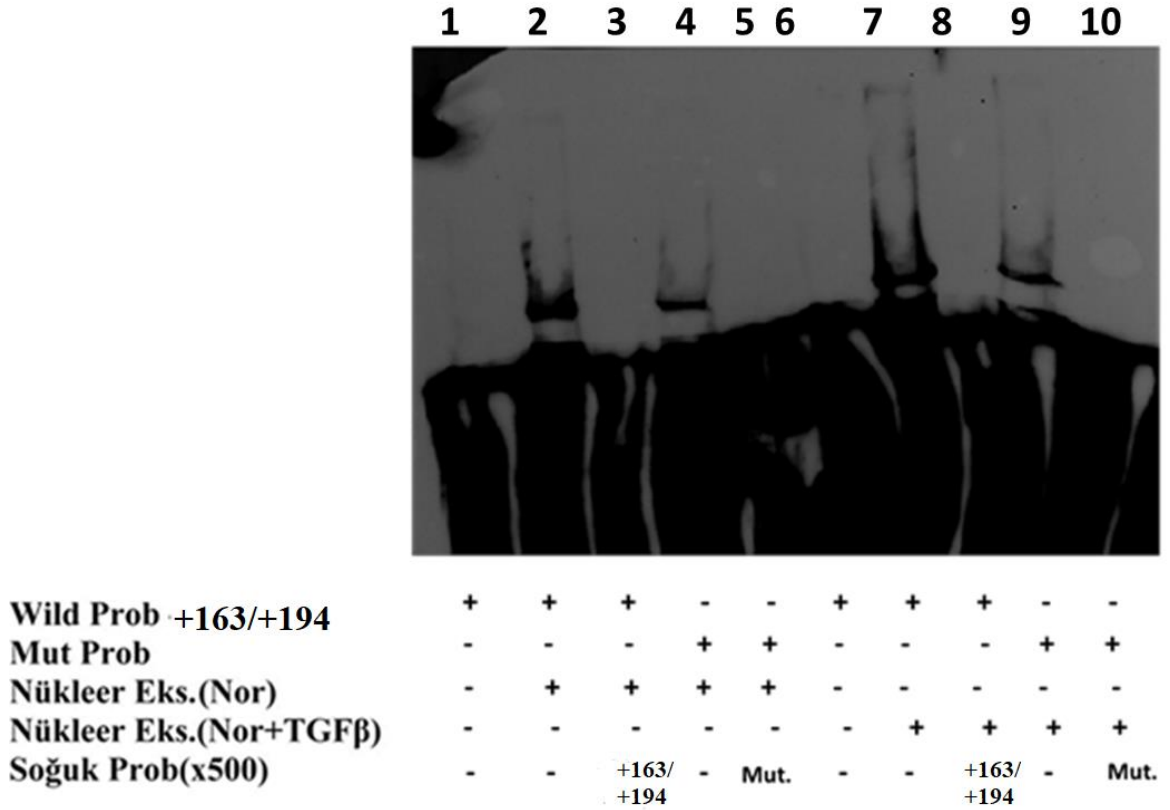
PC-3 hücrelerine ait nükleer ekstraktları ile yapılan çalışmalarda ilk olarak HIF-1 $\alpha$  bölgesi için tasarlanan -80/-52 bölgeye ait problr çalışıldı. Bu amaçla PC-3 hücrelerinde Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları hazırlandı. Ayrı ayrı kurulan bağlanma reaksiyonları ile şekil 4.114 A' da görülen 2. ve 6. kuyularda ve şekil 4.114 B' de görülen 2. ve 6. kuyulardaki kompleks yapısı C harfi ile gösterilmiştir. Yani HIF-1 $\alpha$  bölgesi için tasarlanan problr PC-3 Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları ile kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanmanın spesifik olduğunu belirlemek için hem -80/-52 bölgeye ait biotinsiz problarla hem de HIF-1 $\alpha$  consensus dizisine ait biotinsiz problarla 500 kat olacak şekilde yarışma deneyleri yapıldı. Yine şekil 114A' da 3. ve 7. kuyularda şekil 4.114 B' de 3. ve 7. kuyularda silinen kompleks bize elde edilen kompleksin gerçekten -80/-52' luk bölgeye ait olduğunu; şekil 114 A' da 4. ve 8. kuyularda, şekil 4.114 B' de 4. ve 8. kuyularda silinen kompleksin gerçekten HIF-1 $\alpha$ ' ya ait olduğunu kanıtlamaktadır. Bu da KLK4 promotor bölgesinde -80/-52' luk bölgede HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olduğunun, KLK4' ün hipoksik şartlardaki elde ettiğimiz regülasyonunun teyidi olmuştur. Ayrıca PC-3 normoksik ve hipoksik nükleer ekstraktlar birbiriyle kıyaslandığında oluşan kompleksin hipoksik şartlardaki artan kuvveti bize gerçekten de KLK4' ün hipoksik şartlarda artış gösterdiğini bir kez daha kanıtlamaktadır.



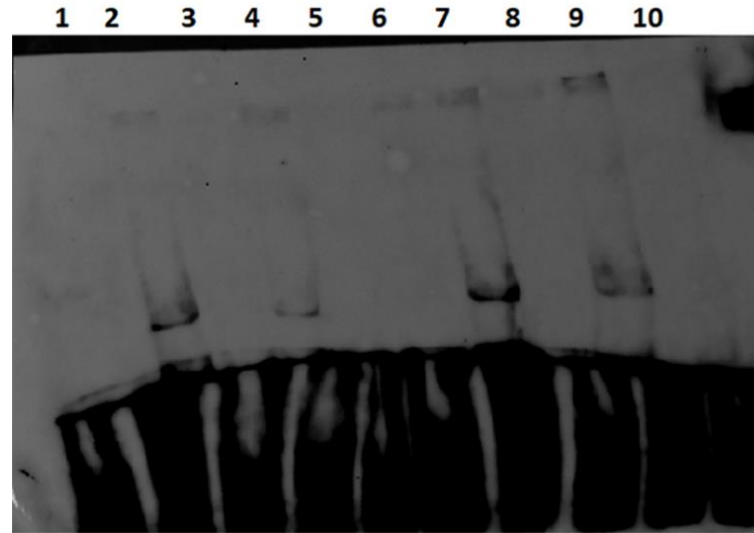
**Şekil 4.114:** KLK4 HRE bağlanma bölgesine göre dizayn edilen HİF-1 $\alpha$  (-80/-52) bölgesinin PC-3 hücrelerinde, KLK4 promotör bölgesinin EMSA sonucu (C: DNA-protein kompleksi).

PC-3 hücrelerine ait nükleer ekstraktları ile yapılan çalışmalarda üçüncü olarak olası SMAD bağlanma bölgesi için tasarlanan +163/+194 bölgeye ait problemler de çalışıldı. Bu

amaçla PC-3 hücrelerinde Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları hazırlandı. Aynı ayrı kurulan bağlanma reaksiyonları ile Şekil 4.111 de görülen 2., 7. Kuyularda ve Şekil 4.115’ de ve 4.116’ da görülen 2. ve 7. kuyulardaki kompleks yapısı C harfi ile gösterilmiştir. Yani SMAD bölgesi için tasarlanan problr PC-3 Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları ile kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanmanın spesifik olduğunu belirlemek için hem +163/+194 bölgeye ait biotinsiz problrarla 500 kat olacak şekilde yarışma deneyleri yapılmıştır. +163/+194 bölgede olduğu düşünülen SMAD bölgesi için delesyon problrarda tasarlandı. Bu amaçla kurulan bağlanma reaksiyonlarında sinyalin kaybolması ön görülmektedir ancak şekil 4.115’ de 4. ve 9. kuyularda, şekil 4.116’ da 4. ve 9. kuyularda sinyali azalan kompleksin SMAD bölgesi için olası olduğunu ancak +163/+194’ lik dizi üzerinde farklı bir SMAD bağlanma bölgesinde olabileceğinin kanıtıdır. Bu sebeple sinyal tamamen kaybolmamış ancak zayıflamıştır.



**Şekil 4.115:** KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin PC-3 hücrelerinde normal oksijen koşullarında ve normoksik TGF- $\beta$  da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu.



<b>Wild Prob +163/+194</b>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<b>Mut Prob</b>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<b>Nükleer Eks. (HİP)</b>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>Nükleer Eks. (HİP) + TGF</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<b>Soğuk Prob(x500)</b>	-	-	+163/ +194	-	Mut.	-	-	+163/ +194	-	Mut.

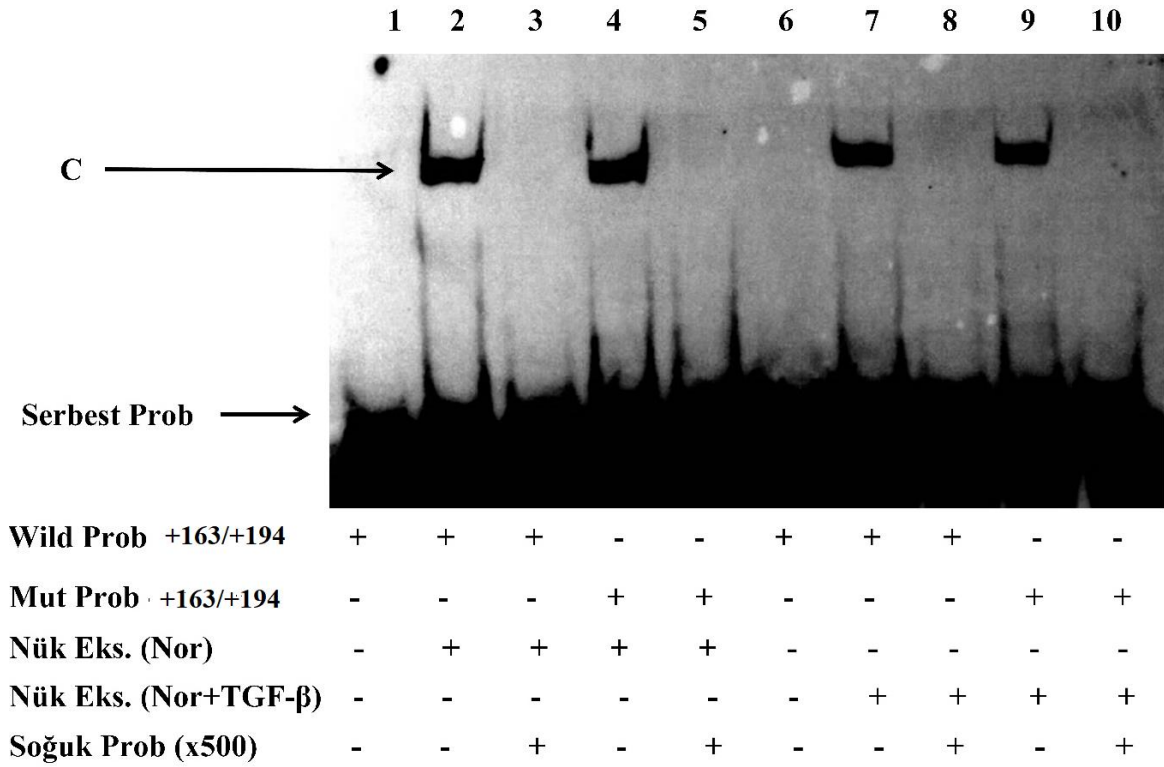
**Şekil 4.116:** KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin PC-3 hücrelerinde hipoksik koşullarda ve hipoksik TGF- $\beta$  da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu.

PC-3 hücrelerinde -80/-52 bölgesinin HİF bağlanma bölgesinin EMSA ile teyidi yapıldığından LNCaP hücrelerinde sadece SMAD bağlanma bölgesinin belirlenmesi için PC-3'lerde +163/+194 bölge için yapılan deneyler benzer şekilde yapıldı. Bu amaçla LNCaP hücrelerine ait nükleer ekstraktları ile yapılan çalışmalarda olarak olası SMAD bağlanma bölgesi için tasarlanan +163/+194 bölgeye ait proplar çalışıldı. Bu amaçla LNCaP hücrelerinde Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları hazırlandı. Ayrı ayrı kurulan bağlanma reaksiyonları ile Şekil 4.117' de görülen 2. ve 7. kuyularda ve Şekil 4.118' de görülen 2. ve 7. kuyulardaki kompleks yapısı C harfi ile gösterilmiştir. Yani SMAD bölgesi için tasarlanan proplar LNCaP Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları ile kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanmanın spesifik olduğunu belirlemek için hem +163/+194 bölgeye ait biotinsiz proplarla 500 kat olacak şekilde yarışma deneyleri yapılmıştır. Yine Şekil 4.117' de 3. ve 8. kuyularda Şekil 4.118' de 3. ve 8. kuyularda

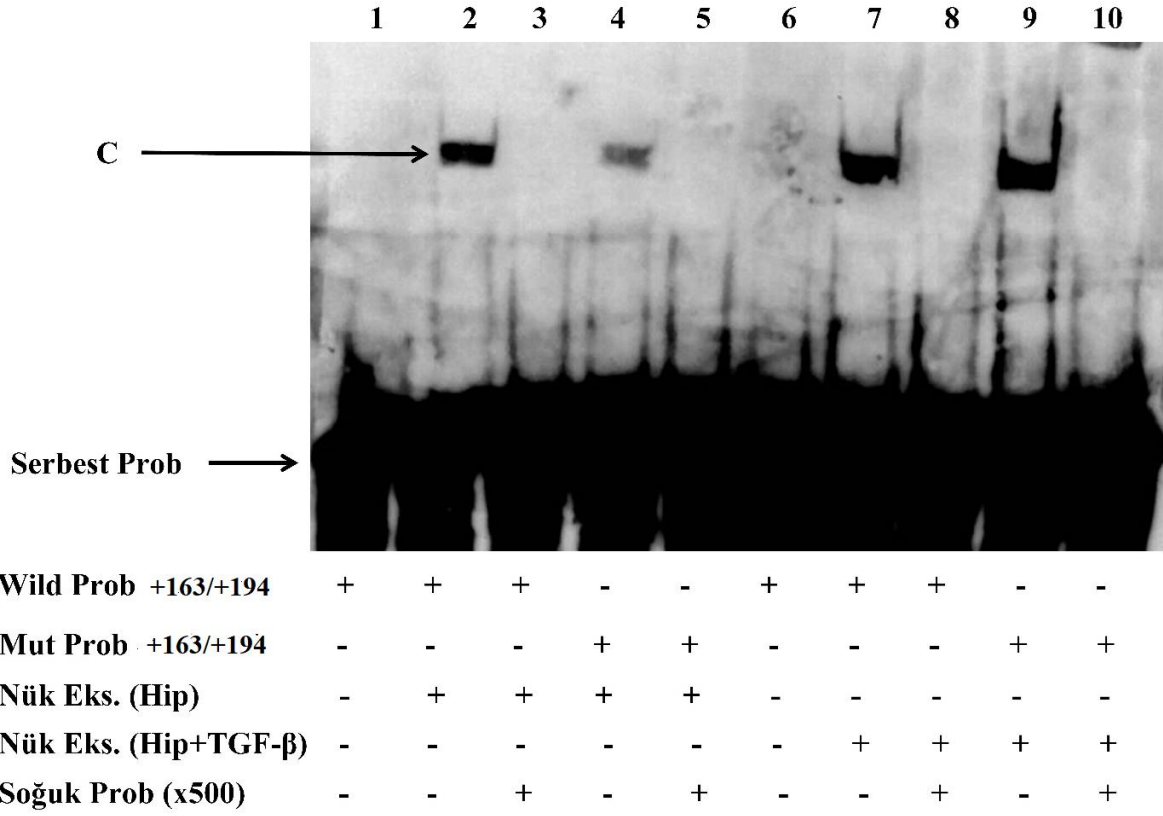


silinen kompleks bize elde edilen kompleksin gerçekten +163/+194 bölgeye ait olduğunu göstermektedir.

Ayrıca +163/+194 bölgesinde olduğu düşünülen SMAD bölgesi için delesyon proplarında tasarlandı. Bu amaçla kurulan bağlanma reaksiyonlarında sinyalin kaybolması ön görülmektedir ancak Şekil 4.117’ de 4. ve 9. kuyularda, şekil 4.118’ de 4. ve 9. kuyularda sinyali azalan kompleksin SMAD bölgesi için olası olduğunu ancak sinyalin tamamen kaybolmamış zayıflamış olması farklı bir SMAD bağlanma bölgesinde olabileceğini düşündürmektedir.



**Şekil 4.117:** KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin LNCaP hücrelerinde normal oksijen koşullarında ve normoksik TGF-β da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu (C: DNA-protein kompleksi).



**Şekil 4.118:** KLK4 SMAD bağlanma bölgesine göre dizayn edilen SMAD (+163/+194) bölgesinin LNCaP hücrelerinde hipoksik koşullarda ve hipoksik TGF-β da, KLK4 promotor bölgesinin EMSA sonucu (C: DNA-protein kompleksi).

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kallikreinler, ilk olarak kininojenaz aktiviteleri ve kininojenlerden vazoaktif peptit (lys) bradikinin üretme yetenekleri ile tanımlanan serin proteazların bir alt grubu olarak pankreas özütlerinde tanımlanmıştır (Kraut vd. 1930, Werle E. 1934). İnsan genomundaki en büyük proteaz geni kümesi tarafından kodlanmakta ve yüksek oranda korunmuş 15 serin proteazdan oluşmaktadır (Clements vd. 2001, Tefekli 2012, Emami ve Diamandis 2008, Korkmaz vd. 2004, Xi vd. 2004). Bu ailenin üyesi olan 15 KLK geni 19q13.4 kromozomu üzerinde insan KLK lokusunda kümelenmiştir (Kontos ve Scorilas 2012, Diamandis vd. 2000, Lundwalla ve Brattsandb 2008). Çeşitli türlerde bugüne kadar tanımlanan tüm doku kallikrein genlerinin ortak özellikleri, beş ekzonun benzer bir genomik organizasyonu, serin proteaz katalitik aktivitesi için korunmuş bir amino asit rezidüsü ve birinci ekzonda kodlanmış bir sinyal peptid dizisini içermeleridir (Korkmaz 2004).

Normal ve neoplastik prostat dokuları üzerinde yapılan çalışmalarda, prostata spesifik antijen KLK3 (PSA olarak da bilinir), glandüler kallikrein 2 (KLK2), TMPRSS2 ve prostaz/ KLK4 (diğer isimleri: PRSS17/EMSP1) yüksek oranda ifade oldukları ve androjenik hormonlar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Matsumura vd. 2005).

Kallikrein ile ilgili peptidaz 4 (KLK4), androjenler tarafından düzenlenen ve ekspresyonu prostat için oldukça spesifik olan ve prostat kanseri kemik metastazlarında bol miktarda bulunmaktadır (Xi vd. 2004, Fuhrman-Luck vd. 2016). KLK4; KLK-L1, PRSS17, AI2A1, ARM1, EMSP, EMSP1, PSTS olarak da bilinir (Obiezu vd. 2001). 254 amino asitten oluşan KLK4, bir salgılama sinyaline (pre-) peptit (26 amino asit), ardından bir aktivasyon (pro-) peptit (4 amino asit) ve 1 potansiyel N-bağlı glikosilasyon yerine sahip olgun zincir (224 amino asit) bulunur. His71, Asp116, Ser207 (Met = 1' e göre ve ekzon 1' de ATG1 tarafından kodlanan) katalitik üçlüsü korunur ve proteolitik aktivite için gereklidir. Bir KLK4 tam uzunlukta protein olarak sentezlendikten sonra, sinyal peptidi çıkarılır ve pro-KLK4 (zimogen) daha sonra hücreden salgılanır. Aktivasyon üzerine, olgun aktif enzimi üretmek için propeptit uzaklaştırılır. KLK4 geni orijinal olarak PRSS17 geni olarak adlandırılmıştır ve EMPS1 (Enamel matrix serine protease 1) proteinini kodlayan dejenere primerler kullanılarak domuzda gelişmekte olan diş emaye epitel hücrelerinden ilk olarak klonlanmıştır (Lai vd. 2009).

Literatür incelendiğinde RT-PZR deneyleri ile yapılan çalışmalarda meme, yumurtalık, endometriyum, tükrük bezi, akciğer, adrenal bez, kolon, trakea da KLK4' ün ifade olduğu gösterilmiştir. Northern blot analizi ile insan dokularındaki daha sonraki çalışmalar, KLK4 mRNA ekspresyonunun prostata ağırlıklı olarak lokalize olduğunu göstermiştir; beyin, testis, omurilik, tiroid, deri ve böbrek de düşük ile orta seviyelerde KLK4 mRNA' yı ifade ettiği gösterilmiştir. KLK4 mRNA, in situ hibridizasyon deneyleriyle yağ bezlerinde, ter bezlerinde, kıl folikülleri, stratum bazale, stratum spinosum ve stratum granulosumda da tespit edilmiştir. (Dong vd. 2001, Majumdar ve Diamendis 1999, Lai J. 2009). Yapılan bir çalışmada, KLK4 ekspresyonunun, prostat kanseri kaynaklı LNCaP hücre hattında androjenler tarafından yukarı regüle edildiği ve meme karsinoması hücre hattı BT-474' te hem androjenler hem de progesterinler tarafından yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Obiezu vd. 2001). KLK4, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasının desteklenmesinde ve genel olarak, siklin B1 ve E2F1 gibi hücre döngüsü ile ilgili genlerin düzenlenmesi yoluyla malign fenotip değişikliklerinde eşsiz bir role sahip olduğu gösterilmiştir. (Avgaris vd. 2012).

PSA (KLK-3) ve diğer KLK' lar arasındaki yapısal benzerlik göz önüne alındığında, ailenin kalan üyelerinin kanser biyobelirteçleri olarak potansiyel rolü son yıllarda çokça araştırılmıştır. Yakın tarihli araştırmalar, KLK2 ve KLK4 dahil diğer KLK' ların testislerde üretildiğini ve dolayısıyla testis kanseri için biyolojik belirteç olabileceğini önermektedir. Biyolojik belirteç olarak kullanımlarının dışında, kanser patogenezinde bir dizi kritik işlevsel rolünün tespiti KLK' ların terapötik hedefler olarak potansiyel kullanımlarını da ortaya çıkarmıştır (Emami ve Diamandis 2008, Kontos ve Scorilas 2012, Kryza vd. 2017).

Hipoksi, kanser dahil birçok hastalıkta meydana gelen normal doku oksijen konsantrasyonunda bir azalmadır. Prostat içindeki hipoksik bir mikro ortamın ikincil genetik değişikliklerin ve anjiyogenik stimülasyonun desteklenmesinden sorumlu olduğu ve daha agresif bir hücre fenotipi ve malign progresyona yol açtığı ileri sürülmüştür. HIF (hipoksi indüklenebilir transkripsiyon faktörü)' ler, hedef promotorlardaki 5'-RCGTG-3' çekirdek dizisine bağlanır ve 200' den fazla fonksiyonel olarak farklı genleri indükler. HIF1' in sentezi oksijenden bağımsız mekanizmalar yoluyla gerçekleşir, fakat bozulması

oksijene bağımlıdır ve prolil hidroksilaz, asparaginil hidroksilaz, Von Hippel-Lindau proteinleri aracılığıyla proteozomal yol ile parçalanır.

HIF-1 $\alpha$  , birçok insan kanserinde aşırı eksprese edilmesine rağmen HIF-1 $\alpha$ ' nın kanser ilerlemesindeki rolü belirsizdir. Renal ve meme kanseri hücre hatlarında yüksek HIF-1 $\alpha$  konsantrasyonlarının kanser hücresi sağkalımını arttırdığı, yumurtalık kanserinde ise yüksek HIF konsantrasyonlarının apoptozis artışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Semenza vd., 2003). Dai ve arkadaşları, akut hipoksinin HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu ve üç PC hücre hattının motilitesini ve invazif kapasitesini arttırdığını bildirmişlerdir (Dai vd., 2011).

Çalışmamızda PC-3 ve LNCaP hücrelerinde kimyasal bir ajan olan CoCl<sub>2</sub> ile hipoksik model oluşturulmuştur. Dokudaki oksijen seviyesinin normalin altına düşmesine hipoksiya denir (Selvendiran vd. 2009). Bu duruma daha çok katı tümörlerde rastlanılır. Bu tümör hücreleri yeterli oksijeni alamadığında hücre ölümüne gitmezler bir takım genetik farklılıklar yaparak oksijensiz ortama uyum sağlarlar. Yapılan birçok klinik çalışmalar hipoksik ortamın artmasıyla tümörün de büyüdüğünü göstermektedir (Çekin 2007). Sonuç olarak tümör hücreleri, agrasif hale gelirler (Selvendiran vd. 2009). Şimdiye kadar normalin altında olan oksijen koşullarına cevap olarak HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 ailesi üyesi bulunmuştur. Bu ailenin üyeleri normal oksijen seviyelerinde  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerine ayrışır (Kakudo vd. 2015, Türkoğlu vd. 2021).

Çalışmamızda seçtiğimiz iki hücre hattında öncelikli olarak kimyasal hipoksi modeli oluşturulmuştur. Öncelikle modelin doğrulanması mRNA ve protein seviyesinde Real-Time PZR ve western blot ayrıca yine protein seviyesinde IFC yöntemi ile doğrulanmıştır. Sonrasında TGF- $\beta$  sitokininin ve hipoksik koşulların hücre proliferasyonuna etkisi MTT testi ile araştırılmıştır.

PC-3 ve LNCaP hücreleri kültür ortamında büyütüldü ve son konsantrasyonu 150  $\mu$ M olacak şekilde CoCl<sub>2</sub> eklenerek kimyasal şartlarda hipoksik koşul oluşturuldu (Turkoglu ve Koçkar, 2016). Çalışmamızda TGF- $\beta$  sitokinin hipoksik modelde hücre proliferasyonuna olan etkisi de çalışıldı. Sitokinin etkisini net gözlemleyebilmek için ayrıca deneyler BSA içeren medyumda büyütülen hücreler ile de denendi. FCS içeriğinden kaynaklı sitokin etkisi böylece dışarıda bırakılmıştır. Normal koşullar için ayrılan hücrelere herhangi bir

kimyasal uygulanmamıştır. Bu şekilde hipoksik ve normoksik koşuldaki hücrelerden 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında hücre pelletleri alınmış ve RNA izolasyonu yapılarak RNA miktarları ölçülüp cDNA' ları daha sonra ise, hipoksik koşulların ana regülatör transkripsiyon faktörü olan HIF-1 $\alpha$  mRNA seviyelerine bakılarak hipoksik koşulun oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Real Time PZR sonucu elde edilen ct değerleri Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. Bu şekilde PC-3 ve LNCaP hücreleri için hipoksik koşulun oluşumu HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyon seviyesine bakılarak doğrulanmıştır.

Kimyasal hipoksinin ve TGF- $\beta$  uygulamasının hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırılmasında MTT Testi kullanılmıştır. 96 kuyulu plakalara her biri kuyuya PC-3 hücreleri için 10.000 ve LNCaP hücreleri için 10.000 hücre olacak şekilde hücreler her bir kuyuya paylaştırıldı. Ertesi gün hipoksik gruplara 150 $\mu$ M son konsantrasyonda CoCl<sub>2</sub> eklendi. Deneyler hem FCS' li hemde sitokin uygulamasından dolayı BSA' lı olarak yürütülmüştür. MTT deneyleri çalışılan her bir grup 8 tekrarlı olarak kurulmuş ve birbirinden bağımsız en az iki kez çalışılmıştır.

Sitokin etkisinin gözlemlenebilmesi için hücreler serum-free medyumda % 0,1' lik BSA içeren ortamda büyütülmüşlerdir. Serum tanımlanmamış bir ortam olduğundan ve içeriğinde sitokinleri bulundurduğundan uygulayacağımız TGF- $\beta$  sitokininin net etkisini gözlemek istediğimizden BSA' nın hücre proliferasyonuna etkisi öncelikle incelenmiştir. Hücreler hem FCS hem de BSA içeren ortamlarda büyütülmüş ve hücre proliferasyonları karşılaştırılmıştır. BSA'nın hem PC-3 hem de LNCaP hücrelerinde herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilmemiştir.

PC-3 hücrelerinin hipoksik koşul oluşturmak için kullanılan ajan olan CoCl<sub>2</sub> ve TGF- $\beta$  sitokin en yüksek çalışma dozu olan 500 $\mu$ g/ml (20ng/ml)' de sitotoksik etkisi çalışılmıştır. PC-3 hücrelerinde CoCl<sub>2</sub> özellikle 48 ve 72 saatlerde hücre proliferasyonunu olumsuz yönde etkilemiştir. PC-3 hücrelerinde daha kısa zaman dilimlerinde MTT deneyleri tekrarlanmış ve sonuç olarak mRNA ve protein deneylerinde kısa zaman dilimlerinde çalışmanın daha anlamlı olduğu tespit edilmiştir. CoCl<sub>2</sub> ve TGF- $\beta$ ' nın LNCaP hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.

mRNA seviyesindeki analizler için KLK4 ekspresyon primeri olarak çok sayıda bölge için primer dizayn edilmiş ve optimizasyonları yapılmıştır. Çoklu PZR denemelerinden sonra

F4 ve F5 adı verilen primerler ile optimizasyon başarıya ulaşmıştır. Bu primerler R3 ve R4 reverse primerleri ile denenmiştir. F5 ve R3' de 214bp büyüklükte doğru bant elde edilmiştir. Ayrıca diğer çalışılacak tüm primerler (SMAD2,3,4, HIF1, H $\beta$ 2 ile uygun olan 55 °C' de bağlanma sıcaklığında çalıştığından Real Time PZR analizlerinde bu primerlerin kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmamızda öncelikle farklı hücre hatlarında KLK4 mRNA seviyesi belirlenmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmayan SW480, HT-29, HEP 3B, HUVEC, PC-3 ve LNCaP hücrelerinden RNA izolasyonları gerçekleştirildi ve bu RNA' lardan 1  $\mu$ g kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Ardından gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucu KLK4' ün en yüksek mRNA ifadesi LNCaP hücrelerinde, en düşük ifadesinin ise Dukes B tipi olan SW480 kolon kanseri hücrelerinde olduğu görüldü. Dukes C tipi kolon kanseri hücresi olan HT-29 hücrelerinde ise KLK4' ün ifadesinin SW480 ile kıyaslandığında daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun da Dukes C tipinin kolon kanserinin, ilerlemiş evresi olduğundan kaynaklandığı görülmektedir. Bu hücre hatlarından aynı zamanda protein izolasyonu da yapılarak KLK4 protein ifadesine bakılmıştır. Yapılan western blot sonucu elde edilen bantların analizlerinin mRNA sonuçları ile aynı olduğu tespit edilmiştir.

Daha sonra, çalışmamızda öncelikle KLK4 ifadesi tespit edilebilir düzeyde olmayan PC-3 hücreleri ile analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla sitokin ve CoCl<sub>2</sub> uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen cDNA' lar kalıp olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı. Hipoksik koşulun ana regülatörü ve göstergesi olan HIF-1 $\alpha$  seviyesi ilk olarak analiz edildi. PC-3 hücrelerinde 1,3,6 ve 24 saatlik zaman dilimlerinde normal koşullara kıyasla CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  seviyesinin (Şekil 4.19) tüm zaman dilimlerinde arttığı gösterildi. Bu da hipoksik koşulların başarılı bir şekilde oluşturulduğunun teyidi olmuştur. Çalışılan tüm koşullarda da HIF-1 $\alpha$  seviyesi ayrıca analiz edildi. (Şekil 4.20). Daha sonra sırasıyla KLK4 (Şekil 4.21 A-B) ve TGF- $\beta$  sinyal yolağının düzenleyici proteinleri olan SMAD proteinlerinin de mRNA seviyesindeki ekspresyonları analiz edildi (Şekil 4.22, Şekil 4.23). TGF- $\beta$  uygulamasının hücreler üzerindeki uyarıcı etkisi SMAD2/3 mRNA seviyelerindeki artış ile koreledir. PC-3 hücre hattında TGF- $\beta$  ve hipoksik gruplarda KLK4 mRNA seviyesi 1 ve 3 saatlerde artarken (Şekil 4.21 A) 6 ve 24 saatlerde TGF- $\beta$  uygulamasının mRNA seviyesindeki

ekspresyonunda azalmaya, hipoksik koşullarda ise yine diğer saatlerde olduğu gibi artışa (Şekil 4.21 B) sebep olmuştur.

Çalışmalarımız KLK4 ifadesi yüksek oranda tespit edilen LNCaP hücrelerinde de gerçekleştirildi. Bu amaçla sitokin ve CoCl<sub>2</sub> uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen cDNA' lar kalıp olarak kullanılarak gerçek zamanlı PZR sonucunda analizleri yapıldı. Hipoksik koşulun ana regülatörü ve göstergesi olan HIF-1 $\alpha$  seviyesi ilk olarak analiz edildi. LNCaP hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde normal koşullara kıyasla CoCl<sub>2</sub> ile oluşturulan hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  seviyesi incelendiğinde (Şekil 4.24) tüm zaman dilimlerinde artış tespit edilemedi. Sadece 72 saatte başarılı bir hipoksik koşulun sağlandığı görülmektedir (Şekil 4.25). Bu sebeple çalışılan diğer genlerdeki etki 72 saat için değerlendirmeye alındı. Bu da hipoksik koşulların başarılı bir şekilde oluşturulduğunun teyidi olmuştur. Çalışılan tüm koşullarda da HIF-1 $\alpha$  seviyesi ayrıca analiz edildi (Şekil 4.25). Daha sonra sırasıyla KLK4 (Şekil 4.26 A) ve TGF- $\beta$  sinyal yolağının düzenleyici proteinleri olan SMAD proteinlerinin de mRNA seviyesindeki ekspresyonları analiz edildi (Şekil 4.26 B,C,D). TGF- $\beta$  uygulamasının hücreler üzerindeki uyarıcı etkisi SMAD2/3/4 mRNA seviyelerindeki artış ile koreledir. LNCaP hücre hattında TGF- $\beta$  ve hipoksik gruplarda KLK4 mRNA ekspresyonunda 72 saatte artış (Şekil 4.26 A) tespit edildi.

Çalışmamızda protein seviyesindeki analizlerde hem IFC hem de western blot tekniği kullanılmıştır. Normal oksijen koşullarına göre, hipoksik koşullarda ve TGF- $\beta$  etkili normoksik ve hipoksik şartlarda KLK4 protein seviyesi IFC ile incelenmiştir. KLK4' ün protein düzeyindeki ifadesinin belirlenmesinde kullanılan bu teknik ile hipoksik ve normoksik şartlarda KLK4' ün seviyesi karşılaştırıldığından hipoksik koşullarda ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak TGF- $\beta$  etkili ifade düzeyi ele alındığında özellikle ifadesinin arttığı, hipoksik şartlardaki ifadesinin ise daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. SMAD yolağının etkinliği ele alındığında ise sitokin uygulaması ile SMAD proteinlerinin arttığı ayrıca hipoksik koşullarda da bu etkinin devam ettiği gözlenmiştir. Böylece KLK4' ün TGF- $\beta$  etkili regülasyonunun özellikle hipoksik şartlar altında up regüle olduğu bunun da SMAD yolağı ile etkileşimi belirlenmiştir. İkinci protein belirleme yöntemi olan western blot yönteminde ise Western protokolünün uygulanması sonrasında membranlar SMAD, KLK4 ve  $\beta$ -Aktin antikorumları ile ayrı ayrı muamele edildi. TGF- $\beta$  ve hipoksik koşullarda SMAD proteinlerinin aktive olduğu tespit edilmiştir. Bu bizim açımızdan TGF- $\beta$  yolunun



aktive edildiğini göstermiştir. Hem 1 ve 3 hem de 6 ve 24 saatlik zaman dilimlerinde KLK4 proteinin ifadesi incelendiğinde hipoksik koşullarda artış görülmektedir. TGF- $\beta$  uygulaması 1-3 ve 6 saatlerde azalmaya sebep olurken 24 saat artış tespit edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında PC-3 ve LNCaP hücre hatları kullanılmıştır. Tez süresi boyunca hücre hatlarının büyütülmesi, pasajlanarak sayılarının artırılması tüm çalışmalar boyunca başarıyla sağlandı. Tez kapsamında ilk olarak KLK4 promotor bölgesi için farklı promotor parçalarını klonlayabilmek için promotor klonlama primerleri dizayn edildi. Bu amaçla genin promotor bölgesi NCBI (National Center for Biotechnology Information) data bank kullanılarak bulundu. Promotor bölge için NCBI da 19. Kromozom üzerinde genomik sekansta NG\_012154.2 üzerinde çalışıldı. Bulunan dizide öncelikle genin ekzon bölgeleri bulundu. İlk ekzonda başlangıç kodonu olan ATG tespit edildikten sonra ATG yukarısındaki yaklaşık 2000 baz çiftlik dizi promotor bölge olarak seçildi. Bu bölgede hedef promotor parçalarının oluşturulabilmesi için dizi üzerinde olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri analiz edildi. Bu tez çalışmasındaki hedefimiz hipoksik cevabı aydınlatmak olduğu için öncelikle HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri bulundu. Tez çalışmasındaki bir diğer hedefimiz TGF- $\beta$  sitokin cevabının aydınlatılması olduğu için bu sitokinin kullandığı transkripsiyon faktörleri olan SMAD transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri de analiz edildi. Bu analizler sonucunda klonlama bölgeleri için primer dizaynı yapıldı. Primer dizaynında primerleri KLK4 blast oranları, Tm sıcaklıkları ve hairpin yapıları analiz edildi.

T:A klonlama yapabilmek amacıyla ilk olarak promotor parçaları pGEMT Easy vektörüne atılması planlanmış ve ardından pMetLuc Reporter haberci vektörüne alt klonlama yapılacağı için, promotor bölgeleri için seçilen primer dizlerinin uç kısımlarına restriksiyon enzimi kesim bölgeleri konulmuştur. PGEMT-Easy ve pMetLuc vektörlerinde geni kesmeyen ve uyumlu kesim bölgeleri bulunmadığından klonlama primerlerine restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklendi. Bu enzimlerin seçiminde, enzimlerin genin içinden kesmemesine ve pMetLuc Reporter vektörünün MCS' si üzerinde yer almasına dikkat edildi. Bu strateji ile seçilen XhoI ve HindIII enzimleri (pGEMT Easy vektöründe olmayan fakat pMetLuc Reporter vektöründe bulunan) promotor bölgeleri için seçilen dizilerin uç bölgelerine eklendi. pGEMT Easy vektörüne klonlanan KLK4 promotor parçaları XhoI ve HindIII enzimleri ile kesilerek bu vektörden çıkartılmış ve ardından bu vektörden çıkarılan promotor parçalarının, aynı enzimlerle kesilen pMetLuc Reporter haberci vektörüne

ligasyonları sağlandı. Tüm klonlanan promotör parçalarının doğrulanması dizi analizi ile yapılmıştır. Dizilemeden gelen sonuçlar NCBI blast ile doğrulanmıştır. Ayrıca tüm diziler kullanılarak bioedit programında karşılaştırmalar da yapılmıştır. Sonuç olarak 1104 (P1), 760 (P2), 391 (P3), ve 102 (P4), bç' lik 4 farklı kısaltılmış KLK4 promotör parçası klonlandı.

Transkripsiyonel aktivite deneylerine geçmeden önce klonlaması gerçekleştirilen promotör parçalarını içeren pMetLuc Vektörlerinin (Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay) büyük ölçekli plazmit eldesi gerçekleştirildi. Transfeksiyon çalışmalarında salınan sistem lusiferaz ve kontrol olarak yine salınan sistem alkalın fosfataz aktivitesi değerlendirildi. Tüm transfeksiyon çalışmalarında kullanılan promotör parçaları içeren vektörler dışındaki, vektör sistemlerinin de büyük ölçekli eldesi için plazmit izolasyonları yapılmış ve vektörler kesim ile kontrol edildikten sonra kullanılmışlardır. Transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak plazmit konsantrasyonlarının belirlenmesi için miktar optimizasyon çalışması yapılmış ve promotör parçası içeren vektörlerin 1µg olarak kullanımının bazal aktivite ölçümlerinde yeterli olduğu tespit edilmiştir.

Herbir promotör parçasının normal koşullardaki aktivitesi, CoCl<sub>2</sub> uygulanmış kimyasal hipoksi modelindeki aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Tüm promotör parçalarının hipoksik koşullarda özellikle 48 saatte aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. 48 saatte bazal aktivitesi en yüksek promotör parçası 760 bç (P2) olarak tespit edilmiştir. TGF-β' nin promotör parçalarının normoksik ve hipoksik aktivitelerine etkisini belirlemek için öncelikle farklı sitokin dozları (50Ü, 100Ü, 200Ü ve 500Ü) denenmiş ve 500Ü/ml (20ng/ml) human TGFβ kullanılmasına karar verildi. Ardından tüm promotör parçalarının transkripsiyonel aktivitelerinin belirlenmesi için transfeksiyon çalışmaları yapılmıştır. 1104 bç (P1) promotör parçası üzerinde 500Ü/ml (20ng/ml) TGF-β' nin normal koşullarda özellikle 72 saatte aktivite azalışına sebep olduğu tespit edildi. Hipoksi ve TGF-β' nin etkisi analiz edildiğinde yine 72 saatte azaltıcı etkinin sadece hipoksik grupla karşılaştırıldığında korunduğu ancak hipoksinin etkisi ile bu azaltıcı etkinin keskin olmadığı tespit edilmiştir. 760 bç (P2) promotör parçası incelendiğinde TGF-β' nin normal ve hipoksik koşullarda bazal aktivite üzerinde azaltıcı etkisi tespit edilmiştir. P3 promotör parçası olan 391 bç incelendiğinde ise TGF-β' nin azaltıcı etkisinin hem normal hem de hipoksik grupta en güçlü olduğu görülmüştür. Bu sonuç bize SMAD transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesini içermeyen daha küçük bir promotör parçası oluşturmamız

gerektiğini düşündürmüştür. Bunun için gerekli biyoinformatik analizler yapılmış ve 102 bç' lik (P4) bir bölgenin klonlanmasına karar verilmiştir.

Sonuç olarak tüm promotor parçalarının bazal aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek bazal aktivite 760 bç (P2) promotor parçasında tespit edilmiştir. P1, P2 ve P3 promotor parçalarının hipoksik koşullarda özellikle 48 saatte aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir. P4 (102 bç) promotor parçasının hipoksik aktivitesi değerlendirildiğinde normoksik şartlara kıyasla aktivitesinde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bu promotor parçasında HIF transkripsiyon faktörüne özgü bir bağlanma bölgesi yer almamaktadır. Bu sonuçlar in-siliko analizler ile doğru orantılıdır.

Çalışmamız kapsamında kapsamında 2 ayrı bölge için EMSA primeri tasarlanmıştır. Bu bölgeler olası transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri temel alınarak hazırlanmış ve bu bölgelere bağlanan SMAD ve HIF-1 transkripsiyon faktörleriyle promotorun regülasyonu araştırılmıştır. Bu amaçla bir SMAD bölgesi için (+163/+194) ve bir tane HIF-1 bölgesi için (-80/-52) EMSA primeri tasarlanmıştır. PC-3 hücrelerine ait nükleer ekstraktları ile yapılan çalışmalarda ilk olarak HIF-1 $\alpha$  bölgesi için tasarlanan (-80/-52) bölgeye ait problemler çalışılmıştır. Bu amaçla PC-3 hücrelerinde Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları hazırlandı. Ayrı ayrı kurulan bağlanma reaksiyonları ile şekil 4.114 A' da görülen 2. ve 6. kuyularda ve şekil 4.114 B' de görülen 2. ve 6. kuyulardaki kompleks yapısı C harfi ile gösterilmiştir. Yani HIF-1 $\alpha$  bölgesi için tasarlanan problemler PC-3 Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları ile kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanmanın spesifik olduğunu belirlemek için hem -80/-52 bölgeye ait biotinsiz problemlerle hem de HIF-1 $\alpha$  consensus dizisine ait biotinsiz problemlerle 500 kat olacak şekilde yarışma deneyleri yapıldı. Yine şekil 114A' da 3. ve 7. kuyularda şekil 4.114 B' de 3. ve 7. kuyularda silinen kompleks bize elde edilen kompleksin gerçekten -80/-52' luk bölgeye ait olduğunu; şekil 114 A' da 4. ve 8. kuyularda, şekil 4.114 B' de 4. ve 8. kuyularda silinen kompleksin gerçekten HIF-1 $\alpha$ ' ya ait olduğunu kanıtlamaktadır. Bu da KLK4 promotor bölgesinde -80/-52' luk bölgede HIF-1 $\alpha$  transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi olduğunun, KLK4' ün hipoksik şartlardaki elde ettiğimiz regülasyonunun teyidi olmuştur. Ayrıca PC-3 normoksik ve hipoksik nükleer ekstraktlar birbiriyle kıyaslandığında oluşan kompleksin hipoksik şartlardaki artan kuvveti bize gerçekten de KLK4' ün hipoksik şartlarda artış gösterdiğini bir kez daha kanıtlamaktadır.

PC-3 hücrelerine ait nükleer ekstraktları ile yapılan çalışmalarda üçüncü olarak olası SMAD bağlanma bölgesi için tasarlanan +163/+194 bölgeye ait problemler de çalışıldı. Bu amaçla PC-3 hücrelerinde Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları hazırlandı. Ayrı ayrı kurulan bağlanma reaksiyonları ile Şekil 4.111 de görülen 2., 7. Kuyularda ve Şekil 4.115' de ve 4.116' da görülen 2. ve 7. kuyulardaki kompleks yapısı C harfi ile gösterilmiştir. Yani SMAD bölgesi için tasarlanan problemler PC-3 Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları ile kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanmanın spesifik olduğunu belirlemek için hem +163/+194 bölgeye ait biotinsiz problemlerle 500 kat olacak şekilde yarışma deneyleri yapılmıştır. +163/+194 bölgede olduğu düşünülen SMAD bölgesi için delesyon problemleri tasarlandı. Bu amaçla kurulan bağlanma reaksiyonlarında sinyalin kaybolması ön görülmektedir ancak Şekil 4.115' de 4. ve 9. kuyularda, Şekil 4.116' da 4. ve 9. kuyularda sinyali azalan kompleksin SMAD bölgesi için olası olduğunu ancak +163/+194' lik dizi üzerinde farklı bir SMAD bağlanma bölgesinde olabileceğinin kanıtıdır. Bu sebeple sinyal tamamen kaybolmamış ancak zayıflamıştır.

LNCaP hücrelerinde SMAD bağlanma bölgesinin belirlenmesi için PC-3' lerde +163/+194 bölge için yapılan deneyler benzer şekilde yapıldı. Bu amaçla LNCaP hücrelerine ait nükleer ekstraktları ile yapılan çalışmalarda olası SMAD bağlanma bölgesi için tasarlanan +163/+194 bölgeye ait problemler çalışıldı. Bu amaçla LNCaP hücrelerinde Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları hazırlandı. Ayrı ayrı kurulan bağlanma reaksiyonları ile Şekil 4.117' de görülen 2. ve 7. kuyularda ve Şekil 4.118' de görülen 2. ve 7. kuyulardaki kompleks yapısı C harfi ile gösterilmiştir. Yani SMAD bölgesi için tasarlanan problemler LNCaP Normoksik, Normoksik + TGF- $\beta$ , Hipoksik ve Hipoksik+ TGF- $\beta$  nükleer ekstraktları ile kompleks oluşturmaktadır. Bu bağlanmanın spesifik olduğunu belirlemek için hem +163/+194 bölgeye ait biotinsiz problemlerle 500 kat olacak şekilde yarışma deneyleri yapılmıştır. Yine Şekil 4.117' de 3. ve 8. kuyularda Şekil 4.118' de 3. ve 8. kuyularda silinen kompleks bize elde edilen kompleksin gerçekten +163/+194 bölgeye ait olduğunu göstermektedir.

Ayrıca +163/+194 bölgesinde olduğu düşünülen SMAD bölgesi için delesyon problemleri tasarlandı. Bu amaçla kurulan bağlanma reaksiyonlarında sinyalin kaybolması ön görülmektedir ancak Şekil 4.117' de 4. ve 9. kuyularda, Şekil 4.118' de 4. ve 9. kuyularda

sinyali azalan kompleksin SMAD bölgesi için olası olduğunu ancak sinyalin tamamen kaybolmamış zayıflamış olması farklı bir SMAD bağlanma bölgesinde olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışma kapsamında ilk kez Prostat kanseri hücre hattı olan PC-3 ve LNCaP hücrelerinde normal ve hipoksik koşullarda TGF- $\beta$  sitokini ve HIF transkripsiyon faktörünün KLK4 geninin regülasyonuna katkısı incelenmiştir. Çalışmamız kapsamında TGF- $\beta$  ve hipoksinin KLK4 ifadesini regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu etki hipoksik koşullarda oldukça güçlü bulunmuştur. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler literatüre KLK4' ün prostat kanserindeki regülasyonu hakkında yeni bilgiler sunmuştur.

## 6. KAYNAKLAR

- Aashaq, S., Batool, A., Mir, S. A., Beigh, M. A., Andrabi, K. I., & Shah, Z. A. (2022). TGF- $\beta$  signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 237(1), 59-85.
- Adamopoulos PG., Kontos CK. and Scorilas A. (2018). Discovery of novel transcripts of the human tissue kallikrein (KLK1) and kallikrein-related peptidase 2 (KLK2) in human cancer cells, exploiting NextGeneration Sequencing technology. *Genomics*, doi: 10.1016/j.ygeno.2018.03.022.
- Avgeris, M., Mavridis, K., & Scorilas, A. (2012). Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance. *Biological chemistry*, 393(5), 301-317. doi: 10.1515/hsz-2011-0260.
- Bassing CH., Yingling JM. and Howe DJ. (1994). A transforming growth factor  $\beta$  type I receptor that signals to activate gene expression. *Science*, 263:87–89.
- Bayani J. and Diamandis EP. (2011). The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6), *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 50, 1434-6621.
- Bi, X., He, H., Ye, Y., Dai, Q., Han, Z., Liang, Y., & Zhong, W. (2010). Association of TMPRSS2 and KLK11 gene expression levels with clinical progression of human prostate cancer. *Medical Oncology*, 27(1), 145-151.
- Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande W.G.F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, doi: 4: 915925.
- Boyukozer, F. B., Tanoglu, E. G., Ozen, M., Ittmann, M., & Aslan, E. S. (2020). Kallikrein gene family as biomarkers for recurrent prostate cancer. *Croatian Medical Journal*, 61(5), 450.
- Caubet C., Jonca N., Brattsand M., Guerrin M. And et all. (2004). Degradation of Corneodesmosome Proteins by Two SerineProteases of the Kallikrein Family, SCTE/KLK5/hK5 andSCCE/KLK7/hK7. *Journal of Investigative Dermatology*, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22512.
- Chandrasekar T., Yang J.C., Gao A.C. and Evans C.P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*, 4,3:365-380.

- Chen, E., Zhu, H., Yang, Y., Wang, L., Zhang, J., Han, Y., & Liu, X. (2020). Analysis of expression and prognosis of KLK7 in ovarian cancer. *Open Medicine*, 15(1), 932-939.
- Clements, J., Hooper, J., Dong, Y., Harvey, T. (2001). The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol. Chem.*, 382(1), DOI: 10.1515/BC.2001.002.
- Comoglio P.M. and Trusolino L. (2002). Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest*, doi: 109: 857862.
- Çekin N. (2007). HIF-1 Proteininin Kanser İlaçlarına Karşı Direnç Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Clements, J., Ashworth, L. K., Yoshida, S., Egelrud, T., Nelson, P.S., Shiosaka, S., Little, S., Lilja, H., Stenman, U.F., Rittenhouse, H.G., Wain, H. (2000). New Nomenclature for the Human Tissue Kallikrein Gene Family. *Clinical Chemistry*. 46(11), 1855-1858, DOI: 10.1093/clinchem/46.11.1855.
- Dong Y., Kaushal A., Bui L., Chu S, Fuller P. J., Nicklin J., Samaratunga H. and Clements J.A. (2001). Human Kallikrein 4 (KLK4) Is Highly Expressed in Serous Ovarian Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, vol 7, 2363–2371.
- Dong, Y., Kaushal, A., Bui L., Chu S Fuller, P. J., Nicklin, J., Samaratunga H., Clements, J. A. (2001). Human Kallikrein 4 (KLK4) Is Highly Expressed in Serous Ovarian Carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 7(8), 2363–2371.
- Emami N.,and Diamandis E.P. (2008). Utility of Kallikrein-Related Peptidases (KLKs) as Cancer Biomarkers. *Clinical Chemistry*, 54:10, 1600–1607.
- Erk N., Tarhan A. O. And Soyağır A. (2012-2014). Pankreas ve Kolon Kanserinde Serum TGF- $\beta$ , E Cadherin Düzeylerinin Ölçülmesi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı.
- Erkekoğlu, P. And Baydar, T. (2021). Güncel In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.
- Fernandez-Iglesias, A. and Gracia-Sancho, J. (2017). How to face chronic liver disease: the sinusoidal perspective. *Frontiers in medicine*, 4, 7.
- Fuhrman-Luck R.A., Stansfield S.H., Stephens C.R., Loessner D. And Clements, J. A.. (2016). Prostate Cancer-Associated Kallikrein-Related Peptidase 4 Activates Matrix Metalloproteinase-1 and Thrombospondin-1. *J. Proteome Res.*, 15(8), 2466-2478. doi:10.1021.

- Gustavsson H., Jennbacken K., Welen K. and Damber J.E. (2008). Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer. *Prostate*, 68, 161.
- Heldin C-H., Miyazono K. and ten Dijke P. (1997). TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390: 465–71.
- Hill, C. S. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell research*, 19(1), 36-46.
- Hollenberg M.D. (2014). KLKs and their hormone-like signaling actions: a new life for the PSA-KLK family. *Biological Chemistry*, 9, 395.
- Holzhausen M., Spolidorio L.C., Ellen R.P., Jobin M.C., Steinhoff M., Andrade-Gordon P. and Vergnolle N. (2006). Protease-activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of Porphyromonas gingivalis infection. *Am J Pathol*, 168, 1189–1199.
- Itoh S., Itoh F., Goumans MJ. and Ten Dijke P. (2000). Signaling of transforming growth factorbeta family members through SMAD proteins. *Eur J Biochem*, doi:267(24):6954-67,
- Jiang L., Lai Y.K., Zhang J.F., Chan C.Y, Lu G., Lin M.CM., He M.L., Li J.C. and Kung H.F. (2012). Transactivation of the TIEG1 confers growth inhibition of transforming growth factor- $\beta$ -susceptible hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, doi:18(17): 2035-2042.
- Jiang W., Diamandis EP., Luo LY. and Memari N. (2007). Enzymatic properties of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12). *Biological Chemistry*, doi:10.1515/BC.2007.049.
- Kakudo N., Morimoto N., Ogawa T., Taketani S., Kusumoto K. (2015). Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 $\alpha$  Activation. *Plos One*, 0139890.
- Kawabata A., Saifeddine M., Al-Ani B., Leblond L. and Hollenberg M.D. (1999). Evaluation of proteinaseactivated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay: activation of PAR2 by PAR1-targeted ligands. *J Pharmacol Exp Ther*, 288, 358–370.
- Kawaguchi M. and Kataoka H. (2014). Mechanisms of Hepatocyte Growth Factor Activation in Cancer Tissues. *Cancers*, 6, 1890-1904.
- Kontos C.K. and Scorilas A. (2012). Kallikrein-related peptidases (KLKs): a gene family of novel cancer biomarkers, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 50(11), 1877–1891, DOI: 10.1515/cclm-2012-0247.



- Kontos CK. and Scorilas A. (2016). KLK14 (kallikrein-related peptidase 14). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Korkmaz S.K., Korkmaz G.C., Pretlow G.T. and Saatcioglu F. (2004). Distinctly Different Gene Structure of KLK4/KLK-L1/Prostase/ARM1 Compared with Other Members of the Kallikrein Family: Intracellular Localization, Alternative cDNA Forms, and Regulation by Multiple Hormones. *DNA and Cell Biology*, doi: 10.1089/104454901750361497.
- Kraut H., Frey E. K., Werle E. 1930. Der nachweis eines kreislauf-hormons in der pankreasdrüse. Hoppeseylers. *Z. Physiol. Chem.*, 189, 97–106, DOI: 10.1515/bchm2.1930.189.3-4.97.
- Kryza T., Silva L.M., Bock N., Fuhrman-Luck R. A., Stephens C.R., Gao J., Samaratunga H., Lawrence M.G., Hooper J. D., Dong Y., Risbridger G. P. and Clements J.A. (2017). Kallikrein-related peptidase 4 induces cancer-associated fibroblast features in prostate-derived stromal cells. *Molecular Oncology*, 11, 1307–1329.
- Lai J., Dong Y., Clements J. A. (2009). KLK4 (kallikrein-related peptidase 4). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 13(12). DOI: 10.4267/2042/44638.
- Liu F., Ventura F., Doody J. and Massague J. (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol.*, doi:15:3479–86.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J. C., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R. M., & Massagué, J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*, 381(6583), 620-623. doi: 381: 620–623.
- Lundwall, A., Ylitalo, E. B., Wikström, P. And Brattsand, M. (2021). KLK4t2 is a hormonally regulated transcript from the KLK4 locus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13023. , DOI: 10.3390/ijms222313023.
- Lundwalla and Brattsandb M. Kallikrein-related peptidases. (2008). *Cellular and Molecular Life Science*. 65, 2019–2038. DOI: 10.1007/s00018-008-8024-3.
- Luo LY. and Diamandis EP. KLK10 (Kallikrein-related peptidase 10). (2007). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Majumdar S. and Diamandis EP. (1999). The promoter and the enhancer region of the KLK 3 (prostate specific antigen) gene is frequently mutated in breast tumours and in breast carcinoma cell lines, *Cancer Research Campaign*, 79(9/10), 1594–1602.

- Massague J., Seoane J., Wotton D. (2005). SMAD transcription factors. *Genes Dev*, doi:19: 2783-2810.
- Massague, J. (1998). TGF $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem*, doi:67: 753–91.
- Matsumura, M., Bhatt, A. S., Andress, D., Clegg, N., Takayama, T. K., Craik, C. S., Nelson, P. S. (2005). Substrates of the prostate-specific serine protease prostase/KLK4 defined by positional-scanning peptide libraries. *The Prostate*, 62(1), 1-13, DOI: 10.1002/pros.20101.
- Miyazawa K., Shinozaki M., Hara T. and Furuya T. (2002). Two major SMAD pathways in TGF-superfamily signalling. *Genes to Cells*, 1191-120.
- Miyazono, K. (2000). TGF- $\beta$  signaling by Smad proteins. *Cytokine & growth factor reviews*, 11(1-2), 15-22.
- Morizane S.. The Role of Kallikrein-Related Peptidases in Atopic Dermatitis, (2019) *Acta Medica Okayama*, 73, 700-8558.
- Mukai S., Yorita K., Yamasaki K., Nagai T., Kamibeppu T., Sugie S., Kida K., Onizuka C., Tsukino H. and Kamimura T. (2015). Expression of human kallikrein 1-related peptidase 4 (KLK4) and MET phosphorylation in prostate cancer tissue: immunohistochemical analysis. *Human Cell*, 28, 133–142.
- Mukai S., Yorita K., Yamasaki K., Nagai T., Kamibeppu T., Sugie S., Kida K., Onizuka C., Tsukino H. and Kamimura T. (2015). Expression of human kallikrein 1-related peptidase 4 (KLK4) and MET phosphorylation in prostate cancer tissue: immunohistochemical analysis. *Human Cell*, 28, 133–142.
- NCBI [provided by RefSeq, Jul 2013].
- NCBI by RefSeq, May 2011.
- Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., Makishima, F., Yamaguchi, A., and Miyazono, K. (1996). Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), 21345-21352.
- Norollahi, S. E., Foumani, M. G., Pishkhan, M. K., Shafaghi, A., Alipour, M., Jamkhaneh, V. B., ... and Vahidi, S. (2021). DNA methylation profiling of MYC, SMAD2/3 and DNMT3A in colorectal cancer. *Oman Medical Journal*, 36(6), e315.
- Obiezu, C. V., Scorilas, A., Katsaros, D., Massobrio, M., Yousef, G. M., Fracchioli, S., Rigault de la Longrais, I.A., Arisio R., Diamandis, E. P. (2001). Higher human kallikrein gene 4 (KLK4) expression indicates poor prognosis of ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 7(8), 2380-2386.

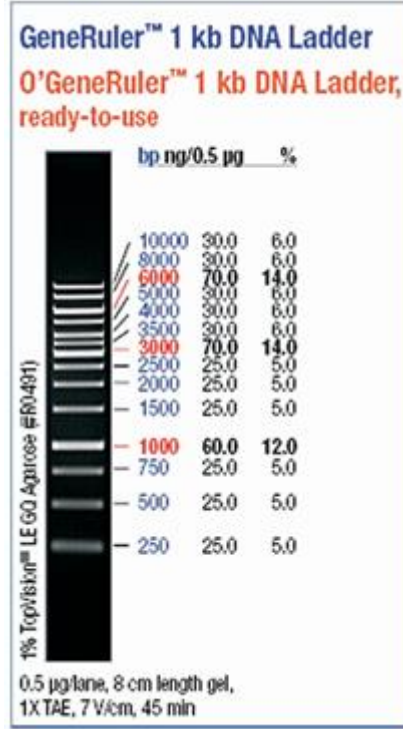
- Oh, Y. J., & Hong, J. (2022). Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems. *LWT*, 153, 112565.
- Ohler A., Debela M., Wagner S., Magdolen V. and Becker-Pauly C. (2011). Analyzing the protease web in skin: Meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. *Biological Chemistry* 39, Brüne: Bernhard.
- Organ S.L. and Tsao M-S. (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3,7-19.
- Peruzzi B. And Bottaro D.P. (2006). Targeting the cMet signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, doi: 12: 36573660.
- Ramsay A.J., Dong Y., Hunt M.L., Linn M., Samaratunga H., Clements J.A., and Hooper J.D. (2008). Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4) initiates intracellular signaling via protease-activated receptors (PARs). KLK4 and PAR- 2 are co-expressed during prostate cancer progression. *J Biol Chem.*, 283, 12293–12304.
- Selvendiran K., Bratasz A., Kuppusamy M. L., Tazi M. F., Rivera B. K., Kuppusamy P. (2009). Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Int J Cancer*, doi:125(9): 2198–2204.
- Shi Y. and Massague J. (2003). Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, doi: 113:685–700.
- Sotiropoulou G., Pampalakis G. and Diamandis EP. (2009). Functional Roles of Human Kallikrein-related Peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, doi: 10.1074/jbc.R109.027946.
- Stefanini ACB., Cunha BR., Henrique T. and Tajara EH. (2015). Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Normal and Pathologic Processes. *Disease Markers*, doi.org/10.1155/2015/946572.
- Tailor PD., Kodeboyina SK., Bai S. and et all. (2018). Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types, *Oncotarget*, 9, 17876-17888.
- Tefekli A.H. (2012). Prostat Kanserinde Yeni Belirteçler ve Phi Skoru. *Turk Urol Sem*, 3: 61-9, doi: 10.5152/tus.2012.11.
- Ten Dijke, P., Goumans, M. J., Itoh, F., & Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of cellular physiology*, 191(1), 1-16.

- Thompson-Elliott, B., Johnson, R., & Khan, S. A. (2021). Alterations in TGF $\beta$  signaling during prostate cancer progression. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 9(4), 318.
- Turkoglu A. S. and Köçkar F. (2016). SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells. *Genes D.*, doi:575(1):48-57.
- Türkoğlu, S. A., POYRAZLI, F., BABACAN, D., & Köçkar, F. (2021). Hipoksi ve Kanser. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 7(3), 450-463.
- Wang W., Mize G.J., Zhang X. and Takayama T.K. (2010). Kallikrein-related peptidase-4 initiates tumor-stroma interactions in prostate cancer through proteaseactivated receptor-1. *Int J Cancer*, doi: 126, 599–610.
- Werle E. (1934). Zur Kenntnis des haushalts des Kallikreins. *Biochem. Z.*, 269: 415–34.
- Wrana JL., Attisano L., Wieser R., Ventura F. and Massague J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature*, doi:370:341-7.
- Xi Z., Klock T.I., Korkmaz K., Kurys P., Elbi C., Risberg B., Danielsen H., Loda M., and Saatcioglu F. (2004). Kallikrein 4 is a Predominantly Nuclear Protein and Is Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 64, 2365–2370.
- Yamashita H., ten Dijke P., Franzen P., Miyazono K. and Heldin CH. (1994). Formation of heterooligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factorbeta. *J Biol Chem*, 269(31):20172-8,
- Yousef, G. M., Scorilas, A., Nakamura, T., Abd Ellatif, M., Ponzzone, R., Biglia, N., ...and Diamandis, E. P. (2003). The prognostic value of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 78(2), 149-158..
- Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T., Millhorn D. E. (2003). Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor- $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 18.
- Zava DT., Landrum B., Horwitz KB. and Mcguire W L. (1979). Androgen Receptor Assay with [3H]Methyltrienolone (R1881) in the Presence of Progesterone Receptors. *Endocrinology*, 104, 1007–1012.

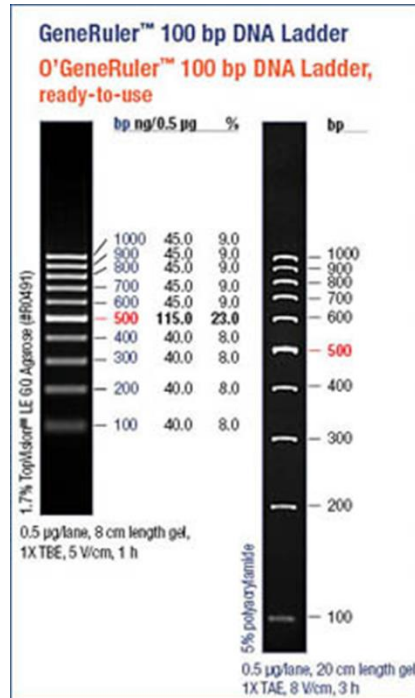
# **EKLER**

## EKLER

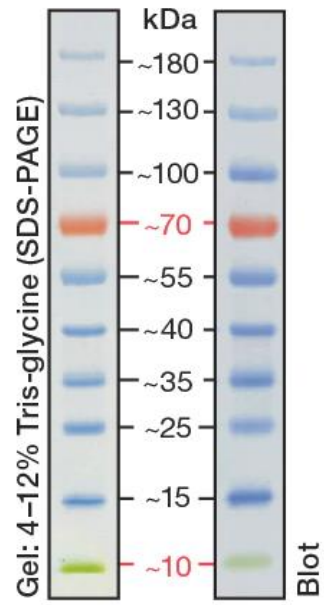
### EK A: Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA marker.

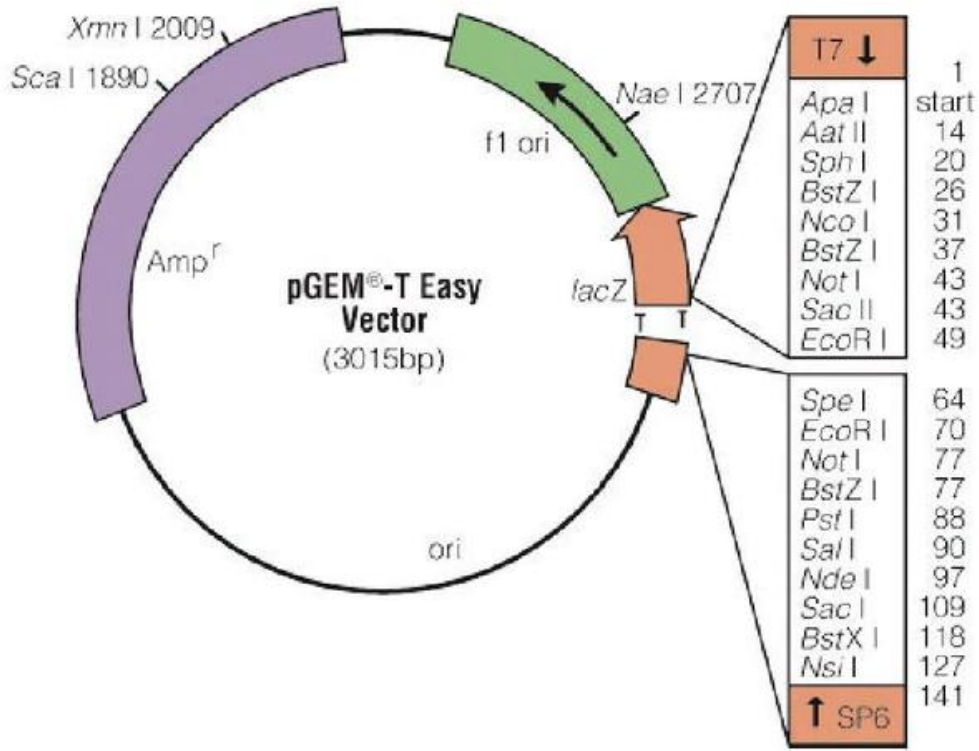


Şekil A.2: Thermo Scientific 100 bp DNA marker.



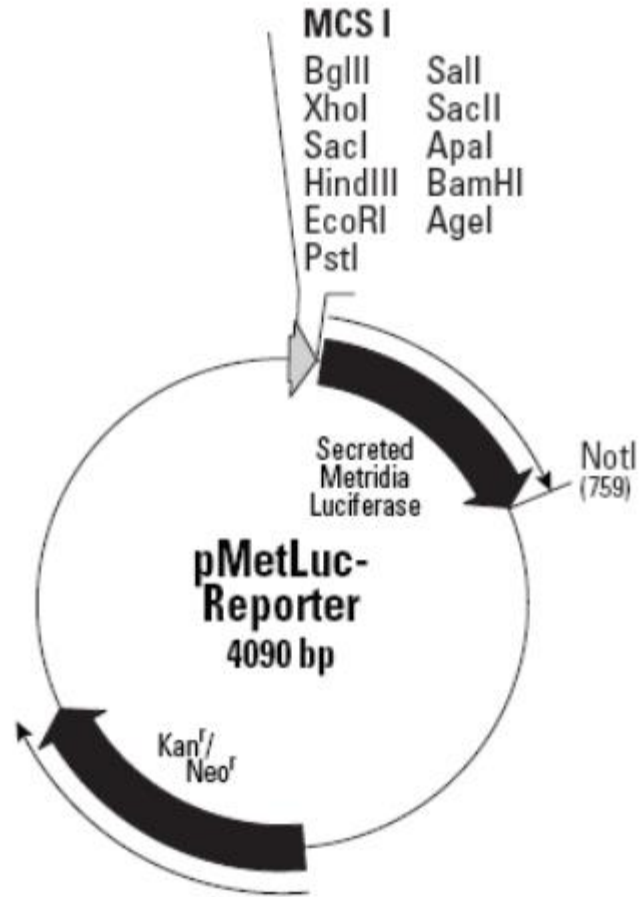
Şekil A.3: PageRuler Prestained Protein marker.

## EK B: Kullanılan Vektörler

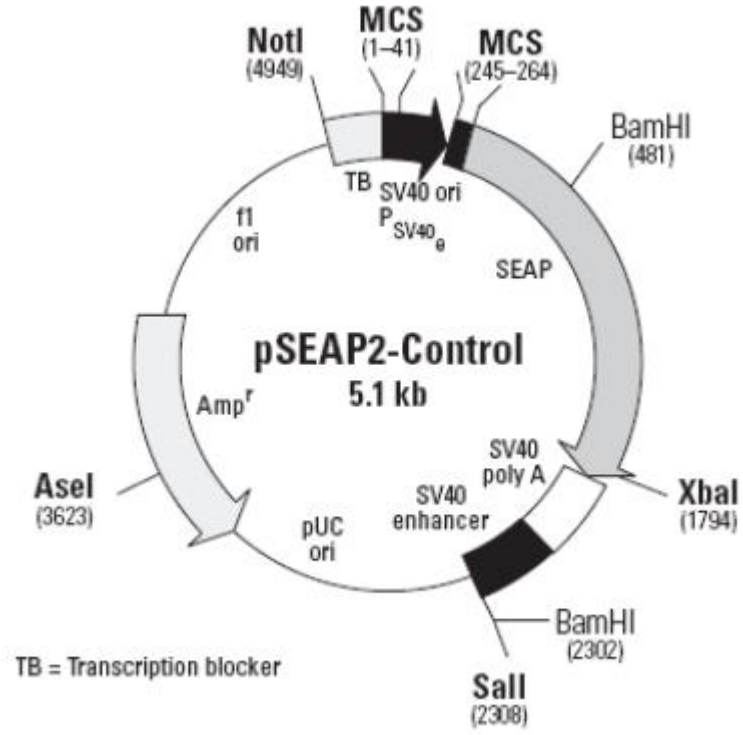


Şekil B. 1: pGEM™-T Easy vektör haritası (Promega).





Şekil B. 2: pMetLuc-Reporter vektör haritası (Clontech).



Şekil B. 3: SEAP-2 kontrol vektör haritası.

# EKLER

## EK C: KLK4 Promotorları Dizi Analizi Sonuçları

### DİZİ ANALİZİ 1104 bç KLK4 PROMOTOR

#### 1104bp forward

#### >Pr70 2670 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi

```
ATTAAGCGCAGACATGAGAGAGACAGGAGAGAATGAGAGGAAATGAAAGA  
AAACACGAGAAAAATAATGAGAGAGAGAATGAGAGAAAAGAAAGAAGGAGA  
GAAAGAGAAAATGAGAGATACAGGCAAGAGAGAGGTATCTCATGAGAGAG  
AATAAGAACATGAAAAGAGAAAAGAATGAGAGAGAGAGAGAAAAGAAAA  
GGAGAGTGGAGTCTAGGATCTGGGCAGGGGTCTCCTCCCTGGGTCCCTAG  
ACCCTGCTGCCAGCCCCCTTCTGGGCCCCCAACCACTGCCTGGTCAGAGTT  
GAGGCAGCCTGAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCACCTGACCCCTGG  
AACACATCCCCTGGGGGCGAGCCAGCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCC  
CCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCAGCAGTG  
GAATCCAGGAGCCAGAGGTGGCCGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCCAC  
TAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCCTACAGCTCCATGTGCGC  
TGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATC  
TCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGGTCTCTCTG  
TCTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGA  
TATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTCTTCC  
TCCATGCTGTTTGCGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCATTCACAGATGG  
CTAGATGCTTTTCTCTAAACTTTCTTTCTACTTAGGTCTCTCTCTC
```

#### Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Forward)

Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC\\_000019.10](#) Length: 58617616 Number of Matches: 1

Related Information

[Genome Data Viewer](#)-aligned genomic context

Range 1: 50910966 to 50911804 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1493 bits(808)	0.0	831/841(99%)	6/841(0%)	Plus/Minus

#### Features:

228 bp at 5' side: [kallikrein-4](#) isoform X1 131827 bp at 3' side: [kallikrein-5](#) isoform X1

```
Query 12          acatgagagag-acaggagagaatgagaggaaatgaaagaaaacacgagaaaaataatga 70  
|||||  
Sbjct 50911804    ACATGAGAGAGAACAGGAGAGAATGAGAGGAAATGAAAGAAAACACGAGAAAAATAATGA  
50911745
```

```
Query 71          gagagagaatgagagaaagaaagaaggagagaaagagaaaatgagagatacaggcaagag 130  
|||||  
Sbjct 50911744    GAGAGAGAATGAGAGAAAAGAAAGAAGAAGAGAAAAGAGAAAATGAGAGATACAGGCAAGAG  
50911685
```

```
Query 131         agaggtatctcatgagagagagaataagaacatgaaaagagaaagaatgagagagagagagaga 190
```

```

|||||
Sbjct 50911684 AGAGGTATCTCATGAGAGAGAATAAGAACATGAAAAGAGAAAGAATGAGAGAGAGAGAGA
50911625

Query 191 gaaagaaaaaggagagtggagtctaggaTCTGGGCAGGGGTCTCCTCCCTGGGTCCCTAG
250

|||||
Sbjct 50911624 GAAAGAAAAGGAGAGTGGAGTCTAGGATCTGGGCAGGGGTCTCCTCCCTGGGTCCCTAG
50911565

Query 251 ACCCTGCTGCCAGCCCCTTCTGGGCCCCCAACCACTGCCTGGTCAGAGTTGAGGCAGCCT
310

|||||
Sbjct 50911564 ACCCTGCTGCCAGCCCCTTCTGGGCCCCCAACCACTGCCTGGTCAGAGTTGAGGCAGCCT
50911505

Query 311 GAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCACCTGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGGCAG
370

|||||
Sbjct 50911504 GAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCACCTGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGGCAG
50911445

Query 371 GCCAGCCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGC
430

|||||
Sbjct 50911444 GCCAGCCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGC
50911385

Query 431 TGGAGCTCAGCCCAGCAGTGGAAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGGTAAGAGGCCTGGT
490

|||||
Sbjct 50911384 TGGAGCTCAGCCCAGCAGTGGAAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGGTAAGAGGCCTGGT
50911325

Query 491 GGTCCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCTCCCTACAGCTCCATGTTCGC
550

|||||
Sbjct 50911324 GGTCCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCTCCCTACAGCTCCATGTTCGC
50911265

Query 551 TGGATtctcagcctctgtgccttctgtctccacatctctctagacagatctctcactgtc
610

|||||
Sbjct 50911264 TGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATCTCTCACTGTC
50911205

Query 611 tctagttaggagtactgtctctagttaggggtctctctgtctctctgaatctatatctc
670

|||||

```

```

Sbjct 50911204 TCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGTCTCTCTGTCTCTCTGAATCTATATCTC
50911145

Query 671 catgtctaactctcagactgtctctgaggatatctctcaagcactctgtctctccgctc
730

|||||
Sbjct 50911144 CATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTC
50911085

Query 731 tgattctctgtgtgtctTCC-TCCATGCTTGTGTTGCGG-TGGCTAGACACCATCTCTCCC
788

|||||
Sbjct 50911084 TGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGTGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCC
50911025

Query 789 -ATTACAGATGGCTAGATGCTTTTCTCTAAACTTTCTTTCTACTTAGGTCTCTCTCT
847

|||||
Sbjct 50911024 CATTCACAGATGGCTAGATGCTTT--CTCTAAACTTTCTTTCTACCTAGTTCTCTCTCT
50910967

Query 848 C 848
|
Sbjct 50910966 C 50910966

```

**1104bp reverse**

**>Pr70 2671 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi**

```

GGTGCGGAAAAATATCGTGTCTGGGGACTTCAGCCCAAGTCTCTCCATC
CCTCTCTTTGTCCCTCCCTTTCTTCCCTCTGGGACGTTATAGGTAGGCA
AGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCATCCATGGACCCAGAACCTAGA
GAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAAGAGAGAGAGAGAGGTGGGAA
AAGAGAGAGAGAGAGAACTAAGTAGAAAAGGAAAGTTTAGAGAAAAGCATCT
AGCCATCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCGCAAACAAGCA
TGGAGGGGAAGACACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGTGAG
AGATATCCTCAGAGACAGTCTGAGAGTTAGACATGGAGATATAGATTGAG
AGAGACAGAGAGACCCCTAACTAGAGACAGTGACTCCTAACTAGAGACAG
TGAGAGATCTGTCTAGAGAGATGTGGAGACAGAAGGCACAGAGGCTGAGA
ATCCAGCGACATGGAGCTGTAGGGAGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGC
TTTTAGTGGGGACCACCAGGCCTCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTG
GATTCCACTGTGGGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCTCCCGCAGGGGCCTC
CTTGGGGCTTATAAGCATCCTCAGCCTGCGCTGGCCTGCCCCAGGGGAT
GTGTTCCAGGGGTACAGTGTGCAAACCTCCAGCTCAACTCTCTCATGCT
GCCTCAACTCTGACCAGGCAGTGGTTGGGGGCCAGAAATGGGCTGGCAGC
AGGCTTAGGGACCCAGGGAGGAAGACCCCTGCCAGATC

```

**Dizinin reverse complementi**

```

GATCTGGGCAGGGGTCTTCCCTCCCTGGGTCCCTAGACCT
GCTGCCAGCCATTCTGGGCCCCCAACCACTGCCTGGTCAGAGTTGAGGC
AGCATGAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCAGTGAACCCCTGGAACAC
ATCCCTTGGGGCAGGCCAGCGCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAG
GAGGCCCTTGGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTGGAAATC
CAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAAAA

```

GCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCTCCCTACAGCTCCATGTCGCTGGAT  
TCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATCTCTCA  
CTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGGTCTCTGTCTCT  
CTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCT  
CTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCA  
TGCTTGTGTTGCGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCCATTACAGATGGCT  
AGATGCTTTCTCTAAACTTTCCTTTCTACTTAGTTCTCTCTCTCTCTCT  
TTCCACCTCTCTCTCTCTCTTTTTCTCTCTCAGTCTCTAAATCTGTCTC  
TCTAGGTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGTAGATGGTCTAGGCTCT  
TGCCTACCTAATAACGTCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGG  
GATGGAGAGACTTGGGCTGAAGTCCCCAGACACGATATTTTTTCCGCACC

**Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Reverse)**

Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: NC\_000019.10 Length: 58617616 Number of Matches: 1

Related Information

[Genome Data Viewer](#)-aligned genomic context

Range 1: 50910775 to 50911598 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1448 bits(784)	0.0	814/827(98%)	7/827(0%)	Plus/Plus

Features:

37 bp at 5' side: kallikrein-4 isoform X1 32033 bp at 3' side: kallikrein-5 isoform X1

Query 17 CGTGTCTGGGGA-CTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTTCTTC 75  
|||||

Sbjct 50910775 CGTGTCTGGGGATCTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTTCTTC  
50910834

Query 76 CCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCA<sub>tccatg</sub>  
135  
|||||

Sbjct 50910835 CCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCA<sub>tccatg</sub>  
50910894

Query 136 gaccagaacctagagagacagatttagagactgagagagaaaaagagagagagagaggt  
195  
|||||

Sbjct 50910895 GACCCAGAACCTAGAGAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAAGAGAGAGAGAGA--T  
50910952

Query 196 ggg-aaa-agagagagagagagaactaagtagaaaggaaagtttagagaaagcatctagc  
253  
|||

Sbjct 50910953 GGGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGGTAGAAAGGAAAGTTT<sub>AGAGAAAGCATCTAGC</sub>  
50911012

Query 254 catctgtgaatgggagagatggtgtctagccaccgcaacaagcatggaggggaagaca  
313  
|||||

Sbjct 50911013 CATCTGTGAATGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAAACAAGCATGGAGGGGAAGACA  
50911072

Query 314 cacagagaatcagagccggagagacagagtgcttgagagatatcctcagagacagtctga  
 373  
 |||  
 Sbjct 50911073 CACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGCTTGAGAGATATCCTCAGAGACAGTCTGA  
 50911132  
  
 Query 374 gagttagacatggagatatagattcagagagacagagagaccctaactagagacagtga  
 433  
 |||  
 Sbjct 50911133 GAGTTAGACATGGAGATATAGATTCAGAGAGACAGAGAGACCCCTAACTAGAGACAGTGA  
 50911192  
  
 Query 434 ctccctaactagagacagtgagagatctgtctagagagatgtggagacagaaggcacagag  
 493  
 |||  
 Sbjct 50911193 CTCCTAACTAGAGACAGTGAGAGATCTGTCTAGAGAGATGTGGAGACAGAAGGCACAGAG  
 50911252  
  
 Query 494 gctgagaATCCAGCGACATGGAGCTGTAGGGAGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCTTT  
 553  
 |||  
 Sbjct 50911253 GCTGAGAATCCAGCGACATGGAGCTGTAGGGAGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCTTT  
 50911312  
  
 Query 554 TAGTGGGGGACCACCAGGCCTCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTCCACTGCTG  
 613  
 |||  
 Sbjct 50911313 TAGTGGGGGACCACCAGGCCTCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTCCACTGCTG  
 50911372  
  
 Query 614 GGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCTCCCGCAGGGGCCTCCTTGGGGCTTATAAGCATCCTCA  
 673  
 |||  
 Sbjct 50911373 GGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCTCCCGCAGGGGCCTCCTTGGGGCTTATAAGCATCCTCA  
 50911432  
  
 Query 674 GCCTGCGCTGGCCTGCCCCAGGGGATGTGTTCCAGGGGTACAGTGCTGCAAACCTCCAG  
 733  
 |||  
 Sbjct 50911433 GCCTGGGCTGGCCTGCCCCAGGGGATGTGTTCCAGGGGTACAGTGCTGCAAACCTCCAG  
 50911492  
  
 Query 734 CTCAACTCTCTCATGCTGCCTCAACTCTGACCAGGCAGTGGTTGGGGGCCAGAATGGGC  
 793  
 |||  
 Sbjct 50911493 CTCAACTCTCTCAGGCTGCCTCAACTCTGACCAGGCAGTGGTTGGGGGCCAGAAGGGGC  
 50911552

Query 794 TGGCAGCA-GGTCTAGGGACCCAGGGAGGAAGACCCCTGCCAGATC 839  
 |||  
 Sbjct 50911553 TGGCAGCAGGGTCTAGGGACCCAGGGAGG-AGACCCCTGCCAGATC 50911598

**İKİ DİZİNİN BLAST SONUCU**

Query 217 GATCTGGGCAGGGGTCT-CCTCCCTGGGTCCCTAGACCCTGCTGCCAGCCCCTTCTGGGC 275  
 |||  
 Sbjct 839 GATCTGGGCAGGGGTCTTCTCCCTGGGTCCCTAGACC-TGCTGCCAGCCATTCTGGGC 781

Query 276 CCCC AACACTGCCTGGTCAGAGTTGAGGCAGCCTGAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCA 335  
 |||  
 Sbjct 780 CCCC AACACTGCCTGGTCAGAGTTGAGGCAGCATGAGAGAGTTGAGCTGGAAGTTTGCA 721

Query 336 GCACCTGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGGCAGGCCAGCCAGGCTGAGGATGCTTAT 395  
 |||  
 Sbjct 720 GCACCTGACCCCTGGAACACATCCCCTGGGGGCAGGCCAGCGCAGGCTGAGGATGCTTAT 661

Query 396 AAGCCCCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCAGCAGTGGAATC 455  
 |||  
 Sbjct 660 AAGCCCCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCAGCAGTGGAATC 601

Query 456 CAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGCCTGCAGTG 515  
 |||  
 Sbjct 600 CAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGCCTGCAGTG 541

Query 516 TTCATGATCCA ACTCTCCCTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCT 575  
 |||  
 Sbjct 540 TTCATGATCCA ACTCTCCCTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCT 481

Query 576 GTCTCCACATCTCTTAGACAGAtctctcactgtctctagttaggagtcactgtctctag 635  
 |||  
 Sbjct 480 GTCTCCACATCTCTTAGACAGATCTCTACTGTCTCTAGTTAGGAGTCAGTGTCTTAG 421

Query 636 ttaggggtctctctgtctctctgaatctatatctccatgtctaactctcagactgtctct 695  
 |||  
 Sbjct 420 TTAGGGGTCTCTGTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCT 361

Query 696 gaggatatctctcAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTGTGTGTCTTCC-TCCA 754  
 |||  
 Sbjct 360 GAGGATATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTGTGTGTCTTCCCTCCA 301

Query 755 TGCTTGTGGCGG-TGGCTAGACACCATCTCTCCC-ATTCACAGATGGCTAGATGCTTTT 812



|||||  
 Sbjct 300 TGCTTGTTTGCGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCCATTACAGATGGCTAGATGCTTT- 242

Query 813 CCTCTAAACTTTCTTTCTACTTAGGTCTCTCTCTC 848

|||||  
 Sbjct 241 -CTCTAAACTTTCTTTCTACTTAGTTCTCTCTCTC 207

## DİZİ ANALİZİ 760 bç KLK4 PROMOTOR

### 760bp forward

#### >Pr70 2672 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi

CATCGTTTAGTTACATTTACATAGACATCCCTGGGGGCAGGCCAGCCCAG  
 GCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCCCTGCGGGAGGCAGCAGGC  
 TGGAGCTCAGCCCAGCAGTGAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGCCGGGTAA  
 GAGGCCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTC  
 CCCCTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTC  
 CACATCTCTTAGACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTC  
 TCTAGTTAGGGTCTCTCTGTCTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAAC  
 TCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTC  
 TGATTCTCTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGTGGGTGGCTAGACAC  
 CATCTCTCCCCATTACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCTTTT  
 CTACCTAGTTCTCTCTCTCTCTCTTTTCCCATCTCTCTCTCTTTTTT  
 CTCTCTCAGTCTCTAAATCTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGG  
 AGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTCTTGCCACCTAATAACGTCCAGAGG  
 GAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATC  
 CCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCTCATCCCAGGTGCTGACGTGAAGC  
 TTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGGTCCG  
 CACCATGGACATCAAGGTGGGGGTTTC

#### Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Forward)

Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p12 Primary Assembly  
 Sequence ID: [NC\\_000019.10](#) Length: 58617616 Number of Matches: 1  
 Related Information  
[Genome Data Viewer](#)-aligned genomic context  
 Range 1: 50910738 to 50911461 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1325 bits(717)	0.0	722/724(99%)	1/724(0%)	Plus/Minus

Features:

**[kallikrein-4 isoform 1 prepropeptid kallikrein-4 isoform X3](#)**

Query 25 ACAT-CCCTGGGGGCAGGCCAGCCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCC 83

|||||

Sbjct 50911461 ACATCCCCTGGGGGCAGGCCAGCCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCC 83  
 50911402

Query 84 TGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTGAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGC 83  
 143

```

|||||
Sbjct 50911401 TGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTGAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGC
50911342

Query 144 CGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCCCC
203

|||||
Sbjct 50911341 CGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCTCC
50911282

Query 204 CTACAGCTCCATGTCGCTGGATTctcagcctctgtgccttctgtctccacatctctctag
263

|||||
Sbjct 50911281 CTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAG
50911222

Query 264 acagatctctcactgtctctagttaggagtcactgtctctagttaggggtctctctgtct
323

|||||
Sbjct 50911221 ACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGGTCTCTGTCT
50911162

Query 324 ctctgaatctatatctccatgtctaactctcagactgtctctgaggatatctctcaagca
383

|||||
Sbjct 50911161 CTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCA
50911102

Query 384 ctctgtctctccggctctgattctctgtgtgtcttccctccatgcttgtttgtgggtggc
443

|||||
Sbjct 50911101 CTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTCCCTCCATGCTTGTGTTGTGGGTGGC
50911042

Query 444 tagacaccatctctccccattcacagatggctagatgctttctctaaaactttcctttcta
503

|||||
Sbjct 50911041 TAGACACCATCTCTCCCATTACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCTTTCTA
50910982

Query 504 cctagttctctctctctctctcttttcccatctctctctctctctttttctctctcagtctc
563

|||||
Sbjct 50910981 CCTAGTTCTCTCTCTCTCTCTTTTCCCATCTCTCTCTCTCTTTTCTCTCTCAGTCTC
50910922

Query 564 taaatctgtctctctaggttctgggtccatggaTGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCT
623

|||||

```

Sbjct 50910921 TAAATCTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCT  
50910862

Query 624 CTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGA  
683

|||||

Sbjct 50910861 CTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGA  
50910802

Query 684 GACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCAGGTGCTGAC  
743

|||||

Sbjct 50910801 GACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCAGGTGCTGAC  
50910742

Query 744 GTGA 747

||||

Sbjct 50910741 GTGA 50910738

### **760bp reverse**

#### **>Pr70 2673 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi**

GGGACTACTAGCGTGTCTGGGGACTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCT  
CTTTGTCCCTCCCTTTCTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGC  
CTAGACCATCTACCCCTCTCCCATCCATGGACCCAGAACCTAGAGAGAC  
AGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAAGAGAGAGAGATGGGAAAAGAGAG  
AGAGAGAGAGAAGTGGTGTCTAGCCACCCACAAACAAGCATGTAGCCA  
TCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAAACAAGCATGGAG  
GGAAGACACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGTCTGAGAGATA  
TCCTCAGAGACAGTCTGAGAGTTAGACATGGAGATATAGATTGAGAGAGA  
CAGAGAGACCCCTAACTAGAGACAGTACTCCTAACTAGAGACAGTGAGA  
GATCTGTCTAGAGAGATGTGGAGACAGAAGGCACAGAGGCTGAGAATCCA  
GCGACATGGAGCTGTAGGGGGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCTTTTA  
GTGGGGGACCACAGGCCCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTTC  
CACTGTGGGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCTCCCGCACGGGCTCCTTGG  
GGCTTATAAGCATCCTCAGCCTGGCTGGCTGCCCCCAGGGGATGTGTTTC  
CAGGGGTGAGTGTGCAAACTTCCAGCTCAACCTCGAGATCTGAGTCCGG  
TAGCGCTAGTAATAACTAATGCATGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT  
CA

### **Dizinin reverse complementi**

TG  
ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTACTAGCGCTA  
CCGGACTCAGATCTCGAGGTTGAGCTGGAAGTTTGCAGCACTGACCCCTG  
GAACACATCCCCTGGGGGCAGGCCAGCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCC  
CCAAGGAGGCCCGTGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCAGCAGTG  
GAATCCAGGAGCCAGAGGTTGGCCGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCAC  
TAAAAGCCTGCAGTGTTCATGATCCAACCTCCCCCTACAGCTCCATGTGCG  
TGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAGACAGATC  
TCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGGTCTCTCTG  
TCTCTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGA  
TATCTCTCAAGCACTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGCTTCC  
CTCCATGCTTGTGTTGTGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCATTCACAGA  
TGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCTTCTACCTAGTTCTCTCTCTCT  
CTCTCTTTTCCCATCTCTCTCTCTTTTTCTCTCTCAGTCTCTAAATCT  
GTCTCTTAGGTTCTGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAG  
GCTCTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAG  
AGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGTCCCCAGACACGGCTAGTAGTCCC

## Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Reverse)

Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC\\_000019.10](#) Length: 58617616 Number of Matches: 1

Related Information

[Genome Data Viewer](#)-aligned genomic context

Range 1: 50910771 to 50911502 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1308 bits(708)	0.0	725/732(99%)	5/732(0%)	Plus/Plus

Features:

33 bp at 5' side: [kallikrein-4 isoform X1](#) 32129 bp at 3' side: [kallikrein-5 isoform X1](#)

```
Query    9          TAG-CGTGTCTGGGGA-C TTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTT 66
          ||| ||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct    50910771   TAGCCGTGTCTGGGGATCTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTT
50910830
```

```
Query    67          CTTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCAtc
126
```

```
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct    50910831   CTTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCA TC
50910890
```

```
Query    127         catggaccagaacctagagagacagatttagagactgagagagaaaaagagagagagag
186
```

```
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct    50910891   CATGGACCCAGAACCTAGAGAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAAGAGAGAGAGAG
50910950
```

```
Query    187         atgggaaaagagagagagagagagaactaggtagaaaggaaagtttagagaaagcatcta
246
```

```
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct    50910951   ATGGGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGA ACTAGGTAGAAAGGAAAGTTAGAGAAAGCATCTA
50911010
```

```
Query    247         gccatctgtgaatggggagagatggtgtctagccaccacaaacaagcatggaggggaaga
306
```

```
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct    50911011   GCCATCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAAACAAGCATGGAGGGAAGA
50911070
```

```
Query    307         cacacagagaatcagagccggagagacagagtgcttgagagatatcctcagagacagtct
366
```

```
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct    50911071   CACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGCTTGAGAGATATCCTCAGAGACAGTCT
50911130
```

```

Query 367 gagagttagacatggagatatagattcagagagacagagagaccctaactagagacagt
426
|||||
Sbjct 50911131 GAGAGTTAGACATGGAGATATAGATTCAGAGAGACAGAGAGACCCCTAACTAGAGACAGT
50911190

Query 427 gactcctaactagagacagtgagagatctgtctagagagatgtggagacagaaggcacag
486
|||||
Sbjct 50911191 GACTCCTAACTAGAGACAGTGAGAGATCTGTCTAGAGAGATGTGGAGACAGAAGGCACAG
50911250

Query 487 aggctgagaATCCAGCGACATGGAGCTGTAGGGGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCT
546
|||||
Sbjct 50911251 AGGCTGAGAATCCAGCGACATGGAGCTGTAGGGGAGTTGGATCATGAACACTGCAGGCT
50911310

Query 547 TTTAGTGGGGGACCACCAGGCCTCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTCCACTGC
606
|||||
Sbjct 50911311 TTTAGTGGGGGACCACCAGGCCTCTTACCCGGCCACCTCTGGGCTCCTGGATTCCACTGC
50911370

Query 607 TGGGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCTCCCGCACGGGCCTCCTTGGGGCTTATAAGCATCCT
666
|||||
Sbjct 50911371 TGGGCTGAGCTCCAGCCTGCTGCCTCCCGCACGGGCCTCCTTGGGGCTTATAAGCATCCT
50911430

Query 667 CAGCCT-GGCTGGCCTGCCCCAGGGGATGTGTTCCAGGGGTCA-GTGCTGCAAACCTCC
724
|||||
Sbjct 50911431 CAGCCTGGGCTGGCCTGCCCCAGGGGATGTGTTCCAGGGGTCAAGGTGCTGCAAACCTCC
50911490

Query 725 AGCTCAAC-CTC 735
|||||
Sbjct 50911491 AGCTCAACTCTC 50911502

```

**İKİ DİZİNİN BLAST SONUCU**

```

Query 25 ACAT-CCCTGGGGGAGGCCAGCCCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCCCC 83
|||||
Sbjct 107 ACATCCCCTGGGGGAGGCCAG-CCAGGCTGAGGATGCTTATAAGCCCCAAGGAGGCCCG 165

Query 84 TGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTGAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGC 143
|||||
Sbjct 166 TGCGGGAGGCAGCAGGCTGGAGCTCAGCCCAGCAGTGAATCCAGGAGCCCAGAGGTGGC 225

```

```

Query 144  CGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTTCATGATCCAACCTCCCC 203
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 226  CGGGTAAGAGGCCTGGTGGTCCCCCACTAAAAGCCTGCAGTGTTTCATGATCCAACCTCCCC 285

Query 204  CTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAG 263
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 286  CTACAGCTCCATGTCGCTGGATTCTCAGCCTCTGTGCCTTCTGTCTCCACATCTCTCTAG 345

Query 264  ACAGATctctcactgtctctagtaggagtcactgtctctagtaggggtctctctgtct 323
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 346  ACAGATCTCTCACTGTCTCTAGTTAGGAGTCACTGTCTCTAGTTAGGGGTCTCTCTGTCT 405

Query 324  ctctgaatctatatctccatgtctaactctcagactgtctctgaggatatctctcAAGCA 383
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 406  CTCTGAATCTATATCTCCATGTCTAACTCTCAGACTGTCTCTGAGGATATCTCTCAAGCA 465

Query 384  CTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGTGGGTGGC 443
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 466  CTCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGTGGGTGGC 525

Query 444  TAGACACCATCTCTCCCCATTCACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCCTTTCTA 503
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 526  TAGACACCATCTCTCCCCATTCACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCCTTTCTA 585

Query 504  CCTAGTtctctctctctctctctcttttcccatctctctctctctctctctctcagtctc 563
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 586  CCTAGTTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTCCCATCTCTCTCTCTCTCTCTTTTCTCTCTCAGTCTC 645

Query 564  taaatctgtctctctAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGTAGATGGTCTAGGCT 623
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 646  TAAATCTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGTAGATGGTCTAGGCT 705

Query 624  CTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGA 683
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 706  CTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGA 765

Query 684  GACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTA 714
          ||||||||||||| ||||||||||| |||
Sbjct 766  GACTTGGGCTGAAG-TCCCCAGACACG-CTA 794

```



```

Query    181          aaatctgtctctctaggttctgggtcCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTC
240
          |||
Sbjct    50910920      AAATCTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTC
50910861

Query    241          TTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAG
300
          |||
Sbjct    50910860      TTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAG
50910801

Query    301          ACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCAGGTGCTGACG
360
          |||
Sbjct    50910800      ACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCAGGTGCTGACG
50910741

Query    361          TGA    363
          |||
Sbjct    50910740      TGA    50910738

```

**391 bp KLK4 reverse**  
**>Pr70 2675 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi**

```

GTACATACTAGCGTGTCTGGGGACTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCT
CTTTGTCCCTCCCTTTCTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGC
CTAGACCATCTACCCCTCTCCCATCCATGGACCCAGAACCCTAGAGAGAC
AGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAAGAGAGAGGGGAGATGGGAAAAAGAG
AGAGAGAAGTGGTAGAAAGGAAAGTTTAGAGAAAGCATCTAGCCATCTG
TGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAAACAAGCATGGAGGGAA
GACACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGCTTGAGAGATATCCT
CAGAGACAGTCCTCGAGATCTGAGTCCGGTAGCGCTAGTAATAACTAATG
CATGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGA
ACATGTAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCACCTTGCACTGGGGACAGCCTAT
TTTGCTAGTTTGTGTTTTCGTTTGTGTTTGTATGGAGAGCGTATGTTAG
TACTATCGATTCACACAAAAACCAACACACAGATGTAATGAAAATAAAG
ATATTTTATTACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA
AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC
ATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA
TAAAGATACCAGGCGTTTCCCTGGAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT
CCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGT

```

**Dizinin reverse complementi**

```

ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG
AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
TAGTCCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTT
TTACGGTTCCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTAATAAATAT
CTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGAATCGATAGTA
CTAACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAACTAGCAAA
ATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTACATGT
TCTTTCCGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATG
CATTAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGGACTGTCTCTG
AGGATATCTCTCAAGCACTGTCTCTCCGCTCTGATTCCTGTGTGTC

```



TTCCCTCCATGCTTGTTTGTGGGTGGCTAGACACCATCTCTCCCCATTCA  
 CAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCCCTTTCTACCTAGTTCTCTCT  
 CTCTCTTTTCCCATCTCCCTCTCTCTTTTCTCTCTCAGTCTCTAAATCT  
 GTCTCTTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAG  
 GCTCTTGCCTACCTAATAACGTCCCAGAGGGGAAAGGGAGGGACAAAG  
 AGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGTCCCAGACACGCTAGTATGTAC

**Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Reverse)**

Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p12 Primary Assembly  
 Sequence ID: [NC\\_000019.10](#) Length: 58617616 Number of Matches: 1  
 Related Information  
[Genome Data Viewer](#)-aligned genomic context  
 Range 1: 50910771 to 50911129 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
619 bits(335)	8e-175	352/359(98%)	6/359(1%)	Plus/Plus

Features:

33 bp at 5' side: [kallikrein-4 isoform X1](#) 32502 bp at 3' side: [kallikrein-5 isoform X1](#)

Query 9 TAG-CGTGTCTGGGGA-CTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTT 66  
 ||| ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct 50910771 TAGCCGTGTCTGGGGATCTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTT  
 50910830

Query 67 CTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCATC  
 126  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct 50910831 CTCCCTCTGGGACGTTATTAGGTAGGCAAGAGCCTAGACCATCTACCCCTCTCCCATC  
 50910890

Query 127 CATGgaccagaaacctagagagacagattagagactgagagagaaaaagagagagggag  
 186  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct 50910891 CATGGACCCAGAACCTAGAGAGACAGATTTAGAGACTGAGAGAGAAAAAGAGAGAGAGAG  
 50910950

Query 187 atgggaaa----agagagagagagaactaggtagaaaggaaagttagagaaagcatcta  
 242  
 ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct 50910951 ATGGGAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGGTAGAAAGGAAAGTTTAGAGAAAGCATCTA  
 50911010

Query 243 gccatctgtgaatggggagagatggtgtctagccaccacaaacaagcatggaggaaga  
 302  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Sbjct 50911011 GCCATCTGTGAATGGGGAGAGATGGTGTCTAGCCACCCACAAACAAGCATGGAGGGAAGA  
 50911070

Query 303 cacacagagaatcagagccggagagacagagtgtgcttgagagatatCCTCAGAGACAGTC 361  
 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 50911071 CACACAGAGAATCAGAGCCGGAGAGACAGAGTGCTTGAGAGATATCCTCAGAGACAGTC  
50911129

## İKİ DİZİNİN BLAST SONUCU

Query 6 TCTGTCTCT-CGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGGGTGGCT 64  
||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
Sbjct 497 TCTGTCTCTCCGGCTCTGATTCTCTGTGTGTCTTCCCTCCATGCTTGTGTTGGGTGGCT 556

Query 65 AGACACCATCTCTCCCCATTACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCTTTCTAC 124  
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
Sbjct 557 AGACACCATCTCTCCCCATTACAGATGGCTAGATGCTTTCTCTAAACTTTCTTTCTAC 616

Query 125 CTAGTtctctctctctctcttttcccatctccctctctctttttctctctcagtctctaaat 184  
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
Sbjct 617 CTAGTCTCTCTCTCTCTTTTCCCATCTCCCTCTCTCTTTTCTCTCTCAGTCTCTAAAT 676

Query 185 ctgtctctctAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTCTTGC 244  
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
Sbjct 677 CTGTCTCTCTAGGTTCTGGGTCCATGGATGGGAGAGGGGGTAGATGGTCTAGGCTCTTGC 736

Query 245 CTACCTAATAACGTCCCAGAGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAGACTT 304  
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
Sbjct 737 CTACCTAATAACGTCCCAGAGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAGACTT 796

Query 305 GGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTA 330  
||||||| ||||||||| |||  
Sbjct 797 GGGCTGAAG-TCCCCAGACACG-CTA 820

## DİZİ ANALİZİ 102 bç KLK4 PROMOTOR

### DİZİ ANALİZİ 102 bç KLK4 PROMOTOR

#### 102bp forward

#### E9+41-102F.ab1 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi

GGGAGGAGAGACTTGGGCTGAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCCAGGTGCTGACGT  
GAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGTCGCCACCATGGACATCAAG  
GTGGTGTTACCCCTGGTGTTCAGCGCCCTGGTGCAGGCCAAGAGCACCGAGTTCGACCCCAACATCGACAT  
CGTGGGCCTGGAAGGCAAGTTCGGCATACCAACCTGGAAACCGACCTGTTACCATCTGGGAGACCATG  
GAAGTGATGATCAAGGCCGACATCGCCGACACCGACCGGGCCAGCAACTTCGTGGCCACCGAGACCGACG  
CCAACCGGGGCAAGATGCCCGGCAAGAAGCTGCCCTGGCCGTATCATGGAATGGAAGCCAACGCCTT  
CAAGGCCGGCTGCACCCGGGGCTGCCTGATCTGCCTGAGCAAGATCAAGTGCACCGCCAAGATGAAGGTG  
TACATCCCCGGCAGGTGCCACGACTACGGCGGCGACAAGAAAACCGGCCAGGCCGGCATCGTGGGCGCC  
ATCGTGGACATCCCCGAGATCAGCGGCTTCAAAGAAATGGCCCCATGGAACAGTTCATCGCCAGGTGG  
ACAGATGCGCCAGCTGCACCACCGGCTGCCTGAAGGGCCTGGCCAACGTGAAGTGCAGCGAGCTGCTGAA  
GAAGTGGCTGCCCGACCGCTGCGCCAGCTTCGCCGACAAGATCCAGAAAGAGGTGCACAACATCAAGGGC

ATGGCCGGCGACAGGTGAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTAC  
 TTGCTTTAAAAAACCCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACT  
 TGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTT  
 CACTGCATTCTAAGTTGTGGGTTTGTCCAACTCATCAATGGTACCTTAAGGGCGTAAAATTGTAACCGTT  
 AATATTTTTGTTAAAATTCCCGGTTAAATTTTTGTTAAAATCCGCCCTTTTTTAAACCAAAGGGGCCA  
 AAAAATCGGGAAAAACCCCTTTAAAATCAAAAAAAAAAAC

**Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Forward)**

**Homo sapiens kallikrein related peptidase 4 (KLK4), RefSeqGene on chromosome 19**  
 Sequence ID: [NG\\_012154.2](#) Length: 11387 Number of Matches: 1

Range 1: 4928 to 5000 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
122 bits(66)	2e-24	71/73(97%)	2/73(2%)	Plus/Plus
Query 1	GGGA-GGAGAGACTTTGGGCTG-AGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCC	58		
Sbjct 4928	GGGATGGAGAGACTTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTCAGTCCTCATCCCC	4987		
Query 59	AGGTGCTGACGTG	71		
Sbjct 4988	AGGTGCTGACGTG	5000		

**102bp reverse**

**E10+41-102R.ab1 kodu ile dizi analizi firmasından gelen dizi**

ACGTCCGTTTCGGGCTTACTCGCTCGGGCTTTTTCTTTTCCCCACCCCCCCCCCAAGTTGGGGGGAAGG  
 CCCAGGGCTTGCAAGCCAAAGTTGGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTATTCATAATTATTTAG  
 ATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA  
 TCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC  
 CTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGG  
 ATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTC  
 TAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAATCC  
 TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG  
 GATAAGGCGCAGCGTCCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC  
 ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGCGCGAC  
 AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG  
 GTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG  
 GCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGCTCA  
 CATGTAATAAAATATCTTTATTTTATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGTACTAACATA  
 CGCTCTCCATCAAAAACAAAACGAAACAAAACAACTAGCAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGT  
 GCCAGAACATTTCTCTACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGC  
 ATTAGTTACTAGCGCTACCGACTCAGATCTCGAGCAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAAGAGAGG  
 GATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGCTATTT

**Dizinin reverse complementi**

AAATAGCGTGTCTGGGGATCTTCAGCCCAAGTCTCTCCATCCCTCTCTTTGTCCCTCCCTTTCTCCCTCTGCT  
 CGAGATCTGAGTCCGGTAGCGCTAGTAATAACTAATGCATGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG  
 GGATAACGCAGGAAAGAACATGTAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCACTTGCCTGGGGACAGCCTATTTT  
 GCTAGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTT  
 CACACAGATGTAATGAAAATAAAGATATTTTATTACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACC

GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGC  
TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT  
GCGCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT  
TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA  
ACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA  
CTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAG  
TTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC  
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTT  
TTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG  
TCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTAC  
CTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAATAATTATGAATAACCTGAGGCTATGGC  
AGGGCCTGCCGCCCAACTTTGGCTTGCAAGCCCTGGGCCTTCCCCCAACTTGGGGGGGGGGGGTGGGG  
AAAAGGAAAAAGCCCGAGCGAGTAAGCCCGAAACGGACGT

### Gelen Dizinin NCBI Blast Sonucu (Reverse)

**Homo sapiens kallikrein related peptidase 4 (KLK4), RefSeqGene on chromosome 19**

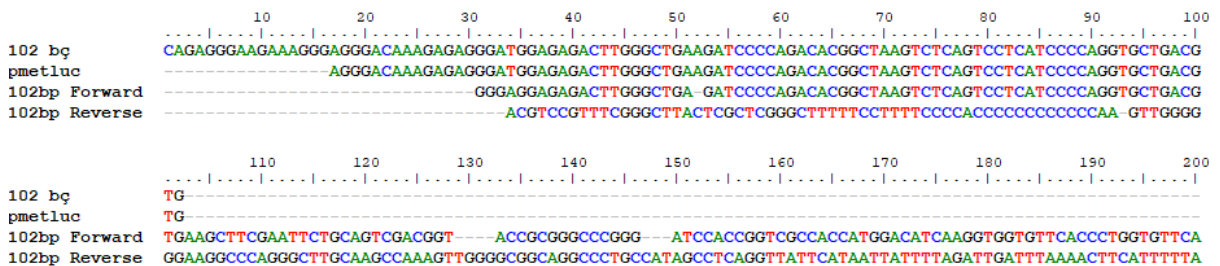
Sequence ID: [NG\\_012154.2](#) Length: 11387 Number of Matches: 1

Range 1: 4899 to 4968 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
122 bits(66)	2e-24	69/70(99%)	1/70(1%)	Plus/Plus
Query 1	CAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCA	60		
Sbjct 4899	CAGAGGGAAGAAAGGGAGGGACAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCA	4958		
Query 61	GACACG-CTA	69		
Sbjct 4959	GACACGGCTA	4968		

### İKİ DİZİNİN BİOEDİT KARŞILAŞTIRMALARI



### NCBI BLAST SONUCU

Sequence ID: Query\_31509 Length: 1126 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 86 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
159 bits(86)	7e-44	86/86(100%)	0/86(0%)	Plus/Plus

Query 17 AGGGACAAAGAGAGGGATGGAGAGACTTGGGCTGAAGATCCCCAGACACGGCTAAGTCTC 76



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : FATMA POYRAZLI

Doğum tarihi ve yeri : 20.10.1985

e-posta : fatmabiyoloji1@hotmail.com

### Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Doktora	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik-Moleküler Onkoloji	2018-2022
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2013-2016
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/BİYOLOJİ	2009-2013
Uzmanlık Alanları	Biyoloji, Moleküler Biyoloji, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Gen Regülasyonu, Gen İfadesi, Kanser Genetiği	

### Burslar

- 1- YÖK 100/2000 Doktora Bursu, 2018-2022 (Moleküler Onkoloji)
- 2- BİDEB 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı,2021-2022
- 3- İnsan ADAMTS-1 Promotorunun Smad2, Smad3 ve Smad4 ile Regülasyonu TÜBİTAK 1002, (2014-2015) Bursu
- 4- Prostat Kanserinde KLK4'ün Transkripsiyonel Regülasyonu, TÜBİTAK 1001, (2018-2022)

### Projeler

- 1- İnsan Adamts1 Promotorunun Smad2, Smad3 ve Smad4 İle Regülasyonu, TÜBİTAK 1002, TBAG 114Z695, 2014-2015 (Bursiyer)
- 2- Prostat Kanserinde KLK4'ün Transkripsiyonel Regülasyonu, TÜBİTAK 1001, 118Z369, 2018-2022 (Bursiyer)

### Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1- Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Fatma Poyrazlı, Derya Babacan, Feray Köçkar (2021). Hipoksi ve Kanser. Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences, 7(3), 450-463.

- 2- Fatma Poyrazlı, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Derya Okuyan, Feray Köçkar (2022). Farklı Hücre Hatlarında KLK4 Gen İfadesinin Belirlenmesi. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi. Kabul edildi, (Doktora tezinin bir kısmı).

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Tam Metin Olarak Basılan Bildiriler**

1. Fatma Poyrazlı, Aysu Bozkurt, Seçkin Şenkaya, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Monosodyum Glutamat (Msg)' In Caenorhabditis elegans Ve İnsan Göbek Kordonuveni Endotel Hücreleri (Huvec) Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması, ICHES-IDU 2020, Tam metin

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Özet Olarak Basılan Bildiriler**

1. Hatice Erdoğan, Fatma Poyrazlı, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Kolon Kanserinde Tgf- $\beta$  Sitokininin Adamt5 mRNA İfadesine Olan Etkisi, 20-21 June 2020, ICHES-IDU 2020 Poster bildiri
2. Merve Ercevahir, Hanife Aktaş, Fatma Poyrazlı, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Prostat Kanserinde Kimyasal Hipoksinin Kansere İlgili Ybx1 Ve Mmp14 Gen İfadesine Etkisi, 20-21 June 2020, ICHES-IDU 2020 Sözlü sunum
3. Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Asena Zisan Peker, Fatma Poyrazlı, Esra Tokay, Feray Köçkar (2017). Evaluation of KLF8 Gene Expressions In Different Cancer Cells. Ivek 2017 Bildiri/Poster)(Yayın No:3848181)
4. Fatma Poyrazlı, Aysu Bozkurt, Seçkin Şenkaya, Sümeyye Aydoğan Türkoğlu, Monosodyum Glutamat (Msg)' In Caenorhabditis elegans Ve İnsan Göbek Kordonuveni Endotel Hücreleri (Huvec) Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması, ICHES-IDU 2020, sözlü sunum

### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Özet Olarak Basılan Bildiriler**

1. Fatma Poyrazlı, Derya Okuyan Babacan, Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU, Feray KÖÇKAR, Prostat Kanserinde CoCl<sub>2</sub> İle İndüklenmiş Hipoksik Koşullarda KLK4 Protein Seviyesinin Belirlenmesi, 19-20 Aralık 2020, Konya Türkiye (Sözlü Bildiri).
2. Fatma Poyrazlı, Sümeyye A. Türkoğlu, Feray Köçkar İnsan Adamt1 Promotorunun Normal ve Hipoksik Koşullarda Regülasyonu. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014 Eskişehir (Poster Bildiri).