

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

**BAZI SİTOKİNLERİN C/EBP8 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL  
REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SERPİL UĞRAŞ**

**Balıkesir, Temmuz 2007**

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

BAZI SİTOKİNLERİN C/EBP8 GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL  
REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERPİL UĞRAŞ

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Feray KÖÇKAR

Sınav Tarihi: 20/08/2007

Jüri Üyeleri: Prof.Dr.Oktay ARSLAN  
Doç.Dr. Feray KÖÇKAR  
Yrd.Doç.Dr. Elif ÖZTETİK



Balıkesir, Temmuz 2007

**Bu yüksek lisans tezi Tübitak (TBAG-104T036) projesi ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

### BAZI SİTOKİNLERİN C/EBP $\delta$ GENİNİN TRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Serpil UĞRAŞ  
Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoloji Anabilimdalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı : Doç Dr. Feray KÖÇKAR)  
Balıkesir, 2007

C/EBP'ler (CCAAT/enhancer binding proteins) C-terminus'da tüm üyelerinde korunmuş bir bazik lösin fermuar domaini içeren transkripsiyon faktör ailesidir. Bu domain bir DNA bağlanma ve dimerizasyon motifi oluşturmaktadır. Ailenin altı farklı üyesi, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$ , ve C/EBP $\zeta$  olmak üzere, izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır.

C/EBP aile üyelerinden biri olan C/EBP $\delta$  hemen hemen her dokuda ekspre edilmesine rağmen seviyeleri farklılık göstermektedir. Örneğin C/EBP $\delta$  böbrek ve testislerde fazlaca ekspre olmaktadır. İnsan C/EBP $\delta$  geniş bir açık okuma dizisine sahip olan bir eksondan ibarettir. C/EBP $\delta$  269 a.a.'ten oluşan bir protein şifrelemektedir. C/EBP $\delta$  doku veya hücre tipine spesifik tarzda regüle edilmektedir. C/EBP $\delta$  interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrosis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi inflamasyonel uyarıcılar tarafından regüle edilmektedir.

C/EBP $\delta$  doku hasarları, enfeksiyon, inflamasyon ve akut faz cevapta, hücre proliferasyonunda, hücrelerde enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ve meme epitel hücrelerinin apoptosiste önemli rol oynamaktadır. C/EBP $\delta$  gen haritası 8. (8p11.1-p11.2) kromozomdadır. Ve insan kanserlerinin çoğu kromozom 8p'de var olan mutasyonlar sebebiyle olmaktadır. Bu sebeplerdir ki C/EBP $\delta$  son çalışmalarda bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Fakat çok sayıda dokulara spesifik genlerin ekspresyonlarını kontrol eden C/EBP $\delta$ 'nın regülasyonu konusundaki bilgi oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, insan C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel regülasyonunu aydınlatmayı amaçladık. Bu amaçla lüsiferaz vektörüne klonlanmış olan C/EBP $\delta$  promoteri insan hepatoma hücre hattı olan Hep3B hücrelerine kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı. Geçici transfeksiyon uygulaması sonrasında, C/EBP $\delta$  promoterinin bazal aktivitesi lüsiferaz aktivite tayini ile belirlendi. Daha sonra IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  ve IL-1 gibi birçok sitokinin C/EBP $\delta$  promoterinin regülasyonuna olan etkileri saptandı. Genin regülasyonunda etkileri belirlenen sitokinlerin konsantrasyon ve zaman bağlı analizleri yapıldı. Ayrıca C/EBP $\delta$  nin mRNA seviyesinde ekspresyon analizleri RT-PCR çalışmaları ile belirlendi.

**Anahtar kelimeler;** C/EBP, C/EBP $\delta$ , İnflamasyon, Sitokinler, Transkripsiyon faktörleri

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF SOME CYTOKINES EFFECTS IN TRANSCRIPTION REGULATION OF HUMAN C/EBP $\delta$ GENE

Serpil UĞRAŞ  
Balıkesir University, Institute of Science,  
Department of Biology

(MSc. Thesis / Supervisor : Assoc. Prof.Dr. Feray KÖÇKAR)  
Balıkesir-Turkey, 2007

CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) are a family of transcription factors that all contain a highly conserved, basic leucine zipper domain at the C-terminus. The domain consists of DNA binding and dimerization motif. The six members of the family have been isolated and characterized as C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\epsilon$ , C/EBP $\zeta$ .

As one of the C/EBP family members, C/EBP $\delta$  are almost ubiquitously expressed in every tissues, but with varying levels. C/EBP $\delta$  expression is most abundant in kidney and testis. The human C/EBP $\delta$  turned out to be one-exon gene with a large open reading frame encoding a protein of 269 amino acid. C/EBP $\delta$  can also be up-regulated in a tissue or cell type-specific manner. C/EBP $\delta$ , is well known to regulate or co-regulate a wide range of inflammatory mediators and mechanisms in the periphery, including interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

C/EBP $\delta$  also plays a role in acute-phase response in injury, infection and inflammation, cell proliferation, energy metabolism regulation and mammary epithelial cell apoptosis. The human C/EBP $\delta$  gene maps on chromosome 8 (8p11.1-p11.2). Alterations in chromosome 8p are common in human cancers. Accordingly in recent reports, alterations of C/EBP $\delta$  identified as a tumour suppressor gene. However, the knowledge of the regulation of C/EBP $\delta$  that control the transcriptional regulation of a number of tissue specific genes is very limited.

In this study, we aimed to elucidate the transcriptional regulation of the human C/EBP $\delta$  gene. In this purpose, C/EBP $\delta$  promoter in a luciferase vector was transfected in to human hepatoma cell line (Hep3B) with calcium phosphate transfection method. Upon the transient transfection, the basal activity of the C/EBP $\delta$  promoter was determined by luciferase activity. Afterwards, for the determination of cytokine mediated regulation of the C/EBP $\delta$  gene, several cytokines, namely IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  and IL-1 were used and the effect of cytokines on the C/EBP $\delta$  gene investigated. For the cytokines which have an effect on C/EBP $\delta$  gene, concentration, time analysis were completed. Furthermore, the expression levels of C/EBP $\delta$  mRNAs were also determined with RT-PCR analysis.

**Key words;** C/EBP, C/EBP $\delta$ , Cytokines, Inflammation, Transcription Factor.

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Transkripsiyonel Regülasyon	3
1.2. Bazik Lösin Fermuar Motifi (bZIP)	6
1.3. C/EBP (CCAAT / Enhancer -Binding Proteins) Ailesi	8
1.3.1. C/EBP Ailesinin Fonksiyonel Özellikleri	12
1.3.2. C/EBP $\alpha$	15
1.3.3. C/EBP $\beta$	15
1.3.4. C/EBP $\gamma$	16
1.3.5. C/EBP $\epsilon$	16
1.3.6. C/EBP $\zeta$	16
1.3.7. C/EBP $\delta$	17
1.3.7.1. C/EBP $\delta$ Geninin Fonksiyonel Özelliği	17
1.3.7.2. C/EBP $\delta$ Geninin Transkripsiyonal Regülasyonu	21
1.4. Transfeksiyon	23
1.4.1. Geçici Transfeksiyon	23
1.4.2. Kararlı Transfeksiyon	23
1.4.3. Transfeksiyon Metotları	24
1.4.3.1. Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Yöntemi	24
1.4.3.2. DEAE-Dextran Yöntemi	25
1.4.3.3. Elektroporasyon Yöntemi	25
1.4.3.4. Biolistik (Gen Tabancası) Yöntemi	26
1.4.3.5. Liposom Temelli Gen Aktarımı	26
1.4.3.6. Virüslere Dayalı Gen Aktarımı	26
1.5. Sitokinler	27

1.6.	Amaç	31
2.	MATERYAL VE METOD	33
2.1	Materyal	33
2.1.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	33
2.1.2.	Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	33
2.1.3.	Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	34
2.1.4.	Bakteriyel Soylar	34
2.1.5	Çalışmada Kullanılan Plazmitler	34
2.2	Metot	36
2.2.1	Cam-Plastik Malzemenin ve Doku Kültürü Odasının Sterilizasyonu	36
2.2.2	Mikrobiyolojik Metodlar	36
2.2.2.1.	<i>E.coli</i> için Bakteriyel Kültür Ortamları	36
2.2.2.2.	Antibiyotik Hazırlanması	36
2.2.2.3.	Ön Kültür Hazırlanması	37
2.2.2.4.	Bakteri Stoklarının Korunması	37
2.2.2.5.	Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması	37
2.2.2.6.	Transformasyon	37
2.2.2.7.	Düşük Ölçekli Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)	38
2.2.2.8.	Yüksek Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu (Maksiprep)	38
2.2.3.	Hücre Kültürü Metotları	39
2.2.3.1.	Hücre Kültür Ortamı	39
2.2.3.2.	FCS Hazırlanması	39
2.2.3.3.	PBS Hazırlanması	39
2.2.3.4	Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması	39
2.2.3.5.	Hücre Soyunun Başlatılması	40
2.2.3.6.	Hücrelerin Büyütülmesi	40
2.2.3.7.	Hücrelerin Pasajlanması	40
2.2.3.8.	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) Ve Hücre Sayımı	41
2.2.4.	DNA ile İlgili Teknikler	42
2.2.4.1	Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA Kesimi	42
2.2.4.2.	Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu	42

2.2.4.3.	Ligasyon	42
2.2.4.4.	DNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi	43
2.2.4.4.1.	Spektrofotometrik Yöntemler	43
2.2.4.4.2.	Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi	43
2.2.5.	Geçici Transfeksiyon Deneyleri	44
2.2.5.1.	Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon	45
2.2.5.2.	Fugene Hd kit ile Geçici Transfeksiyon	46
2.2.5.3.	Modifiye Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon	47
2.2.5.4.	Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması	49
2.2.5.5.	Geçici Transfeksiyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	49
2.2.5.5.1.	Lusiferaz Aktivite Tayini	49
2.2.5.5.2.	Beta-Galaktosidaz Aktivite Tayini	50
2.2.6	RNA İle İlgili Teknikler	50
2.2.6.1	RT-PCR çalışmaları	50
2.2.6.1.1.	Total RNA İzolasyonu	51
2.2.6.1.2.	RNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi	52
2.2.6.1.2.1.	Spektrofotometrik Yöntemler	52
2.2.6.1.2.2.	Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	52
2.2.6.1.3.	RT-PCR	53
2.2.6.4.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	55
2.2.7	Sonuçların İstatistiksel Olarak Analiz Edilmesi	56
3.	BULGULAR	57
3.1.	C/EBP $\delta$ Promotörünün Bioinformatik Analizi	56
3.2.	Geçici Transfeksiyon stratejisi	61
3.3.	Kısaltılarak Hazırlanan 760b $\phi$ C/EBP $\delta$ Promotör Plazmiti	63
3.4.	Geçici Transfeksiyon Deneylerinin Optimizasyonu	65
3.5.	Bazal Promotör Aktivitelerin Belirlenmesi	67
3.6.	Farklı Sitokin Uygulamaları	67
3.7.	Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	68
3.6.	RT-PCR Çalışmaları	85
3.6.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları	86
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	93
5.	KAYNAKLAR	101



## SEMBOL LİSTESİ

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>
APR	Acute-phase response
cDNA	Copy DNA
C/EBP	CCAAT / Enhancer -Binding Proteins
CHOP	C/EBP-homologous protein
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
FCS	Fetal Calf Serum
GCN4	General Control Nonderepressible 4
HEPES	N-2-Hidroksietilpiperazin-N-2-etansulfonik asit
IFN- $\gamma$	İnterferon- $\gamma$
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
kD	Kilo dalton
ONPG	Orto-nitrofenol $\beta$ -D galaktopiranoz
RT-PCR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TAF	TBF-Associated Factors
TBF	TATA-Binding Protein
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör- $\alpha$
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF- $\beta$	Tümör gelişim faktör- $\beta$
U	Enzim ünitesi
UV	Ultra-viyole

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1.1.	Gen ekspresyonu ve gen ekspresyonunun kontrol mekanizmalarının şematik gösterimi	2
Şekil 1.2	Bazal transkripsiyonun başlangıç aşaması ve genel transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla RNA polimerazın promotöre bağlanma aşaması	4
Şekil 1.3.	Transkripsiyon faktörlerinin, diğer genlerin regülasyonuna olan etkisinin şematik olarak gösterimi	5
Şekil 1.4	İki bZIP proteinin dimerizasyon ve DNA bağlanma modeli	8
Şekil 1.5	C/EBP'lerin DNA bağlanma ve dimerizasyon motifi	10
Şekil 1.6	C/EBP proteinlerinin yapısal domainlerinin şematize edilmesi	11
Şekil 1.7	Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metodu	25
Şekil 2.1	PGL2 plazmit vektör haritası	35
Şekil 2.2	RSV plazmit vektör haritası	35
Şekil 2.3	Beta-galaktosidaz plazmit vektör haritası	35
Şekil 2.4	Hemositometre laminın şematik görünümü	41
Şekil 2.5.	Hep3B hücrelerinin faz kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi	44
Şekil 3.1	pLUC vektörünün plazmit haritası	57
Şekil 3.2	1739bç pLUC ekspresyon plazmitinin, HindIII / PstI restriksiyon enzimleri ile yapılmış kesimin agaroz jel elektroforez görüntüsü	58
Şekil 3.3.	İnsan C/EBP $\delta$ promotöründe var olan muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri	59
Şekil 3.4	Lusiferaz reaksiyonu ve reaksiyonun şematik gösterimi	62
Şekil 3.5	181bç iC/EBP delta promotör plazmitinin restriksiyon endonükleazları ile kesim stratejisi ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	63

Şekil 3.6.	760bç iC/EBP delta promotör plazmitinin kısaltılarak hazırlanma stratejisi ve agaroz jel elektroforez görüntüsü	64
Şekil 3.7.	Kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile bazal aktivitenin belirlenmesi	66
Şekil 3.8.	Fugune hd kit transfeksiyon çalışması ile bazal aktivitenin belirlenmesi	66
Şekil 3.9.	Modifiye kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile bazal aktivitenin belirlenmesi	66
Şekil 3.10.	Modifiye kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile üç farklı promotör plazmitinin bazal lusiferaz aktivitesi	67
Şekil 3.11.	TGF- $\beta$ sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi.	70
Şekil 3.12.	TGF- $\beta$ sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	71
Şekil 3.13.	TGF- $\beta$ sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	72
Şekil 3.14.	TNF- $\alpha$ sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	73
Şekil 3.15.	TNF- $\alpha$ sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	74
Şekil 3.16.	TNF-alfa sitokininin, 1739bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	75
Şekil 3.17.	IFN- $\gamma$ sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	76
Şekil 3.18.	IFN- $\delta$ sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	77
Şekil 3.19.	IFN- $\delta$ sitokininin, 1739bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	78
Şekil 3.20.	IL-1 sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi.	79
Şekil 3.21.	IL-1 sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	80

Şekil 3.22.	IL-1 sitokininin, 1739bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	81
Şekil 3.23.	IL-6 sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	82
Şekil 3.24.	IL-6 sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	83
Şekil 3.25.	IL-6 sitokininin, 1738bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi	84
Şekil 3.26.	500U IL-1 sitokini uygulandıktan sonra yapılan RNA izolasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü.	85
Şekil 3.27.	PCR optimizasyon çalışmasının agaroz jel elektroforez görüntüsü	87
Şekil 3.28.	IL-1 sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$ mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	88
Şekil 3.29.	IL-6 sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$ mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	89
Şekil 3.30.	TGF- $\beta$ sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$ mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	90
Şekil 3.31.	IFN- $\gamma$ sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$ mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	91
Şekil 3.32.	TNF- $\alpha$ sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$ mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	92
Şekil 4.1.	Bazı sitokinlerin C/EBP genlerinin ekspresyonlarını düzenleme modeli	95

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge No</b>	<b>Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 1.1	Transkripsiyon faktörlerinden olan bZIP ailesinin çoğu üyesinde korunan lösün açısından zengin bölgenin amino asit dizilerinin karşılaştırılması	7
Çizelge 1.2	C/EBP transkripsiyon faktör ailesinin üyelerinin isimlendirilmesi	9
Çizelge 1.3	İnsanda var olan bazı sitokinler moleküler büyüklükleri, salındıkları hücreler ve görevleri	28
Çizelge 2.1	Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	33
Çizelge 2.2	(0,5)xTBE (Tris-Borate) Tampon	43
Çizelge 2.3	6x DNA Yükleme Tamponu	43
Çizelge 2.4.	2X HBS Transfeksiyon Tamponu	45
Çizelge 2.5.	100XPO <sub>4</sub> Transfeksiyon Tamponu	45
Çizelge 2.6.	Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Transfeksiyon Yöntemi Tamponu II	45
Çizelge 2.7.	Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Transfeksiyon Yöntemi Tamponu	47
Çizelge 2.8	2X Assay Buffer	50
Çizelge 2.9.	10X FA Jel Tamponu	52
Çizelge 2.10	RNA Jelde Yürütme Tamponu	52
Çizelge 2.11.	RNaz İçermeyen dH <sub>2</sub> O	53
Çizelge 2.12.	RT-PCR Birinci Aşama	54
Çizelge 2.13.	RT-PCR İkinci Aşama	54
Çizelge 2.14	PCR Reaksiyonları	55
Çizelge 2.15.	PCR Koşulları	55
Çizege3.1	Transkripsiyon faktörlerinin insan C/EBP $\delta$ promotörü üzerinde var olan bağlanma bölgeleri	61
Çizelge 3.2	PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin dizisi, Tm değeri, ve uzunlukları	86

## ÖNSÖZ

Büyük bir heyecanla başladığım yüksek lisans çalışmamı bitirmenin verdiği mutluluktan öte bilimin içinde yer alabilmenin ve bilime bir şeyler katabilmenin sevinci içerisindeyim. Ne kadar merdivenin en alt basamağında olsamda basamakları bir bir aşacak olmanın verdiği heyecan ise bambaşka bir mutluluktur benim için.

Çalışmalarımın tamamı Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubunda yer almakla kendimi ayrıcalıklı hissetmeme neden olan, çalışmalarım boyunca her anlamda desteğini esirgemeyen, çok sevgili hocam Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a

Laboratuara girdiğim ilk günden bu yana hep yanımda olan, tüm deneyimlerini benimle paylaşan, öğretici, samimi, biricik hocam Arş. Gör. Hatice YILDIRIM'a

Arkadaşlarım Arş. Gör. Görkem DENİZ, Sema COŞKUN, Meltem AYDIN, Nurten ÇANAKÇI, Semra IŞIK ve Leyla YILDIRIMER'e yardımsever, sevecen davranışları sayesinde laboratuvar ortamını samimi hoş bir mekan haline dönüştürdükleri için,

Benim bugünlere gelmemin tek sebebi olan, desteklerini her an hissettiğim canım annem ve canım babam'a ,

Ve hayatımın anlamı, karakteri ile örnek aldığım tek insan biricik eşim Halil İbrahim UĞRAŞ'a sabırla yanımda olduğu, desteklerini hiçbir zaman esirgemediği için,

**Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım**

Serpil UĞRAŞ

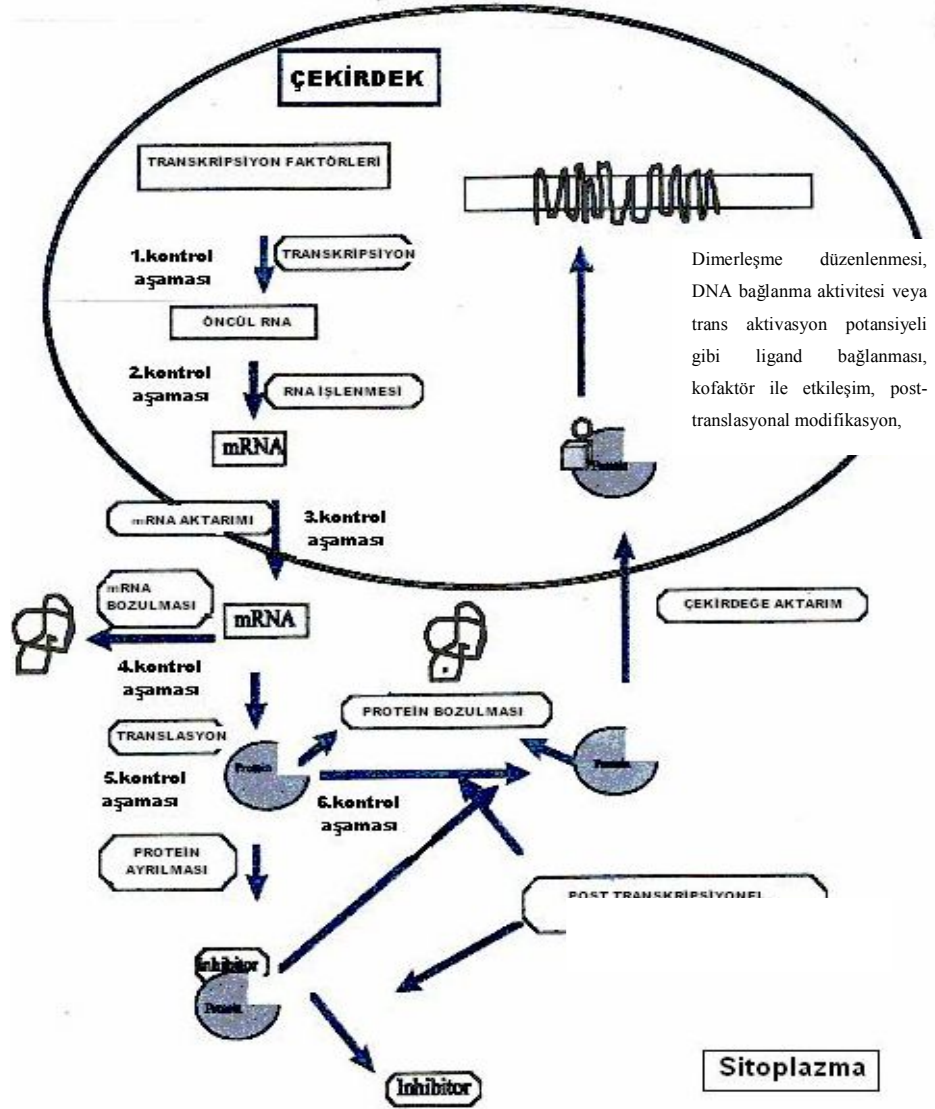
23.08.2007

## 1. GİRİŞ

Prokaryot ve ökaryot hücreler metabolik faaliyetlerini çeşitli mekanizmalar aracılığı ile düzenlemektedir. Düzenleyici mekanizmalar, etkilerini genelde gen faaliyeti üzerinde göstermektedir. Bilindiği gibi, prokaryotlarda birçok gen operon adı verilen birimlerde kümelenmiştir. Operonlardaki genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi, aktivatör proteinler tarafından aktifleştirmek, repressör proteinler tarafından ise inhibe edilmek suretiyle sağlanmaktadır [1]. Ancak ökaryot kromozomları prokaryot kromozomlarına göre hem daha büyük bir yapıya hem de daha yüksek bir yapısal organizasyon derecesine sahiptir. Maya, meyve sineği ve insan genomu, *Escherichia coli* genomuna göre sırayla 4, 40 ve 1000 misli daha fazla DNA içermektedir. Bu fazlalık ökaryotlara, prokaryotlarda bulunmayan potansiyeller kazandırdığı gibi bunlardaki replikasyon ve gen faaliyeti olaylarına da yeni boyutlar getirmiştir [2].

Ökaryot hücrelerde varolan genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi karmaşık regülasyon sistemleri tarafından sağlanmaktadır. Ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun farklı şekillerde düzenlenmesi, hücresel farklılaşmanın ve her türlü hücresel işlevin odak noktasını oluşturmaktadır. Çok hücreli organizmalar farklı hücre tiplerinde aynı DNA içermelerine rağmen, gen regülasyonu sayesinde her hücrenin tipine özgü farklı genlerin ekspresyonu sağlanabilmektedir [3]. Özetlemek gerekirse, organizma gen regülasyonu sayesinde, belirli bir hücre tipinde belirli bir gen takımını, farklı hücre tiplerinde ise diğer farklı gen takımını çalıştırabilme yeteneğine sahiptir. Çok hücreli organizmalarda gen regülasyonu, genomun özgün kısımlarını etkin hale geçiren, diğer genleri baskılayan kontrol mekanizmaları ile açıklanmaktadır [4].

Çok hücreli organizmalarda gen ekspresyonu altı farklı aşamada kontrol edilmektedir (Şekil 1.1). Bu aşamalar sırasıyla; transkripsiyonel kontrol, transkripsiyon sonrası kontrol, sitoplazmaya aktarım kontrolü, mRNA kararlılığı, translasyonel kontrol ve protein ürünlerinin translasyon sonrası değişiklikleri esnasındaki kontroldür [4]. Bu kontrol aşamalarından en baskın (önemli) olanı, hücrelerde mutlak gerekli olan ve maksimum enerji tasarrufu açısından da önem teşkil eden; transkripsiyonel aşamada yapılan kontrol aşamasıdır [5]. Kısaca, genin ekspre olup olmayacağına dair karar verilen kontrol aşaması olarak açıklanabilir.



Şekil 1.1. Gen ekspresyonu ve gen ekspresyonunun kontrol mekanizmalarının şematik gösterimi [5]

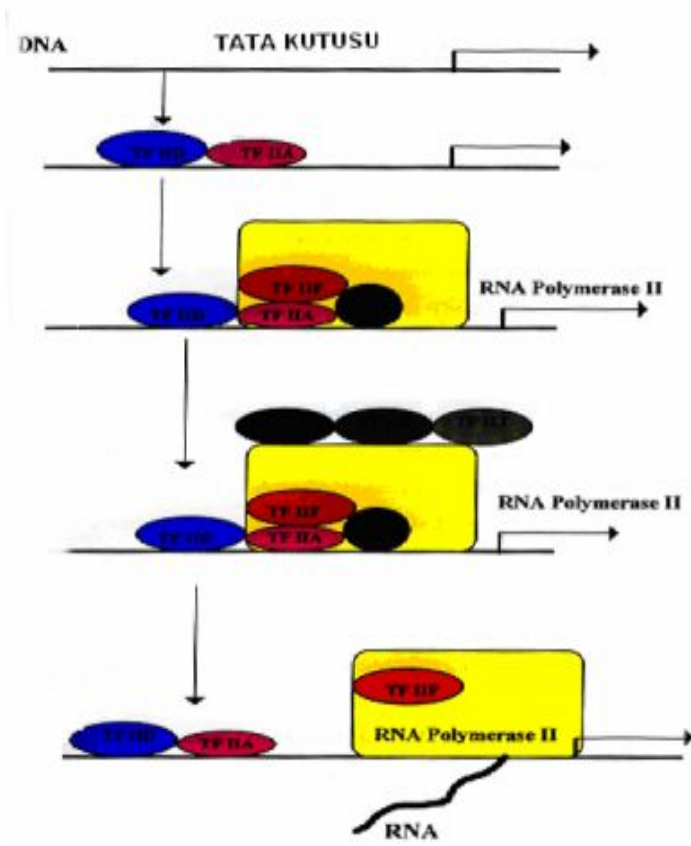


## 1.1. Transkripsiyonel Regülasyon

Ökaryotlarda gen ekspresyonunun başlangıç aşaması, genin düzenleyici dizisi olan promotör dizisine RNA polimeraz II enziminin bağlanması ve ardından transkripsiyonun başlaması şeklinde gerçekleşmektedir. Ancak prokaryotlarda olduğu gibi ökaryotlarda DNA yalın halde değildir, histon proteinleri gibi spesifik birtakım proteinler sayesinde paketlenmiş şekilde, kromatin yapısında, bulunmaktadır [4,5]. Bu sebeple polimeraz enzimlerinin bu bölgeyi tanması, bağlanması ve sonrasında transkripsiyon hızının düzenlenmesi gibi olaylar basit mekanizmalar ile sağlanması mümkün değildir. Polimeraz enziminin transkripsiyonu başlatmak amacıyla, ilgili genin ilgili bölgesine bağlanabilmesi, genellikle transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarı kısmında bulunan düzenleyici DNA dizileri (*cis-acting elements*) ile bağ yapabilen birtakım spesifik proteinler (*trans-acting elements*) arasındaki etkileşime bağlıdır [6-10].

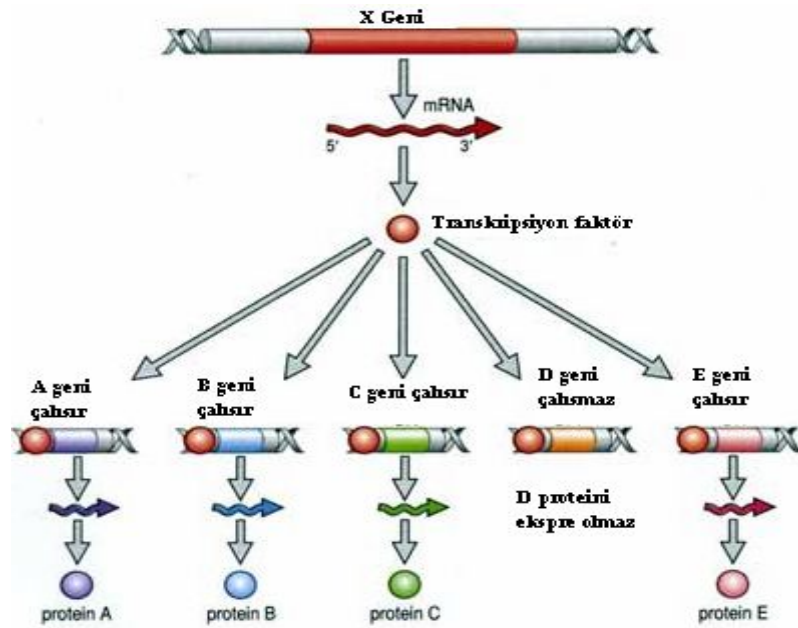
Düzenleyici DNA dizileri; (i). Bazal promotör elementleri; başlangıç noktasının tanımlanmasında ve transkripsiyonun bazal seviyede minimum oranda devam etmesinde kritik rol oynarlar [11]. (ii). Yukarı bölge düzenleyici elementler [12]. (iii). Arttırıcılar; promotör aktivitesini arttırıcı dizilerdir [13]. (iv). Baskılayıcılar; enhansırlara benzer tarzda işlev görürler fakat transkripsiyonu baskılayıcı dizilerdir [14]. (v). Lokus kontrol bölgeleri, birçok geni içeren lokusun ekspresyonunu düzenleyici dizilerdir [15]. Bu gibi düzenleyici DNA dizileri transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumludurlar. Yalnız bu diziler transkripsiyonun düzenlenmesinde yeterli değildir. Yapılan çalışmalarda RNA polimerazın kendisinin bir parçası olmayan ancak transkripsiyonun başlamasını kontrol etmek için gerekli olan proteinlerin varlığı saptanmıştır. Transkripsiyon faktörleri (*trans-acting elements*) olarak bilinen bu proteinler, promotör üzerinde son derece özgün biçimde bir araya gelerek RNA polimerazın promotörü tanmasını ve bağlanmasını sağlayan bir platform oluştururlar [4].

Bazal transkripsiyonun başlayabilmesi için, öncelikle TFIID kompleksi kendi alt birimi olan TBP aracılığı ile TATA kutusuna bağlanır. TFIID, TBP ve TAF adı verilen ilave faktörlerden oluşur. TBP ve TFIID transkripsiyon faktörlerinin diğer birimleri yaklaşık 20 baz çiftlik bir DNA bölgesine bağlanır. TFIID, aktivatör proteinlerin bağlanması ile ortaya çıkan konformasyonel değişiklikler sonucu TFIIA ve TFIIB gibi ilave faktörlerin bağlanmasını sağlarlar. Daha sonra RNA polimeraz II ve TFIIF gibi ilave faktörler yapıya eklenir ve bunu TFIIIE, TFIIH ve TFIIJ gibi faktörlerin bağlanması takip eder. Son basamak promotörün temizlenmesi adı verilen RNA polimerazın TATA kutusunu terk ettiği ve DNA transkripsiyonunun aşağı tarafta bazal seviyede ilerlediği basamaktır [4] (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Bazal transkripsiyonun başlangıç aşaması ve genel transkripsiyon faktörlerinin yardımıyla RNA polimerazın promotöre bağlanma aşaması [16].

Bir genin ekspresyon ürünü olan transkripsiyon faktörü, aynı anda birden fazla ve farklı genin ekspresyonundan sorumlu olabilmektedir. Bunun yanı sıra regülasyonundan sorumlu olduğu bazı genlerin, ekspresyonlarını pozitif yönde regüle ederken, diğer genlerin ekspresyonlarını negatif yönde etkileyebilmektedir (şekil 1.3). Örneğin C/EBP içerisinde incelenen C/EBP- $\zeta$ , C/EBP'lerin bir inhibitörü diğer genlerin ise direk aktivatörü gibi davranır (1.3.'de belirtilmiştir).



**Şekil 1.3.** Transkripsiyon faktörlerinin, diğer genlerin regülasyonuna olan etkisinin şematik olarak gösterimi

Gen faaliyetlerinin kontrolünde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin aktifliği allosterik değişimler ve tersinir kovalent etkileşimler ile kontrol edilmektedir. Bu proteinler DNA'yı büyük ölçüde diğer proteinleri tanıdıkları gibi tanımaktadırlar. Bunlar öncelikle etkileşecekleri yüzey ile uygunluk gösteren bir üçüncül yapı oluşturmakta ve daha sonra geniş bir yüzeyde çok sayıda kimyasal etkileşimi sağlayabilecek yakınlıkta bir mesafeye ulaşmaktadırlar [17,18]. Protein ve DNA'nın birbirini tanması, bir proteinin diğer proteini tanmasında olduğu gibi hidrojen bağları, iyonik ve hidrofob

etkileşimler aracılığı ile olmaktadır [19]. Protein ve DNA arasındaki etkileşimin spesifikliğinin aydınlatılması, büyük ölçüde X ışını kırınımı çalışmaları ile çözümlenmiştir. Bu çalışmalar, proteinlerin DNA'yı ortak yapısal motifler aracılığı ile tanıdıklarını ve bu tanımada simetrik bir uygunluğun da söz konusu olduğunu ortaya çıkarmıştır. DNA'ya bağlanan proteinleri kodlayan genlerin büyük çoğunluğu klonlanmış ve bunların özellikleri tanımlanabilmiştir.

Transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanma domainlerinin yapıları temel alınarak sınıflandırılmıştır [20-22]. Gerek prokaryotlar gerekse ökaryotlarda transkripsiyonu düzenleyen proteinlerde saptanan ortak yapısal motifler sarmal-dönüş-sarmal motifi, homeo kutusu motifi, çinko parmak motifi, bazik lösin fermuar motifi ve sarmal-ilmek-sarmal motifi, gibi birçok üyesi mevcut olan sınıflar ve daha karakteristik olan tam anlamıyla tanımlanamamış; sarmal-kiriş-sarmal vs. olmak üzere farklı sınıflar altında toplanabilmiştir [3]. Transkripsiyon faktörleri DNA bağlanma bölgesi dışındada birden çok sayıda aktivasyon bölgesi içerebilmektedir [23,24]. Bu sayede enhansır, silensır ve diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşebilmektedir.

### **1.2. Bazik Lösin Fermuar Motifi (bZIP)**

DNA'ya bağlanmayı sağlayan lösin fermuarı motifinin varlığı, memelilerdeki çeşitli onkogen ürünleri (FOS, MYC, JUN) ile mayada bulunan ve DNA dizisini özgün bir şekilde tanıyan bir proteinin (GCN4) a.a. dizi benzerliklerinin karşılaştırılması sırasında ortaya çıkarılmıştır [25,26]. Bu dizi karşılaştırma çalışmaları sonucunda C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) olarak tanımlanan bir protein saptanmıştır. Sıçan karaciğerinden elde edilen bu protein ısıya dayanıklı bir çekirdek proteindir. C/EBP' yi kodlayan genin klonlanıp dizi analizi ile C/EBP geninin DNA'ya bağlanan bölgesinde tespit edilen a.a. dizisinin FOS, MYC ve JUN gibi onkogen proteinler ile bir benzerlik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır [27,28] ( Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** Transkripsiyon faktörlerinden olan bZIP ailesinin çoğu üyesinde korunan lösün açısından zengin bölgenin amino asit dizilerinin karşılaştırılması

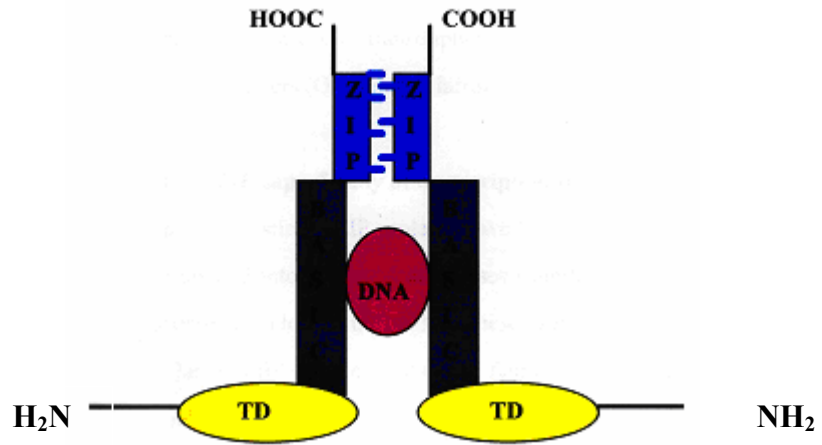
[5]

<b>C/EBP</b>	L T S D N D R L R K R V E Q L S R E L D T L R G I F R Q L
<b>JUNB</b>	L E D K V K T L K A E N A G L S S A A G L L R E Q V A Q L
<b>JUN</b>	L E E K V K T L K A Q N S E L A S T A N M L R E Q V A Q L
<b>GCN4</b>	L E D K V E E L L S K N Y H L E H E V A R L K K L V G E R
<b>FOS</b>	L Q A E T D Q L E D E K S A L Q T E I A N L L K E K E K L
<b>FRA</b>	L Q A E T D K L E D E K S G L Q R E I I E L Q K Q K E R L
<b>C-MYC</b>	V Q A E E Q K L I S E E D L L R K R R E Q L K H K L E Q L
<b>N-MYC</b>	L Q A E E H Q L L L E K E K L Q A R Q Q Q L L K K I E H A
<b>I-MYC</b>	L V G A E K K M A T E K R Q L R C R Q Q Q L Q K R I A Y L

C/EBP'nin DNA'ya bağlanan bölgesinin yaklaşık yarısına eşit olan ve 35 a.a. içeren kısmında, yedi a.a.'de bir tekrarlanan lösün a.a. bulunmaktadır. Bu yapıda, düzenli bir diziliş gösteren artı yüklü a.a.'de fazla miktarda bulunmaktadır. Bu zıt yüklü a.a.'ler heliksteki çiftlerin meydana gelişini sağlamaktadır (Şekil 1.4). Bu özelliklerin tümü FOS, MYC, JUN ve GCN4 proteinleri için de geçerlidir. Heliksin çift oluşturma yeteneği, heliksin kararlılığına katkıda bulunmaktadır. Düzenleyici proteinlerde saptanan bu yapıyı keratinlerde, laminlerde ve miyozinin ağır zincirinin kuyruğundaki dördüncül yapıda da görmek mümkündür [27]. Bu benzerlik, bu sınıf polipeptidlerin lösün tekrar heliksi ile dimerleşebilecekleri varsayımına neden olmuştur. Daha sonra C/EBP ve C/EBP ile aynı grupta bulunan proteinlerin iç yüzey dimerleşmesinin lösüne bağlı olduğu anlaşılmıştır.

Bununla beraber, lösün fermuarı, C/EBP'nin DNA ile diziye özgü tarzda etkileşimi için ihtiyaç duyulan tek faktör değildir. Çalışmalar lösün tekrarının amino ucuna doğru yerleşmiş 30 a.a. içeren bir parçasının, proteinin DNA'ya bağlanması sırasında değişmeden kaldığını ortaya çıkarmıştır [29]. Bu parçadaki a.a.'lerin çoğu bazik karakterli olup, C/EBP'nin 35 a.a.'lik

bölgesindeki bazik a.a.'ler ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Böylece heliksler arası dimerleşme iki alt birimdeki bazik karakterli bölgelerin yardımı ve lösün fermuarı tarafından gerçekleştirilmekte ve bu yolla protein DNA'ya bağlanmaktadır. Örneğin FOS proteini DNA'ya yalnız başına bağlanamadığı halde JUN ile birleştiği zaman bağlanabilmektedir. Bu durum FOS/JUN birleşmesinin, bunların yapılarındaki lösün fermuarı ile gerçekleştiğini göstermektedir [24].



Şekil.1.4. İki bZIP proteinin dimerizasyon ve DNA bağlanma modeli [16]

### 1.3. C/EBP (CCAAT / Enhancer -Binding Proteins) Ailesi

C/EBP proteinleri ilk olarak Steve McKnight'ın laboratuvarında sıçan karaciğer hücre nükleusunda ısıya dayanıklı bir çekirdek trans aktivatör proteini olarak tanımlanmış ve C/EBP geni 1988 yılında klonlanmıştır [30,31].

C/EBP'lerin DNA bağlanma ve dimerizasyon domaininin bazik lösün fermuarı (basic-leucine zipper, bZIP) motifi modelinde olduğu yapılan detaylı çalışmalarla tespit edilmiştir [32-34]. 1992 yılında C/EBP ailesinin diğer beş üyesi tanımlanmış ve üyelerinin tümünde karboksil ucunda bZIP domain bölgesinin varlığı kanıtlanmıştır [35-37]. Altı farklı C/EBP geni birbirinden

bağımsız laboratuvarlarda, farklı zamanlarda klonlanarak karakterize edilmiş ve farklı isimler ile adlandırılmışlardır [35-37] (Çizelge 1.2).

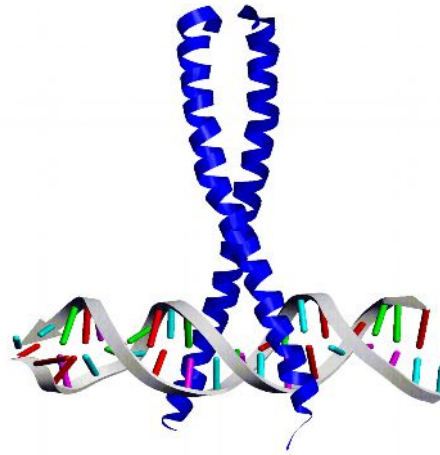
1996 yılında Cao ve arkadaşları isimlendirmede meydana gelebilecek kargaşayı önleyebilmek amacıyla sistematik bir isimlendirme oluşturmuşlardır [38]. Yunan alfabesini kullanarak C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , ve - $\zeta$  olarak C/EBP ailesinin altı üyesini isimlendirmişlerdir [39].

Genellikle C/EBP $\alpha$ ; yağ doku, karaciğer, akciğer, bağırsak, adrenal bez, periferik-kan hücreleri ve plesantata, C/EBP $\beta$ ; karaciğer, bağırsak, akciğer, yağ doku, dalak, böbrek ve myelomonositik hücrelerde, C/EBP $\delta$ ; yağ doku, akciğer, bağırsak C/EBP $\gamma$  ve C/EBP $\zeta$  tüm organ ve dokularda, C/EBP $\epsilon$ ; myeloit ve lenfoit hücrelerde yüksek seviyelerde ekspre edilmektedirler [40-45].

**Çizelge 1.2.** C/EBP transkripsiyon faktör ailesinin üyelerinin isimlendirilmesi [16].

Gen	Alternatif İsimler	Kaynak
C/EBP $\alpha$	C/EBP, RcC/EBP-1	Sıçan, fare, insan, tavuk, sığır, balık, <i>Xenopus laevis</i> , <i>Rana catesbeiana</i>
C/EBP $\beta$	NF-IL6, IL-6DBP, LAP, CRP2, NF-M, AGP/EBP, ApC/EBP	Sıçan, fare, insan, tavuk, sığır, balık, <i>Xenopus laevis</i> , <i>Aplysia</i>
C/EBP $\gamma$	Ig/EBP-1	Sıçan, fare, insan, tavuk, balık,
C/EBP $\delta$	NF-IL6 $\beta$ , CRP3, CELF, RcC/EBP2	Sıçan, fare, insan, tavuk, sığır, ovine, balık, <i>Rana catesbeiana</i>
C/EBP $\epsilon$	CRP-1	Sıçan, fare, insan, ovine, balık
C/EBP $\zeta$	CHOP-10, GADD153	Fare, sıçan, insan, hamster

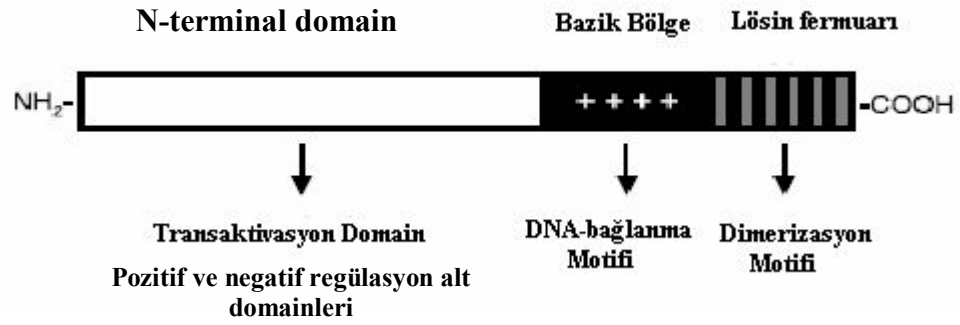
Tüm C/EBP isoformlarının %90'dan daha yüksek bir oranda 55-65 aminoasit içeren karboksil uca bZIP (bazik-lösin fermuar) domain içerdiği tanımlanmıştır [46]. C/EBP ailesinde tanımlanan bu domain, lösin fermuar yapısı ilk kez, sıçan karaciğeri hücresine ait bir çekirdek proteininde 35 a.a.'lik bir dizi olarak saptanmıştır. Bu dizide dört lösin a.a. birbirlerinden yedi a.a. ile ayrılmıştır ve bu bölgenin iki yanında bazik a.a.'lar bulunmaktadır. Lösin a.a.'larının bulunduğu bölge bir sarmal yapı oluşturur ve sarmalların her bir dönüşünde lösin çıktıları görülür. Bu şekilde iki molekül bir araya gelince, lösinler bir fermuar gibi birleşirler, başka bir deyişle iki molekül, lösin fermuarları ile bir arada tutulur. Dimer yapısında, fermuar kısma komşu olan iki bazik  $\alpha$ -sarmal bölgesi bulunur. Bu bölge DNA'daki fosfat gruplarına ve özgün bazlara bağlanarak dimerin DNA üzerinde bir makas gibi görünmesine neden olur [4] (şekil 1.5). Başka bir deyişle; bazik a.a.'larca zengin DNA bağlanma bölgesinden ibaret olan bu domain lösin fermuarı olarak adlandırılan bir dimerizasyon motifi oluşturmaktadır [14]. C/EBP proteinlerinin hedef genin transkripsiyonel düzenlenmesinde dimerik formlarının aktif olduğu saptanmıştır [47]. C/EBP'lerin DNA'ya bağlanabilmesi için dimerizasyonun önceden oluşturulması gerekmektedir, bazik bölge tarafından yapılan dimerizasyon  $\alpha$ -helix yapısı olarak kabul edilir [48,49].



**Şekil 1.5.** C/EBP'lerin DNA bağlanma ve dimerizasyon motifi [50]



C/EBP'lerin DNA'ya spesifik bir şekilde bağlanabilmesi bazik bölge içerisindeki a.a. dizisi tarafından belirlenir [51]. bZIP domainin yüksek korunmuşluğu sebebiyle; C/EBP- $\zeta$  bunun dışında tutulmak koşulu ile farklı C/EBP proteinleri aile içi (diğer grup üyeleri ile) kombinasyonlar ile heterodimerleri oluşturabilmektedir [52]. C/EBP- $\zeta$  prolin bölgesinde  $\alpha$ -heliks yapısını bozucu iki prolin rezidüsü taşıması sebebiyle hariç tutulmaktadır [53]. C/EBP- $\zeta$  diğer C/EBP'ler ile dimerizasyon yapsa da hedef genin C/EBP tanıma bölgesine bağlanamayan bir heterodimer oluşur [53]. Bu nedenle C/EBP- $\zeta$ , C/EBP'lerin bir inhibitörü diğer genlerin ise direk aktivatörü gibi davranır. C/EBP üyelerinin tümünde DNA- bağlanma bölgesi tam anlamıyla korunmuş olmasına rağmen üyeler arasında yapısal homoloji sınırlıdır [54]. C/EBP proteinlerinin N-terminus bölgeleri tümünde, tam anlamıyla korunmuş üç kısa dizi dışında, %20 den daha az benzerlik gösterebilmektedir [55]. Bu üç korunmuş dizi aktivasyon domainini ifade eder transkripsiyonu uyarıcı ve bazal transkripsiyon bileşenlerinin bir parçasıdır [53,55] (şekil 1.6).



**Şekil 1.6.** C/EBP proteinlerinin yapısal domainlerinin şematize edilmesi [55]

Yapılan çalışmalarda C/EBP izoformları hem mRNA, hem de protein seviyesinde farklı doku ve hücrelerde tanımlanmıştır [56]. Farklı tekniklerin kullanılması, türden türe varolan farklılıklar, ya da dokuya özel post-transkripsiyonel düzenlenme mekanizmalarının farklılığı sebebiyle birbirlerinden oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir.

C/EBP ailesinin işlevi detaylı bir şekilde araştırıldığında; hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolü, bağışıklık ve enfeksiyon sürecinde, çeşitli hastalıklara karşı verilen hücrel cevabın oluşturulması gibi birçok hücrel fonksiyonun düzenlenmesinden sorumlu oldukları bulunmuştur [36].

### 1.3.1. C/EBP Ailesinin Fonksiyonel Özellikleri

Hücre kültürü temelli model sistemler kullanılarak, C/EBP ailesinin hedef genlerinin promotör bölgelerinin analizi, C/EBP ekspresyonlarının indüklenmesi ve inhibe edilmesi gibi yapılan farklı çalışmalarda, C/EBP ailesinin işlevi hakkında yeterli olmasa da epeyce bilgi sağlanmıştır. C/EBP proteinlerinin tanımlanmış temel fonksiyonları; hücrel farklılaşma, bağışıklık ve enfeksiyon sürecinde çeşitli hastalıklara karşı verilen hücrel cevabın oluşturulması karaciğer yenilenmesi, hücrel metabolizma, hücreler arası iletişim gibi önemli yaşamsal fonksiyonlardır [36].

C/EBP'lerin ekspresyon seviyeleri; fizyolojik ve patofizyolojik şartlarda sitokinler, mitojenler, hormonlar, besleyiciler ve hücrel strese neden olan ajanlar tarafından düzenlenmektedir. C/EBP'lerin ekspresyon seviyelerinin düzenlenme mekanizmaları, miktarı, türden türe, hücreden hücreye ve dokudan dokuya göre değişmektedir [57].

Son on yıl içerisinde yapılan çalışmalarda; hücrelerde poliferasyon, farklılaşma, apoptosis, metabolizmanın kontrolü ve spesifik genlerin regülasyonu gibi işlevlerin sürdürülmesinde C/EBP'lerin çok önemli bir yeri olduğunu gösterilmiştir.

*Kanser*, C/EBP aile üyelerinden insan kanserleri ile ilgili ilk bilgi CHOP (C/EBP $\zeta$ ) sayesinde tanımlanmıştır. İnsan mixoid liposarkomada %100 karakteristik bir translokasyon mevcuttur [t(12;16)(q(13;p11))]. Bu translokasyon sonucunda, tümör patolojisinde incelenen TLS-CHOP füzyon

protein oluşmaktadır [58]. Böylece CHOP'un doğrudan mixoid liposarkoma kanser türünde etkili olduğu saptanmıştır.

Sonraki çalışmalar, diğer C/EBP'lerinde farklı kanser türleri ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Akut myeloid lösemi (AML) hastalarında C/EBP $\alpha$  geninde fonksiyonel kayıba neden olan mutasyon %7 (10/150) oranında tespit edilmiş [59]. Akciğer kanser türlerinde C/EBP $\alpha$  gen ekspresyonu %43 (23/53)'de azalmıştır [60]. C/EBP $\beta$  geninin tek nükleotid değişimi sonucunda oluşan mutasyon, KC122 insan kronik myelojenus lösemi hücre hattında tanımlanmıştır [61].

*Apoptosis*, C/EBP transkripsiyon faktörleri ailesi içerisinde incelenen CHOP (C/EBP $\zeta$ ) myeloblastic lösemi hücrelerinde p53 bağımlı olmaksızın apoptosise neden olmaktadır. Buna ilaveten Bcl-2 transkripsiyon faktörünün bu süreci geciktirdiği saptanmıştır. Bu sayede p53 geninin inaktif olduğu tümörlere karşı, CHOP'a bağımlı yeni stratejiler geliştirilebilecektir [62].

*Hücre sel proliferasyon*, karaciğer proliferasyonu, C/EBP $\beta$ 'nin ekspresyon seviyesinin artması ile ilişkilendirilmiştir. C/EBP $\beta$  geni içermeyen fare kullanılarak, karaciğerin bir kısmının uzaklaştırılması temeline dayanan deneyde, karaciğer hücrelerinde, bu süreç boyunca normal bir proliferasyon gözlenmemiştir [63]

*Hücre sel farklılaşma*, yağ doku farklılaşması hakkında bilgi edinmek amacıyla birçok hücre kültür model sistemleri kullanılmış, C/EBP izoformlarının özellikle C/EBP $\alpha$ 'nın yağ doku farklılaşmasında önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır. Yağ doku farklılaşmasının erken safhalarında, C/EBP $\delta$  ve C/EBP $\beta$  adipojenik hormonlara cevap olarak yüksek seviyelerde ekspre olmaktadır, farklılaşmanın son evrelerinde ise C/EBP $\alpha$  ekspresyonu artmaktayken, C/EBP $\delta$  ve C/EBP $\beta$  ekspresyon seviyesi azalmaktadır [64].

C/EBP izoformları, kemik iliği hücrelerin, bağırsak epitel hücrelerin, meme epitel hücrelerin, ovaryum folikül ve akciğerde tip II alveolar hücrelerin farklılaşmasından birinci derecede sorumludurlar [65].

*Metabolizmanın kontrolü*, C/EBP $\alpha$ 'dan yoksun farelerin doğumdan hemen sonra hipoglisemi, glikojen sentazın ekspresyonunun azalmasına bağımlı olarak öldükleri tanımlanmıştır. Bu farelerin karaciğerlerinde glikojen sentez, glukoneojenesis ve bilirubin detoksifikasyon gibi birçok genin ekspresyon seviyesi azalmakta, buna bağlı düzensizlikler meydana gelerek ölümler gözlenmektedir [66].

*Dokulara spesifik gen ekspresyonlarının kontrolü*, transkripsiyonel seviyede düzenlenir ve bu aşamada birçok transkripsiyon faktörü devreye girerek genlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir. Enfeksiyon, stres ve diğer patolojik şartlarda vücudun savunma mekanizmalarından biri olan APR (acute-phase response) esnasında karaciğerde, birçok genin ekspresyonunda, C/EBP izoformlarının önemli oranda etkin olduğu saptanmıştır [67,68].

*İnflamasyon*, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , ve C/EBP $\delta$  olmak üzere üç C/EBP üyesinin ekspresyonu lipopolisakkarit, ve sitokinlerin çoğunu içeren inflamasyonel ajanlar tarafından regüle edilmektedir [69,70].

C/EBP'lerin yukarıda bahsedilen fonksiyonları göz önüne alındığında, yaşam için büyük önem taşıdıkları görülmektedir. Bu sebeptendir ki, C/EBP genlerinin ekspresyonlarının düzenlenme mekanizmasının aydınlatılması yalnızca bilginin artması ile kalmayacak, C/EBP gen ekspresyonu ile ilişkilendirilen hastalıklarda yeni terapötik müdahale hedefleri tanımlanabilecektir. Örneğin; tip1 ve tip2 *diyabetleri* pankreatik  $\beta$ -hücrelerinde, C/EBP- $\zeta$  tarafından baskılanabilmesi hedeflenmektedir [71,72].

C/EBP genlerinde varolan mutasyonların bir takım hastalıklara sebep olduğu tanımlanmıştır [73,74]. Bu sebeple C/EBP ailesi üzerinde yapılan çalışmalar; onkoloji, diyabet, haemotopoesis gibi hastalıkların tedavisinde

ortaya çıkan soruların cevabını önemli ölçüde verebilmektedir ve yine bu çalışmalar sayesinde bu tür hastalıkların tedavisinde yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi sağlanacaktır.

Çalışmalar, C/EBP'lerin spesifik sinyaller tarafından transkripsiyon sonrası düzenlenme ve transkripsiyonel mekanizmaların ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Farklı organizmaların, farklı doku ve hücrelerinde, C/EBP ekspresyonlarının düzenlenme esaslarının farklı olduğu yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır. Sonuç olarak *in vitro*'da hedef gen promotörlerinde bulunan tanıma dizilerine farklı C/EBP üyeleri bağlanmakta olduğu ve bu şekilde hedef genin ekspresyonunu düzenlediği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Fakat *in vitro* çalışmalar *in vivo*'yu tam anlamıyla karşılamayabilir, yani C/EBP'lerin bu alanlara olan ilgileri *in vivo* çalışmalarda değişebileceği akıllardan çıkarılmamalıdır.

### 1.3.2. C/EBP $\alpha$

C/EBP $\alpha$  ilk olarak sıçan karaciğer nükleusunda ısıya dayanıklı bir çekirdek proteini olarak tanımlandı. Herpes simpleks virüs timidin kinaz geninin promotör bölgesindeki CCAAT elementi ve birçok tümör virüslerinin enhancer bölgeleri ile bağlantı kurabilen bir proteindir [75]. C/EBP $\alpha$  geni fare 7. kromozomda, sıçan 1. kromozomda ve insan 19. kromozomda (q13.2) lokalize olmuştur [76]. C/EBP $\alpha$  mRNA; karaciğer, yağ doku, böbrek ve akciğer de bol miktarda bulunurken, diğer dokularda daha düşük miktarda bulunmaktadır [38]. Özellikle hücrel farklılaşma esnasında C/EBP $\alpha$  ekspresyon seviyesi maksimum oranda artmaktadır [77]. C/EBP $\alpha$ 'nın ekspresyon seviyesi birçok hücre dışı uyarıcılar tarafından düzenlenmektedir [78].

### 1.3.3. C/EBP $\beta$

C/EBP $\beta$  geni insan, tavuk, kemirgen, *Xenopus laevis* ve *Aplysia*'dan klonlanarak karakterize edilmiştir [79]. Sığır C/EBP $\beta$  geni 2. kromozomda lokalize olmuş iken, insan C/EBP $\beta$  geni 20.kromozomda (q12-q13.1) lokalize olmuştur [80]. C/EBP $\beta$  mRNA; karaciğer, akciğer, böbrek, dalak ve bağırsak gibi birçok farklı dokuda ekspre edilmektedir [81].

C/EBP $\beta$  hepatositlerin genlerin ekspresyonunu, hem direkt hem de sitokine bağımlı olarak sağlamaktadır [82]. C/EBP $\beta$  makrofajlarda, ovarian luteal cells ve meme epitel hücrelerinde gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde sorumlu olduğu tanımlanmıştır [83].

### 1.3.4. C/EBP $\gamma$

C/EBP $\gamma$  fare, sıçan, insan ve tavuktan klonlanmıştır [84]. C/EBP $\gamma$  geni hemen hemen her doku ve organda ekspre olmasına rağmen, ekspresyon seviyesi farklılıklar göstermektedir. Bazı dokularda ekspresyon seviyesi 20 kat fazla olabilmektedir. B hücrelerinde ekspresyon seviyesi maksimumdur [85]. C/EBP $\gamma$  proteini bütün bir bZIP domain içermektedir, ancak diğer C/EBP izoformlarında var olan aktivasyon domaini içermemektedir. C/EBP $\gamma$ , C/EBP aktivatörleri sayesinde genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayabilmektedir [86].

### 1.3.5. C/EBP $\epsilon$

C/EBP $\epsilon$  sıçan, insan ve koyundan klonlanmıştır. İki ekson ve arasında bir intron içermektedir [87]. İnsan 14(q11.2) kromozomunda lokalize olmuştur. Dalak, lenf bezleri, timus, periferik kan lökositleri ve kemik iliği gibi kan hücreleri orijinal ve immün sistem dokularında ekspre edilmektedir [88].

### 1.3.6. C/EBP $\zeta$

C/EBP $\zeta$  ilk olarak hamster'dan klonlanmıştır. DNA'ya hasar vermesi sebebi ile GADD153 (growth arrest and DNA damage inducible) olarak isimlendirilmiştir [89]. Gen beş ekzondan oluşur. C/EBP izoformları arasında yalnızca C/EBP $\epsilon$  ile C/EBP $\zeta$  intron içermektedir. İnsan 12.(12q13.1-q13.2) kromozomda lokalize olmuştur [90]. C/EBP $\zeta$  mRNA yetişkin dokuların çoğunda bulunmaktadır ve U.V. ışınları, DNA hasarlarında, DNA hasar veren ajanlara maruz kalındığında meydana gelen hücresel stres gibi durumlarda ekspresyon seviyesi artmaktadır [91]. C/EBP $\zeta$  hücre büyümesinin kontrolü ve apoptosiden sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

### 1.3.7. C/EBP $\delta$

C/EBP $\delta$ , NF-IL6 $\beta$ , CRP3 veya CELF gibi farklı isimlerle bilinmektedir [92,93]. C/EBP $\delta$  geni fare, sıçan, insan, amfibi gibi birbirinden farklı birçok türden klonlanılarak karakterize edilmiştir [94]. İnsan C/EBP $\delta$  geni intron içermeksizin, geniş bir açık okuma dizisine sahip olan bir eksondan ibarettir. C/EBP $\delta$  proteini 269 a.a. den oluşmuş ve 28.5 kDA ağırlığındadır [95].

C/EBP $\delta$  geninin kromozomal lokasyonunu tanımlamak amacıyla flouresans in situ hibridizasyon (fish) ile aynı zamanda metafaz safhasında R-bantlama tekniği yapılmıştır [96,97]. İki teknik karşılaştırılarak insan C/EBP $\delta$  geninin 8. kromozomda (8p11.1-p11.2.) bulunduğu saptanmıştır. İnsan C/EBP $\delta$  geni fare C/EBP $\delta$  geni ile %80 nükleotid seviyesinde, %85 a.a. seviyesinde benzerlik gösterirken, sıçan C/EBP $\delta$  geni ile %75 nükleotid ve %86 a.a. seviyesinde göstermektedir [98].

C/EBP $\delta$  hemen hemen her dokuda ekspre olmasına rağmen dokular arasında seviyesel farklılıklar göstermektedir. Yağ dokusu, dalak, akciğer ve

böbrekte C/EBP $\delta$  mRNA yüksek seviyede ekspre olmaktadır, beyin ve karaciğerde ekspresyon seviyesi daha düşüktür [99]. C/EBP $\delta$  ekspresyon seviyesi özellikle böbrek ve testislerde ise maksimum seviyeye ulaşmaktadır [98].

### 1.3.7.1. C/EBP $\delta$ Geninin Fonksiyonel Özelliği

C/EBP $\delta$ 'nın, meme epitel hücrelerinin apoptosisinde, hücre proliferasyonunda, yağ doku farklılaşmasında, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ve hepatositlerde akut faza cevapta önemli rol oynadığı bilinmektedir. C/EBP $\delta$  gen haritası 8. kromozomdadır. İnsan kanserlerinin çoğu kromozom 8p'de var olan mutasyonlar sebebiyle olmaktadır. Bu sebeptir ki C/EBP $\delta$  son çalışmalarda bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmaktadır [100].

*İnflamasyon*, doku yaralanmaları, travma, enfeksiyon ve doku hasarlarının daha da artması ve onarım mekanizmalarının aktive edilmesi gibi durumları kapsayan fiziksel bir cevaptır. Yaşamsal açıdan önem arz eden böylesi bir süreçte, C/EBP $\delta$  karaciğer başta olmak üzere, çeşitli birçok organ veya dokuda inflamasyon esnasında, gerekli gen ekspresyonlarının regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır [101].

*Hücreyel farklılaşma*, C/EBP $\delta$  farklı dokularda ve hücrelerde farklı mekanizmalarda ekspre olmaktadır. *İskelet gelişimi* ve *yağ doku farklılaşmasında* C/EBP $\delta$  geni ekspresyonu glukokortikoidler tarafından arttırılmaktadır ve bu sayede farklılaşma esnasında etkin hale geçerek hücrelerin farklılaşmasında görev yapmaktadır [102,103].

*Apoptosis*, C/EBP $\delta$  meme doku epitel hücrelerinde apoptosis ve Go sürecinde önemli rol oynamaktadır [104].



*Proliferasyon*, C/EBP $\delta$  birçok hücre hattında da büyümeyi düzenleyici olarak görev yapmaktadır. M1 myeloid lösemi hücrelerinde büyümenin durdurulmasında önemli bir role sahiptir. 2005 yılında Koeffler ve arkadaşları C/EBP $\delta$  ekspresyonunun, BCR-ABL (bcr-abl, kronik myeloid lösemi sebebiyle onkojenik füzyon proteini) içeren lösemi hücrelerinde myeloid farklılaşma ve büyümenin durması esnasında, arttığını göstermişlerdir [105]. Böylece kronik myeloid lösemi hastalarında C/EBP $\delta$ , önemli bir terapötik potansiyel oluşturmaktadır.

*Kanser*, C/EBP $\delta$  insan 8p11.1-p11.2 kromozomda lokalize olmaktadır [103]. Yapılan kanser çalışmalarında, insan kanserlerinin genellikle 8.kromozomun kısa kolunda (8p)'de mutasyonların sebep olduğunu saptanmıştır [100]. Buradan anlaşılacağı gibi, C/EBP $\delta$  geni insan kanserleri ile doğrudan ilgili bulunmuştur. Bu nedenle, kanser araştırmalarında C/EBP $\delta$  geni yoğun olarak çalışılmaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda C/EBP $\delta$  özellikle; prostat kanseri ve meme kanserinde doğrudan ilişkili olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra meme kanserini baskılayıcı gen olarak aday gösterilmiş ve James deWille tarafından 20040329041 nolu patent alınarak desteklemiştir [106].

*Kötü huylu meme kanseri*, gelişmiş meme epitel hücrelerinde C/EBP $\delta$  ekspresyonu büyük ölçüde azalmaktadır [107]. SSCP (single strand conformation polymorphism) analizi ile 97 insan meme kanseri hastasında genomik DNA'da ve 16 hücre hattı kullanılarak tek eksondan ibaret olan C/EBP $\delta$  geninde var olabilecek mutasyonlar taranmıştır. Ve bu çalışmanın sonucunda, 9/16 insan meme kanser hücre hattında kromozom 8p kaybı kanıtlanmıştır [108]. Tanımlanan mutasyonlar C/EBP $\delta$  geninin yüksek derecede korunmuş bölgesinde var olduğu gösterilmiştir [106]. Bu sayede C/EBP $\delta$  meme epitel hücrelerinde bir tümör baskılayıcı gen olarak görev yüklenmiştir.

*Prostat kanseri*, Amerika’da kansere bağlı erkek ölümlerine, akciğer kanserinden sonra *prostat kanseri* nclk eder. lmlere neden olan bu önemli kanser türünün sebebi tam olarak aydınlatılmamış olsa da, mekanizmasına dair çalışmalar yapılmış ve C/EBPδ ile büyük oranda ilişkili olduğu tespit edilmiştir [109]. Bcl-2’nin androjen bağımlı prostat kanserlerinde, apoptosisi engelleyerek kanseri tetiklediği, androjene bağımsız prostat kanserlerinde ise etkili olmadığı tespit edilmiştir [110]. Yine androjen bağımlı kanserlerde %30-35, androjen bağımsız kanserlerde ise %70 oranında p53 geninin mutasyonunun sebep olduğu bulunmuştur. C/EBPδ geninin androjen tarafından kontrol edildiği tespit edilmiş ve buna bağlı olarak ta androjen bağımlı kanser hücre hatlarında çalışmalar srdrlmştir. Sonuç olarak, C/EBPδ ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tanımlanmıştır. C/EBPδ ekspresyon seviyesinin arttırılması yönünde yapılabilecek çalışmalar prostat kanser tedavilerinde etkili bir yöntem olabileceği düşünülmektedir [111].

*Alzheimer hastalığı patolojisinde*, C/EBP’ler düzenleyici faktör olarak incelenmektedir [112]. Alzheimer hastalarında yapılan çalışmalarda C/EBPδ beyin bölgesinde kronik inflamasyonun uzun süre devam ettirilmesinde anahtar rol oynamaktadır. Buna ilave olarak, C/EBP’lerin *enerji metabolizması* yolaklarında önemli rolleri olduğu bilinmekte, alzheimer hasta beyinlerinde farklı enerji gereksinimleri dolayısıyla, beyin hücrelerinde C/EBPδ ekspresyonu artabilmektedir [113].

*Embriyonik gelişim*, *Xenopus laevis*’de, larval epitel doku apoptotik hücre ölümleri ve yetişkin epitel primordiadan temel alan yetişkin tip epitelyumun yerleşmesi sebebiyle ortadan kaybolur [114]. Bu şekilde meydana gelen *Xenopus laevis* metamorfozu esnasında, C/EBPδ larval epitel dokunun yetişkin epitel dokuya dönüşmesinde düzenleyici faktör olarak tespit edilmiştir [115].

*Sinir sistemi*, C/EBPδ sinir sisteminde çok fazla miktarda ekspre edilmektedir. Hippokampal nöronlarında C/EBPδ ekspresyonu Ca<sup>++</sup> ve cAMP

tarafından arttırılmaktadır [116]. Hippokampal nöronların uzun süreli hafıza sürecinde anahtar rol oynadıkları bilinmektedir ve dolayısıyla C/EBP $\delta$ 'nın uzun süreli hafıza sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir [117].

*Go* ve C/EBP $\delta$ , hücre siklusu G1, S, G2 ve M olmak üzere dört farklı evrede incelenmektedir. Bunlardan S ve M evresinde genetik materyalin kopyasının oluşturulması, diğer hücre bileşenlerin iki katına çıkarılması temeline dayanmaktadır. G1 ve G2 ise başarılı bir S ve M fazının geçmesi için hazırlık safhasıdır. Hücreler proliferasyon sonrasında bir karar vererek hücre siklusundan çıkar ve *Go* evreye girer ve bu sayede hücre bölünmesi durdurulur. Yetişkin hücrelerin çoğu *Go* fazında bulunmaktadır. *Go* fazının düzenlenmesi hakkında az bilgi bulunmaktadır. *Go* fazının aydınlatılması için çalışmalar hızla sürdürülmektedir. *Go* fazına giren hücrelerin biyokimyasal ve biyolojik aktiviteleri artmaktadır [118]. Meme epitel hücrelerinde *Go* fazında C/EBP $\delta$  ekspresyonu hızla artmaktadır [119]. Diğer hücre hatlarında ise *Go* fazında C/EBP $\delta$  ekspresyonunun artması söz konusu değildir.

### **1.3.7.2. C/EBP $\delta$ Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu**

C/EBP $\delta$  ekspresyonu, immün ve enfeksiyon sürecine cevap veren sitokinler ; IL-1(interlökin -1), IL-6 (interlökin -6) TNF- $\alpha$  (tümör necrosis faktör-alfa) oksidatif stres elementleri ve diğer akut faz proteinleri tarafından düzenlenmektedir [120, 121, 122, 123].

İnflamasyon; doku yaralanmaları, travma, enfeksiyon ve doku hasarları gibi süreçlerin şiddetlenmemesi ve onarım mekanizmalarının aktive edilmesi gibi durumları kapsayan fiziksel bir cevaptır. İnflamasyonun erken safhalarında çoğu organda, APR (acute-phase response) olarak bilinen, metabolik ve katabolik değişimler meydana gelir. APR özellikle akciğerden sentezlenen birçok serum akut faz proteinlerinin değişimleri ile karakterize edilmiştir. APR meydana geldikten kısa bir süre sonra birçok akut faz

proteinlerinin serumdaki konsantrasyonu 1000 kat kadar artmıştır [124]. Söz konusu bu durumda C/EBP $\delta$  konsantrasyonunda akut faz proteinleri kadar arttığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Akut faz genlerinin hepatositlerdeki aktivasyonu IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , gibi sitokinleri de içeren birçok inflamasyon sinyalleri tarafından tetiklenir [125]. Bu sitokinler akut faz genlerinin aktivasyonundan doğrudan sorumlu olabildikleri gibi bu sitokinlerin önce C/EBP'lerin ekspresyonunu arttırdığı ve ekspre edilen bu C/EBP'lerinde akut faz proteinlerini dolaylı yoldan aktive ettiği tespit edilmiştir [126].

C/EBP $\delta$  gen promotörünün 3' proksimal bölgesinde, temelde osteogenesis için gerekli olan, Runt domain faktörün (RunX2) bağlanma bölgesini taşımaktadır. C/EBP $\delta$  promotör aktivitesi, Runx2 bağlanma dizisinin mutasyonu veya osteoblast içerisinde Runx2 antisense ekspresyon plazmitinin co-transfeksiyonu ile azalmaktadır [127].

Büyümesi durmuş meme epitel hücrelerinde ve meme bezlerinde STAT-3, C/EBP $\delta$ 'nın promotör bölgesinde var olan tanıma dizisine bağlanarak C/EBP $\delta$ 'nın transkripsiyonuna sebep olmaktadır.[128]

Hepotositlerde akut faza cevap(APR) esnasında, IL-6 bağlı C/EBP $\delta$  transkripsiyonu için STAT-3 bağlanma bölgesine ihtiyaç vardır [129]. APR esnasında STAT-3 bağımlı C/EBP $\delta$  ekspresyon seviyesi uzunca bir periyot devam etmesine rağmen, STAT-3 ün aktivitesi geçici olmaktadır [130]. C/EBP $\delta$ 'nın ekspresyon seviyesinin uzun olması otoaktivasyon sayesinde [131] Fare, sıçan ve koyun C/EBP $\delta$  promotöründe yapılan analizler otoregülasyonun türden türe farklı mekanizmalar ile yürütüldüğü gibi şaşırtıcı sonuçlar elde edilmiştir [131]. Yapılan otoregülasyon çalışmalarında C/EBP $\delta$  promotör bölgesinin yukarı bölgesinin 6kb yukarısında otoregülasyon gözlenmiştir, fakat genin 3' ucunda iki C/EBP tanıma bölgesine ihtiyaç duymaktadır [132]. Buna karşı, fare ve koyun C/EBP $\delta$  geninin 5' ucu otoaktivasyon için yeterlidir [133]. Koyun promotöründe ise varsayılan C/EBP tanıma dizisi içermemektedir [131]. Dolayısıyla insan C/EBP $\delta$  insan C/EBP $\alpha$

genine benzeyebilmekte, bu durum indirekt oto regülasyona sebep olabilmektedir [134].

C/EBP $\delta$  mRNA karaciğer rejenerasyonu sırasında ekspre olmaktadır [135]. C/EBP $\delta$  ve C/EBP $\beta$ , pre-adiposit hücre hattı farklılaşmalarının ilk evresinde cAMP-arttırıcı ajanları ve glukokortikoidlere cevap olarak ekspre edilmektedirler.

Glukokortikoid, akciğer gelişimi ve olgunlaşması esnasında da önemli rol oynamaktadır. Moleküler mekanizmasını aydınlatılmak amacıyla yapılan çalışmalarda glukokortikoidin ekspresyonlarından sorumlu olduğu iki enzim, salgı proteini CCSP (*Clara cell secretory protein*; inflamasyon esnasında akciğerin korunmasında önem teşkil eden ve clara hücrelerinden salınan bir proteindir.) ve detoksifikasyondan sorumlu bulunan P450 geni tarafından kodlanan CYP2B1 enzimi tanımlanmış. Ve tanımlanan bu enzimlerin ekspresyonunda C/EBP $\delta$  geninin ilgisi olduğu saptanmıştır. Glukokortikoid muamelesinden sonra akciğer epitelyumunda C/EBP $\delta$ 'nın ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiş ve C/EBP $\delta$  CCSP'nin ekspresyonunu düzenlediği tespit edilmiştir [136].

Fare C/EBP $\delta$ , promotörünün proksimal ucunda SP1 ve STAT3 bağlanma dizileri bulunmaktadır. Protein lizat analizlerinde aktif (fosforlanmış) STAT3'ün Go fazında meme epitel hücrelerinde önemli derecede arttığı gözlenmiş buna bağlı olarak da C/EBP $\delta$  ekspresyon seviyesi artmıştır [137].

C/EBP'lerin işlev görebilmesinde fosforilasyon önemli rol oynamaktadır. C/EBP $\delta$  transaktivasyon potansiyelinin, hepatositlerde hücrel fosfataz inhibitörleri (sodyum orthovanadate ve okadiac asit gibi) ile muamele edildiğinde arttığı gözlenmiştir [138].

## 1.4. Transfeksiyon

Transfeksiyon kısaca, DNA gibi yabancı bir molekülün ökaryot hücre içerisine aktarılmasıdır. Gen ekspresyonunun kontrolü, gen ekspresyonunu düzenleyici faktörlerin çalışma mekanizmalarının aydınlatılması ve bu amaçla mutasyonel analizler, bu elementlerin biyokimyasal karakterizasyonu gibi, birçok genetik araştırmada kullanılan güçlü bir yöntemdir. Temelde kararlı transfeksiyon ve geçici transfeksiyon olmak üzere iki farklı transfeksiyon tekniği kullanılmaktadır.

### 1.4.1. Geçici Transfeksiyon

DNA ökaryot hücre içerisine aktarıldıktan sonra geçici olarak ekspre olur. Hücre içerisine aktarılan DNA hücre genomuna entegre olmaksızın sitoplazmada serbest olarak kalır. Kendi kendine ekspre olabilen DNA sayesinde, ilgilenilen genin çok sayıda kopyası elde edilir, diğer yandan ekspre edilen proteinin yüksek seviyede eldesi mümkün olur. Transfeksiyon sonrası, DNA hücre içerisine aktarıldıktan 24-96 saat içerisinde analiz edilmelidir. Süper kıvrımlı plazmit DNA kullanılması geçici transfeksiyonun etkisini arttırmaktadır [139].

### 1.4.2. Kararlı Transfeksiyon

Kalıcı transfeksiyon tekniğinde ise transfekte edilen DNA kromozomal DNA'ya entegre olur. Doğrusal plazmit kullanılması kararlı transfeksiyonun etkisinin maksimum olmasını sağlar. Markerlar kullanılarak transfeksiyon sonuçları analiz edilir. Aminoglikozid fosfotransferaz (APH; *neoR* gene) ya da higromisin B fosfotransferaz (HPH) genlerini kodlayan markerler sıklıkla kullanılmaktadır [139].

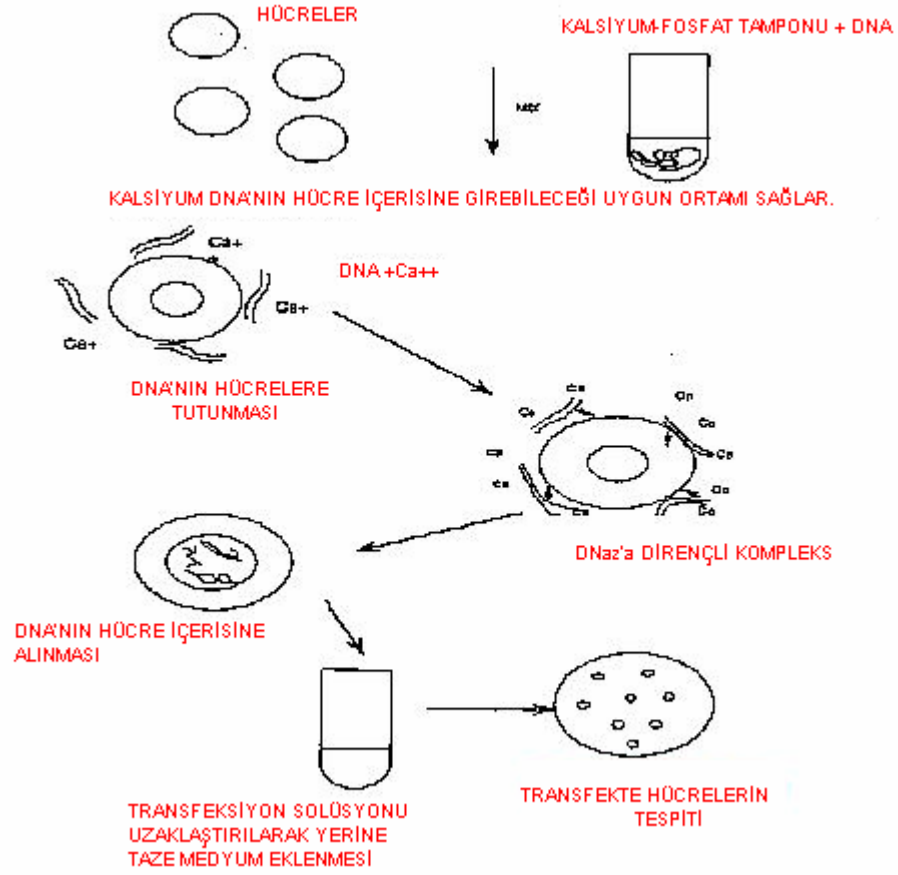
### **1.4.3. Transfeksiyon Metotları**

Birçok transfeksiyon metodu bulunmaktadır. Bunlardan, DEAE-dextran metodu, kalsiyum-fosfat metodu, elektroporasyon metodu, ve lipozom-temelli transfeksiyon metotları en sık kullanılan metotlardır. Her bir metodun kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

#### **1.4.3.1. Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Yöntemi**

Kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi 1973 yılında Graham ve Van der Eb tarafından tanımlanmıştır [140]. Transfeksiyon çalışmalarında en fazla kullanılan yöntem haline gelmiştir. Yöntemin temelinde, DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarına kalsiyum iyonlarının bağlanması ve ardından fosfat içerikli karışımın yavaşça eklenerek kalsiyum iyonlarına iyonik olarak bağlanması yatmaktadır. Bu aşamadan sonra bir kristal kompleks oluşur ve bir süre sonra gözle ayırt edilebilecek presipitasyon oluşur. Presipitasyonun yoğunluğu ile transfeksiyonun etkisi doğru orantılıdır. Presipitasyon sonucu oluşan kristal kompleksler hücre yüzeyine atak yapar ve endositoz sayesinde hücre içerisine absorbe edilir.

Kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi; (i). Geçici ve kararlı transfeksiyon uygulamaları için uygundur. (ii). Bu transfeksiyon yöntemi birbirinden farklı birçok hücre tipi için uygundur. Etkinliği muhakkaktır ki her hücre tipi için birbirinden farklıdır. (iii). Presipitasyonun büyüklüğü ve kalitesi transfeksiyonun etkisi ile doğrudan etkilidir. (vi). Manual olarak uygulanabilen ucuz, kolay ve etkili bir yöntemdir.



**Şekil 1.7.** Kalsiyum-Fosfat Presipitasyon Metodu

### 1.4.3.2. DEAE-Dekstran Yöntemi

Dietilaminoetil dekstran, polikasyon olup DNA'yı elektrostatik olarak bağlamaktadır. Kalsiyum-fosfat presipitasyon metodunda olduğu gibi hücreler tarafından DNA hücre içerisine alınır. Bu kalsiyum fosfat yönteminin değişik bir seklidir [141].

### 1.4.3.3. Elektroporasyon Yöntemi

Elektroporasyon ile gen transferi, kültürdeki hücelere bir elektrik akımı uygulanarak ortamda varolan DNA'nın bu akımla hücre içine geçmesi sağlanır.



Bu elektriksel akım hücre membranında DNA'nın geçişine izin verecek bazı bozukluklar oluşturur. Bu yöntem geçici ekspresyon sağlar [140].

#### **1.4.3.4. Biolistik (Gen Tabancası) Yöntemi**

Parça bombardımanı ya da gen tabancası olarak da adlandırılan balistik DNA enjeksiyonu, ilk olarak bitkilere gen nakli yapmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu ilk uygulamalarından sonra, bazı değişiklikler yapılarak memeli hücrelerine gen nakli amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Genetik materyal DNA kaplı mikroprojektille hücre duvarı içine ateşleyen özel bir gen tabancası yardımı ile olur. Hücreye hiç bir zarar vermeden membrandan geçme özelliği olan genellikle yaklaşık 1-3 $\mu$ M çapındaki altın veya tungsten parçalarıdır. Tedavi edici geni taşıyan plazmit DNA'sı ile kaplanır, sonra da bu parçacıklara hız kazandırılarak, hücre zarını delip, içeri girmeleri sağlanır [141].

#### **1.4.3.5. Liposom Temelli Gen Aktarımı**

Lipozomlar, hücre membranı analogu fosfolipid yapılı çift katlı mikroskobik veziküllerdir. Benzer yapılarından dolayı hücreye girip içeriğini boşaltabilirler. DNA'yı içlerine alma mekanizmalarına göre iki guruba ayrılırlar: Katyonik lipozomlar ve pH-duyarlı lipozomlar. Birinci grup lipozomlar artı yüklü olduklarından, eksi yüklü olan DNA ile dayanıklı bir kompleks oluştururlar. İkinci grup lipozomlarsa negatif yüklü olduklarından DNA ile bir kompleks oluşturmaz, ama içlerinde taşırlar [141].

#### **1.4.3.6. Virüslere Dayalı Gen Aktarımı**

Genetik materyalin konak hücreye viral vektör yardımı ile sokulmasına transdüksiyon denir. En sık kullanılan viral vektörler adenovirus, herpes simpleks virüs ve retrovirustür. Çoğalmaları engellenen virüsler verildiğinden

enfekte olan hücreyi patlatıp diğer hücrelere geçemezler.(*replication-deficient virus*) Günümüzde yapılan araştırmalarda, virüslerin hastalığa yol açan gen parçalarının yerine, hastaları iyileştirme amacıyla rekombinant genler yerleştirilmektedir. Bu şekilde değiştirilmiş virüsler hücreye girmek için kendi yöntemlerini kullanırlar ve genomlarının ekspresyonu sonucu, genin kodladığı protein üretilmeye başlanır. Öte yandan, virüsün kendisini çoğaltmak için ihtiyaç duyduğu genler, tedavi edici genlerle değiştirilmiş olduğundan, virüs çoğalıp hücreyi patlatamaz. Bunun yerine, hücrede virüsün taşıdığı hastalığı düzeltici genin ekspresyonu olur, genin kodladığı protein (yani ilaç) üretilir ve genetik bozukluk nedeniyle üretilmeyen proteinin yerini alır.

Ancak her vektörün kendine özgü dezavantajları vardır: Bölünmeyen hücreleri enfekte edememek (retrovirüs), olumsuz immünolojik etkiler (adenovirüs), sitotoksik etkiler (herpesvirüs) ve kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesi (adeno-ilişkili virüs). İdeal bir vektörde aranan özellikler yüksek titraj, kolay tasarlanabilme, integre olabilme yeteneği ve gen transkripsiyonunun kontrol edilebiliyor olmasının yanında, immünolojik etkilerin olmamasıdır [141].

### **1.5. Sitokinler**

Sitokinler hücreSEL büyüme, inflamasyon, immünite, doku onarımı, ve hemotopoez gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynayan, düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir [142,143]. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterebilir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücreSEL sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücreSEL reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre

üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir [144].

Sitokinler konusunda son 15 yılda büyük gelişmeler sağlanmıştır. Sitokinlerin etkileri ve işlevleri hakkındaki bilgiler sürekli yenilenerek, her geçen gün farklı bir boyut kazanmaktadır [145].

Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki fonksiyonel benzerliklere, etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır: (i). Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Platelet orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Neurolökin; Amfiregulin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b. (ii). Lenfokinler (interlökin-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9;10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15) (iii). Koloni stimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF) (iv). Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ ) (v). Tümör nekroz faktörleri (TNF- $\alpha$ ; TNF- $\beta$ ) (vi). Interferonlar (IFN- $\alpha$ ; IFN- $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ).

**Çizelge 1.3.** İnsanda var olan bazı sitokinler moleküler büyüklükleri, salındıkları hücreler ve görevleri

Sitokin	Mol.Ağ.(kD)	Kaynağı	Aktivitesi
<b><u>İnterlökinler</u></b>			
IL-1 $\alpha$ , $\beta$	17,5	Makrofaj, T/Blenfositleri, APC	T/B lenfosit farklılaşması, immüniteyi arttırma

IL-2	15,5	TH1 ve büyük granüllü lenfositler	T/B ve NK lenfositlerinin gelişme faktörü
IL-3	14-28	Makrofajlar, T lenfositler	Hemopoetik gelişme faktörü
IL-4	20	TH2 lenfositler	T/B lenfositlerinin gelişme faktörü
IL-5	18	TH2 lenfositler	B Lenfosit ve eozinofil stimülasyonu
IL-6	22-3	TH2 lenfositler	İnflamasyon
IL-7	25	Stromal hücre	Lenfosit gelişme faktörü
IL-8	8,8	Makrofajlar, T lenfositler	Nötrofil ve T lenfosit kemotaksisi
IL-9		T lenfositler	T lenfosit proliferasyonu
IL-10		TH2 lenfositler	Sitokin sentez inhibitörü
IL-11		fibroblast	Hemopoetik etkili
IL-12		makrofajlar	Hemopoetik etkili
IL-13		AKTİF T lenfositleri	Hemopoetik etkili
G-CSF	18-22	Monosit, fibroblast	Miyeloid gelişme faktörü
M-CSF	70-90	Monosit, fibroblast	makrofaj gelişme faktörü
GM-CSF	14-35	TH1, TH2, Lenfositler, monositler	Monomiyelotik gelişme faktörü
IFN- $\alpha$	18-20	lökositler	Antiviral etki
IFN- $\beta$	25	T lenfositler, makrofajlar	Antiviral etki

IFN- $\gamma$	20-25	TH1 Lenfositleri,NK	immünomodülatör
TNF- $\alpha$	17	TH1 Lenfositleri	İnflamasyon, tümörisidal
TNF- $\beta$	18	TH1 Lenfositleri	tümörisidal
TGF- $\beta$	25	Makrofajlar,T lenfositler	İmmüno-süpresyon

Sitokinler hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolü, hematopoez ve bağışıklık sisteminin regülasyonu, yaraların iyileşmesi, kemik formasyonu ve hücre metabolizmasının değiştirilmesi gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Onların en önemli etkilerinden biri hücre bölünmesi farklılaşması üzerinedir. Normal hücreler belli faktörler tarafından gönderilen spesifik sinyaller sonucu bölünür. Bu faktörler büyüme faktörleri ve sitokinlerdir. Büyüme faktörleri hücre bölünmesi üzerinde pozitif etki gösterirken, bazı sitokinlerin hücre bölünmesini engelleyici etkileri bilinmektedir. Belli bir hücrenin yüzeyinde mevcut olan reseptörler bu hücrenin hangi faktörlere cevap vereceğini belirlerler. Son yıllarda bu faktörlerin hücre bölünmesi üzerinde pozitif ve negatif etki mekanizmaları yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

Dolayısıyla sitokinlerin hücre bölünmesi üzerindeki etki mekanizmalarının bilinmesi, kontrolsüz hücre bölünmesi olarak bilinen kanserin tedavisinde geliştirilecek yöntemlere ışık tutmakta ve kanserin immüno-terapisinde sitokinlerin kullanımını giderek arttırmaktadır.

## 1.6. Amaç

C/EBP $\delta$  geni meme kanseri ve prostat kanserinde birinci derecede sorumlu bulunmuş, öyle ki meme kanserinde tümör baskılayıcı gene aday olarak gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, C/EBP $\delta$  doku hasarları, enfeksiyon, inflamasyon ve akut faz cevapta, hücre proliferasyonunda ve apoptosiste önemli rol oynamaktadır. Bunlara ilaveten C/EBP $\delta$  adipoz, hepatosit, kan hücrelerinin ve osteoblast hücrelerin farklılaşmasında ve birçok çeşitli dokuda, dokulara spesifik genlerin regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Fakat böylesi yaşamsal görevleri üstlenmiş bulunan C/EBP $\delta$ 'nın transkripsiyonel regülasyonu konusundaki bilgi oldukça sınırlıdır. Bu çalışma, C/EBP $\delta$ 'nın transkripsiyonel regülasyonunu aydınlatarak, literatürdeki boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır.

C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel regülasyonun aydınlatılması amacıyla, 1739b $\epsilon$  büyüklüğündeki insan C/EBP $\delta$  geninin promotörünün pLUC vektörüne klonlanılmış olarak Dr.Dipak Ramji (Cardiff, İngiltere)'den elde edilmiştir. Dizi analizleri ile promotörünün tüm detaylı biyoinformatik analizi elde edilmiştir. Promotörün transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi amacıyla geçici transfeksiyon çalışmaları ve mRNA'daki artışın belirlenebilmesi içinde RT-PCR çalışmaları yapılacaktır.

Bu çerçevede yukarıda hedeflenen amaca göre, planlanan çalışmanın basamakları aşağıdaki şekilde özetlenmektedir;

(i). Elde edilen, insan C/EBP $\delta$  promotörünü taşıyan plazmit restriksiyon endonükleazları sayesinde, plazmit haritasında belirlenmiş noktalardan kesilerek C/EBP $\delta$  promotörünün daha küçük dizileri elde edilecek, böylece transkripsiyonel regülasyondan sorumlu dizilerin tespiti mümkün olacaktır.

(ii). Geçici transfeksiyon çalışmalarımızda kullanılmak üzere üç farklı büyüklükte C/EBP $\delta$  promotörünü taşıyan plazmit vektörünün kullanılması hedeflenmektedir. Bunlar; 1739bp büyüklüğündeki bütün C/EBP $\delta$  promotörünü taşıyan pLUC vektörü (Dr. Dipak Ramji'den temin edilmiştir), 181bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotörü taşıyan pGL2 vektörü (Doç.Dr. Feray KÖÇKAR tarafından hazırlanmıştır ), ayrıca bu DNA dizilerinin ortasında 760bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinde ayrıca hazırlanması planlanmaktadır.

(iii). Farklı büyüklükteki C/EBP $\delta$  promotör plasmidleri farklı transfeksiyon stratejileri kullanılarak, Hep3B hücrelerine transfekte edilecektir. Transfeksiyon verimliliğinin artması için yüksek kalitede saflığa sahip plazmit DNA'lar maksı prep yöntemi ile hazırlanacaktır. Promotörün bazal aktivitesi lusiferaz aktivitesi ve beta- galaktosidaz aktivitesinin ölçümü ile tespit edilecektir.

(iv). Geçici transfeksiyon çalışmasının ardından sitokinlerin C/EBP $\delta$  promotörünün regülasyonuna olan etkisinin belirlenmesi amacıyla IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$  ve IFN- $\gamma$  sitokinleri, 1000U, 500U, 100U ve 10U olmak üzere farklı konsantrasyonlarda uygulanacak ve sitokin uygulanmasından 6saat, 24saat, 48saat ve 72saat inkübasyon süreleri sonrasında C/EBP $\delta$  promotör aktivitesine olan etkileri saptanacaktır.

(v). Sitokinlerin etkileri lusiferaz aktivite analizleri ile belirlenmesinin ardından C/EBP $\delta$  mRNA seviyesindeki ekspresyon analizi RT-PCR çalışmaları ile belirlenecektir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Moleküler biyoloji materyalleri, transfeksiyon ve RT-PCR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler Promega, New England Biolabs ve Fermentas firmalarından temin edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DMEM ve FCS, HyClone ve Biological Industries firmalarından temin edilmiştir.

#### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

**Çizelge 2.1.** Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

<b>Kullanılan Gereç</b>	<b>Modeli</b>
-80°C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
CO <sub>2</sub> inkübatörü	Nuair
Laminar Air Flow	TelstarBIOII, İspanya
Luminometre	Thermo, Almanya
İnverted Mikroskop	Nikon
Horizantal Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya



Thermocyclers	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü Çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
Hassas Terazı	Sartorius
UV visible Spektrofotometreler	Heios $\alpha$ (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye

### 2.1.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

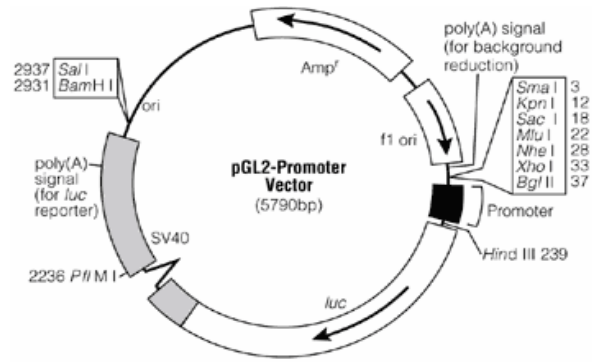
Çalışmalarımızda, Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK (Bilkent, Ankara)'den temin edilen karaciğer hücre hattı (Hep3B) kullanıldı.

### 2.1.4. Bakteriyel Soylar

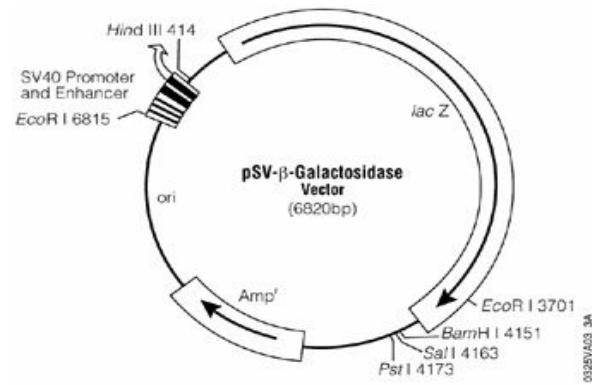
Klonlama ve stok amaçlı DH5 $\alpha$  (SupE44 $\Delta$  lacU169 ( $\Phi$ 80 LacZ  $\Delta$ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1) *E. coli* soyu kullanıldı.

### 2.1.5. Çalışmada Kullanılan Plazmitler

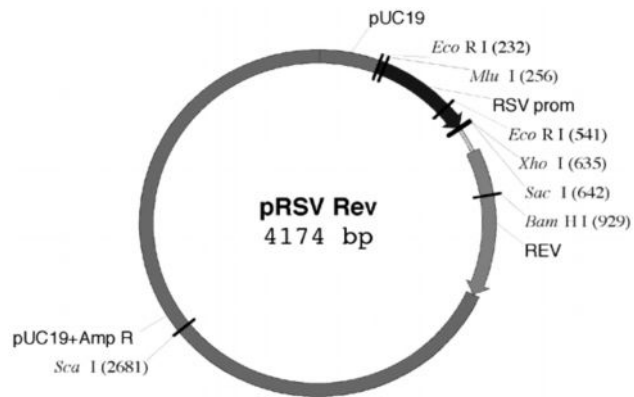
Çalışmada üç farklı plazmit kullanıldı. Çalışmada kullandığımız pGL2 plazmit vektörü, beta galaktosidaz plazmit vektörü ve pozitif kontrol amaçlı kullandığımız RSV plazmit vektörü Promega firmasından temin edildi. Plazmit haritaları sırasıyla, Şekil 2.1, Şekil 2.2 ve Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. PGL2 plazmit vektör haritası [146]



Şekil 2.2. RSV plazmit vektör haritası [146]



Şekil 2.3. Beta-galaktosidaz plazmit vektör haritası [146]

## **2.2. Metot**

### **2.2.1 Cam-Plastik Malzemenin ve Doku Kültürü Odasının Sterilizasyonu**

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, eppendorflar, santrifüj tüpleri, solüsyonlar, kültür ortamları ve cam malzeme 121°C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku kültürü odası her hafta periyodik olarak %1lik virkon çözeltisi ve ardından %70 lik alkol çözeltisi ile temizlendi. Doku kültürü odası kullanılmadığı zamanlarda, UV lamba kullanılarak oda havasının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce Laminar Air Flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

### **2.2.2. Mikrobiyolojik Metotlar**

#### **2.2.2.1. *E.coli* için Bakteriyel Kültür Ortamları**

*E.coli* için gerekli kültür ortamı olarak LB ve LB-agar kullanılmıştır. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlanarak ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanarak otoklav edildi.

#### **2.2.2.2. Antibiyotik Hazırlanması**

Kültürlerde kullanılan Ampicillin stokları 100mg/mL olacak tarzda steril ddH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. 0.22 µm filtreler kullanılarak steril edildi.

### **2.2.2.3. Ön Kültür Hazırlanması**

LB-agar'a tek koloni olacak şekilde ekilen bakteri kolonilerinden tek bir koloni önce, son konsantrasyonu 10µg/mL olan ampisilin içerikli LB ortamına aşılandı. 37°C' de çalkalayıcı inkübatörde 16-18 saat inkübe edildi.

### **2.2.2.4. Bakteri Stoklarının Korunması**

İlgili bakteri soyları ve plazmit soyları ön kültürle üretildikten sonra %30'luk steril gliserolle son konsantrasyonu % 15 olacak şekilde sulandırıldı. Direkt olarak -80°C dondurucu içerisine alınarak muhafaza edildi.

### **2.2.2.5. Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması**

*E.coli*'nin DH5α soyunu kompetent hale getirmek için tek koloni olarak ekildiği LB-Agar üzerinden tek bir koloni alındı, LB ortamına ekilerek 37°C' de bir gece boyunca üretildi. Bundan alınan 5mL örnek, içinde 100mL taze LB olan 500mL'lik erlene koyuldu ve 37°C' de yaklaşık 2-3 saat OD<sub>600</sub>=0,4'e ulaşıncaya kadar büyütüldü. Bu aşamada kültür, 5 dakika buzda bekletildi. Kültür, falkonlara alınarak +4°C' de 5 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve 25mL soğuk 0,1M CaCl<sub>2</sub> konuldu ve yavaşça karıştırıldı. 2 dakika buzda bekletildi. +4°C' de 10dk. 3000 rpm' de santrifüjlendi. 10mL soğuk 0,1M CaCl<sub>2</sub>'de 1-4 saat bekletildi. 10mL steril %40 gliserol eklenerek hafifçe karıştırıldı. Önceden buz üzerinde bekletilmiş 1.5mL'lik ependorflara bölünerek -80°C' de muhafaza edildi [3].

### 2.2.2.6. Transformasyon

-80°C’ de saklanan kompetent hücreler alındı ve 30-60 dakika süreyle buzda bekletildi. Ependorfa 200µL kompetent hücreden alındı ve üzerine 50-100ng plazmit DNA koyuldu. Dikkatlice karıştırılarak 40 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için 42°C’ de 90 saniye su banyosu içerisinde tutuldu ve hemen buza alınarak burada da 2 dakika bekletildi. Önceden 37°C ısıtılmış 800µL LB, DNA-kompetant hücre karışımı üzerine eklendi. 37°C’ de çalkalayıcı etüvde 1-1,5 saat inkübe edildi. Bu kültürün 100 µL’si alınarak taze hazırlanmış, 100 µg/mL ampisilin içeren LB-agar petrisine damlatıldı ve öze ile tek koloni tarzında ekim yapıldı. Petrideki kolonilerin durumuna bakarak transformasyon etkinliği saptandı [3].

### 2.2.2.7. Düşük Ölçekli Plazmit DNA izolasyonu (Miniprep)

Miniprep DNA izolasyonu için *Miniprep DNA isolation kit (Qiagen)* kullanıldı. Kit protokolüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/mL ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 8000 rpm’ de 3dk santrifüj yapıldı ve bakteri pelletine protokole uygun şekilde yapılan işlemlerden sonra DNA elde edildi.

### 2.2.2.8. Yüksek Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu (Maksiprep)

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için *endo-free maxi prep kit (Qiagen)* kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 2-5 mL LB besiyeri içerisine tek koloni ekimi yapılır. 37°C de 8 saat 250 rpm’de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Süre sonunda başlangıç kültürü 1/500-1/1000 arasında seçici antibiyotik içeren LB medyumda seyreltildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanıldı.

37°C de 12-16 saat 250 rpm’de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. Bakteriler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra 4°C’ de 6000 rpm’ de 15dk santrifüj yapılarak protokolün diğer basamakları uygun şekilde gerçekleştirildi. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi. Son aşamada elde edilen DNA spektrofotometrede ölçülerek 2.2.4.2.’de anlatıldığı gibi miktar ve kalite tayini yapıldı. Transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere, izole edilen DNA -20°C’de saklandı.

### **2.2.3. Hücre Kültürü Metotları**

#### **2.2.3.1. Hücre Kültür Ortamı**

Çalışmalarımızda DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) hücre kültür medyumunu olarak kullanıldı. DMEM içerisine; penisilin son konsantrasyonu 100ünite/mL, streptomisin son konsantrasyonu 10µg/mL, L-glutamine son konsantrasyonu 0,2mM ve FCS (Fetal Calf Serum) son konsantrasyon %10 olacak şekilde tüm bileşenler 0,22µm steril filtreden geçirildikten sonra eklendi.

#### **2.2.3.2. FCS Hazırlanması**

FCS (Fetal Calf Serum) ilk kullanım öncesi 56 °C de 1 saat ısı ile inaktive edildi ve 0,22 µm steril filtreden geçirildikten sonra, medyum içerisine %10 konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. Stok FCS -20°C de saklandı.

#### **2.2.3.3. PBS Hazırlanması**

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline) 100mL ddH<sub>2</sub>O/tablet olacak şekilde hazırlandı ve otoklavlandıktan sonra kullanıldı.

#### **2.2.3.4. Hücrelerin Sıvı Azotta Saklanması**

Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kapladıklarında içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez steril PBS ile yıkandı ve 25cm<sup>2</sup> flasklar için 1ml, 75cm<sup>2</sup> flasklar için 2ml tripsin-EDTA ile 1-3dk tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerlerine tripsinin parçalayıcı etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla medyum eklendi ve 1000rpm de 5dk santrifüj yapılarak hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 DMSO içeren FCS ile hızlı bir şekilde çözüldü ve -196<sup>0</sup>C sıvı azota dayanıklı cryovial tüplerine koyularak etiketlendi. Öncelikle -80<sup>0</sup>C derin dondurucuya konuldu, dereceli olarak sıcaklığın düşmesi sağlandıktan sonra sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklandı.

#### **2.2.3.5. Hücre Soyunun Başlatılması**

Uzun süre sıvı azot içerisinde saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için sıvı azot tankından çıkarılan hücreler 37<sup>0</sup>C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler %10 FCS içeren medyuma alınarak %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe büyümeye bırakıldı.

#### **2.2.3.6. Hücrelerin Büyütülmesi**

Hücreler 75cm<sup>2</sup> flasklarda %10 FCS içerikli 15mL medyum içerisinde CO<sub>2</sub> (%5) inkübatöründe büyütüldü. Haftada 2 kez rutin pasaj yapıldı.

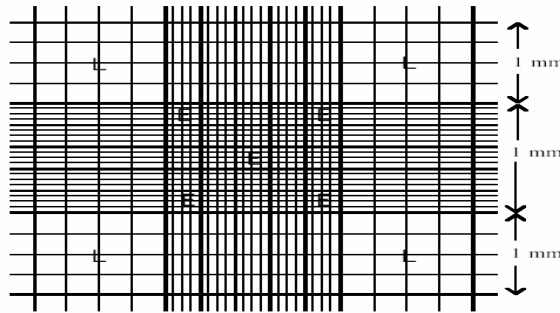
### 2.2.3.7. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler buldukları yüzeyden %80-90 oranında kapladıklarında içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez steril PBS ile yıkandı ve 25cm<sup>2</sup> flasklar için 1mL, 75cm<sup>2</sup> flasklar için 2mL tripsin-EDTA ile 1-3dk tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerlerine tripsinin parçalayıcı etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla medyum eklendi ve 1000rpm de 5dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet %10 oranında FCS içeren 5-10mL DMEM içerisinde çözülerek 10-15 mL DMEM içeren flasklara ekim yapıldı. Hücre içerikli flasklar etiketlenerek 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre koyularak büyümeye bırakıldı.

### 2.2.3.8. Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Deneylerimizde gerekli olan toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için; üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm<sup>2</sup> alanı, 0,1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı (Şekil 2.4) kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek amacıyla 10µL hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue(1:1dilasyon oranında ) ile 3-5dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Trypan blue sayesinde ölü hücreler mavi boyanırken, canlı hücreler boyanmazlar. Ve daha sonra mikroskop yardımıyla canlı hücrelerin sayımları yapıldı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Toplam canlı hücre sayısı /mL = hemositometre sayım sonucu x seyreltme katsayısı x 10<sup>4</sup>



Şekil 2.4. Hemositometre lamının şematik görünümü



## 2.2.4. DNA ile İlgili Teknikler

### 2.2.4.1. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile DNA Kesimi

Restriksiyon endonükleazları sayesinde plazmit haritasındaki kesim noktaları dikkate alınarak plazmit DNA istenilen büyüklükte ikili enzim sistemi kullanılarak kesildi. Kesim stratejisi olarak; 2.2.2.8’de anlatıldığı gibi maksı prep işlemi ile elde edilen, kesilmesi planlanan plazmit DNA örneğinden 5µL, kesiminde uygun olarak tespit edilen restriksiyon enziminden 1µL(20000ü/mL) ve son konsantrasyon 1X olacak şekilde tampon ve dH<sub>2</sub>O eklenerek 37<sup>0</sup>C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sonuçların değerlendirilmesi amacıyla, 2.2.4.2.2’da anlatıldığı gibi %0,8’lik agaroz jelle yüklenerek UV görüntüleme sisteminde sonuçlar değerlendirildi.

### 2.2.4.2. Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen DNA örnekleri jel elektroforezinde görüntüledi ve istenilen büyüklükteki bantların yeri tespit edilerek UV transilluminator sayesinde agaroz jelden kesildi. *DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen)* kullanılarak istenilen DNA parçası jelden kazanıldı. Son olarak kazanılan DNA’nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. Jelden kazanılan DNA’nın miktar ve saflığının kontrolü için 260nm ve 280nm dalga boyundaki absorbansları alındı.

### 2.2.4.3. Ligasyon

Restriksiyon endonükleazları ile kesim ve jelden DNA pürifikasyonu sonrasında, klonlanacak olan DNA parçasından 15µL ve aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş vektörden 2µL, toplam hacim 20µL olacak şekilde 1XT4 DNA ligaz tamponu ve 1µL T4 DNA Ligaz (1000U/mL) enzimi, 24 saat +4<sup>0</sup>C’de inkübe edildi. Ligasyon sonrasında hazırlanan plazmit. 2.2.2.5’de

anlatıldığı gibi kompetent edilmiş DH5 $\alpha$  kompetent hücreleri içerisine 2.2.2.6’da belirtildiği gibi transforme edildi. Ertesi gün elde edilen beyaz koloniler değerlendirilerek rekombinant plamitlerin analizi yapıldı. Restriksiyon kesimi ile rekombinant olup olmadıkları doğrulandı.

## 2.2.4.2. DNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi

### 2.2.4.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

Konsantrasyonunun belirlenmesi istenen plazmit DNA, 1:200 oranında dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı ve kuvartz küvetler kullanılarak 260nm’de DNA’nın UV absorpsiyonu okundu. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplandı. Aynı zamanda elde edilen DNA nın saflığında OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> oranı elde edilerek öğrenildi [147]

$$50\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \text{mL}/\mu\text{g}$$

### 2.2.4.2.2. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Çizelge 2.2 (0,5)xTBE (Tris-Borate) Tampon

Stok solüsyon	Son Konsantrasyon
1M Tris-borate	0,045M
0.5M EDTA (pH 8)	0,001M

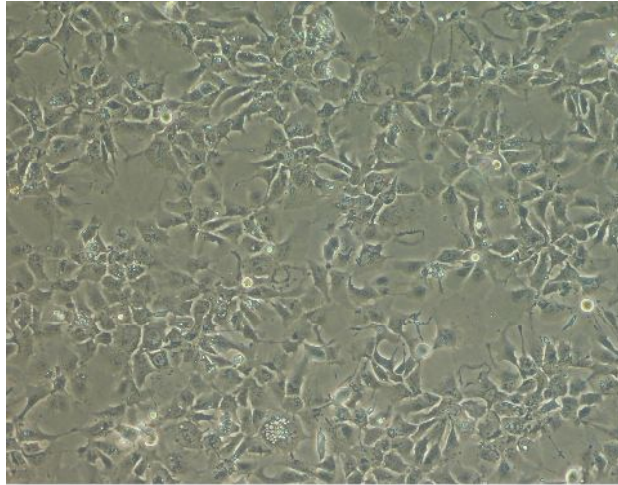
Çizelge 2.3. 6x DNA Yükleme Tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
%99 Brophenol Blue	0.25% (w/v) bromphenol blue,
%99 Ficol	15% (w/v)

Görüntülenmesi gereken DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Agaroz jel, DNA'nın büyüklüğüne göre farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. 0,5xTBE'de (çizelge 2.2) hazırlanan %0.7-2 olarak kaynatılarak hazırlanan agaroz jelleri, 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra, son konsantrasyonu 0,5µg/mL olacak tarzda etidyum bromid eklendi. Agaroz jel aparatlarına döküldü ve polimerize oluncaya kadar beklendi. DNA örnekleri yükleme tamponuyla (çizelge 2.5) karıştırılarak agaroz jele yüklendi. Agaroz jelleri 80 Voltta yürütüldü. Tampon jelin ¾'ünü geçene kadar beklendi. Elektroforez sonucu UV illuminator kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen jel dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi.

### 2.2.5. Geçici Transfeksiyon Deneyleri

Doku kültüründe yürüttüğümüz tüm deneyler steril şartlarda laminar air flow altında yapıldı. Geçici transfeksiyon çalışmalarında insan karaciğer hücre hattı olan Hep3B hücreleri kullanıldı (Şekil2.5). Transfeksiyon deneylerinin optimizasyon aşmasında üç farklı yöntem kullanıldı.



**Şekil 2.5.** Hep3B hücrelerinin faz kontrast mikroskobu ile görüntülenmesi

### 2.2.5.1. Kalsiyum Fosfat Yönetmi ile Geçici Transfeksiyon

**Çizelge 2.4.** 2X HBS transfeksiyon tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
HEPES	10g/L
NaCl	16g/L
pH = 7,05-7,12'ye ayarlandı. Hazırlanan çözelti önce otaklavlandı ve sonra 0.22 µm filtreler kullanılarak steril edildi. 1,5mL'lik eppendorflara bölünerek -20° C'de saklandı.	

**Çizelge 2.5.** 100XPO<sub>4</sub> transfeksiyon tamponu

Kimyasal Madde	Konsantrasyon
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	70mM
Hazırlanan çözelti önce otaklavlandı ve sonra 0.22 µm filtreler kullanılarak steril edildi. Hazırlanan çözelti 1,5mL'lik eppendorflara bölünerek -20° C'de saklandı.	

**Çizelge 2.6.** Kalsiyum fosfat presipitasyon transfeksiyon yöntemi tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
CaCl <sub>2</sub>	14,7g
ddH <sub>2</sub> O	50mL'ye tamamlandı.
Hazırlanan çözelti önce otaklavlandı ve sonra 0.22 µm filtreler kullanılarak steril edildi. 1,5mL lik eppendorflara bölünerek +4° C'de saklandı.	

Transfeksiyon çalışmaları altı kuyucuklu kültür kaplarında sürdürüldü. Öncelikle deneyde kullanılması planlanan hücreler, buldukları yüzeyi %80-

90 oranında kapladıklarında içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2.2.3.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan steril PBS ile iki kez yıkandı ve tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerlerine serum içerikli medyum eklendi ve 1000'rpm de 5dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 oranında FCS içeren yaklaşık 5ml medyumda çözüldü. Her bir kuyuya, 2.2.3.8.'de anlatıldığı gibi sayım yapılarak 250.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ve her kuyu son hacim 2mL olacak şekilde %10 FCS içerikli medyum ile tamamlandı. Ekimden 24 saat sonra transfeksiyon gerçekleştirildi. Tek bir kuyu için; bir falkon içerisinde 500µL 2XHBS ( Çizelge 2.4.) 15µL 100XPO<sub>4</sub> (Çizelge 2.5.) hazırlandı. Bir ependorfta 60µL CaCl<sub>2</sub> ve 2µg DNA son hacim 440µL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Daha sonra DNA içerikli çözelti falkonda hazırlanmış olduğumuz diğer çözelti içerisine damlatılmak koşulu ile aktarıldı ve yaklaşık 30dk presipitasyon gözlenen kadar transfeksiyon tamponu inkübe edildi. Daha sonra altı kuyulu kültür kabının bir kuyusuna medyum, üzerine hazırladığımız 1000µL çözelti damlatılarak aktarıldı. Transfeksiyondan 16saat sonra transfeksiyon solüsyonu içerikli medyum hücrelerden uzaklaştırıldı. PBS ile iki kez yıkandı. Ve ardından 2000mL/kuyu olacak şekilde %10 FCS içerikli yeni hazırlanmış medyum ile tamamlandı. Bir gece inkübasyona bırakıldı. İstenilen inkübasyon süresi sonrasında lusiferaz ve beta galaktosidaz aktivite tayinleri ile transfeksiyon etkinliği saptandı.

### **2.2.5.2. Fugene Hd Kit ile Geçici Transfeksiyon**

Fugene ticari olarak temin edilen, DNA ile kompleks oluşturabilme yeteneğine sahip bir çözüldür. Fugene hd kit ile geçici transfeksiyon çalışmaları altı kuyucuklu kültür kaplarında sürdürüldü. Öncelikle deneyde kullanılması planlanan hücreler, buldukları yüzeyi %80-90 oranında kapladıklarında içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2.2.3.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan steril PBS ile iki kez yıkandı ve tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerlerine serum içerikli medyum eklendi ve 1000 rpm de 5dk santrifüj ile

hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 oranında FCS içeren yaklaşık 5ml medyumda çözüldü. Her bir kuyuya, 2.2.3.8.'de anlatıldığı gibi sayım yapılarak 300.000 hücre ekimi yapıldı. Her kuyu son hacim 2mL olacak şekilde %10 FCS içerikli medyum ile tamamlandı. Ekimden 24saat sonra hücrelerin içinde bulunduğu medyum uzaklaştırıldı. PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, serum ve antibiyotik içermeyen taze medyum hücrelerin üzerine eklendi. Ve transfekte edilecek olan 1µg DNA için 3µL fugene olacak şekilde transfeksiyon tamponu hazırlandı. Medyum üzerine damlatılmak koşulu ile transfeksiyon solüsyonu aktarıldı. İstenilen inkübasyon süresi sonrasında lusiferaz ve beta galaktosidaz aktivite tayinleri ile transfeksiyon etkinliği saptandı.

### 2.2.5.3. Modifiye Kalsiyum Fosfat Yöntemi ile Geçici Transfeksiyon

**Çizelge 2.7.** Kalsiyum Fosfat Presipitasyon Transfeksiyon Yöntemi Tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
HEPES	1.3g
NaCl	1.6g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04g
ddH <sub>2</sub> O	100mL'ye tamamlanır.
pH = 7,05-7,12'ye ayarlandı. Hazırlanan çözelti önce otaklavlandı ve sonra 0.22 µm filitreler kullanılarak steril edildi. 1,5mL lik eppendorflara bölünerek -20° C'de saklandı.	

Modifiye kalsiyum fosfat yöntemi ile geçici transfeksiyon çalışmaları 12 kuyucuklu kültür kaplarında sürdürüldü. Hücreler buldukları yüzeyi %80-90 oranında kapladıklarında içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 2.2.3.3.de anlatıldığı gibi hazırlanan steril PBS ile iki kez yıkandı ve tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerlerine tripsinin parçalayıcı etkisinin ortadan kaldırılması amacıyla serum

İçerikli medyum eklendi ve 1000rpm'de 5dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 oranında FCS içeren yaklaşık 5ml medyumda çözüldü. Süspansiyondaki canlı hücre sayısını belirlemek amacıyla trypan blue exclusion 2.2.3.8.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Ve canlı hücre sayısı belirlendi. Canlı hücre sayısı belirlendikten sonra 12 kuyucuklu kültür kabı için hücre sayısı 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Daha sonra her kuyu için son hacim 1000mL olacak şekilde %10 FCS içerikli medyum ile tamamlandı. Hücreler bir gece inkübasyona bırakıldı.

Hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekildikten 24saat sonra transfeksiyon deneyi yapıldı. 1µg DNA, 5µg CaCl<sub>2</sub> (Çizelge 2.6) ve son hacim 45mL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak hazırlanan birinci solüsyon, 45mL (çizelge 2.7) ikinci solüsyon üzerine yavaşça damlatıldı. Hazırlanan çözeltiler yaklaşık 30dk, presipitasyon gözlenene kadar inkübe edildi ve daha sonra hücre–medyum içerikli 12 kuyulu kültür kabının bir kuyusuna, toplam hacim 90mL olacak şekilde, damlatılarak aktarıldı. Transfeksiyondan 6s sonra transfeksiyon solüsyonu içerikli medyum hücrelerden uzaklaştırıldı. PBS ile iki kez yıkandı. Ve ardından 1000mL/kuyu olacak şekilde %10 FCS içerikli yeni hazırlanmış medyum ile tamamlandı. Bir gece inkübasyona bırakıldı [139]. Eğer sitokin uygulanacaksa sitokinler 1000U, 500U, 100U, 10U olacak şekilde ve her bir ünite için üç tekrar olmak koşulu ile direkt medyum üzerine eklendi. Sitokin muamelesinin 6s, 24s, 48s ve 72s'lik inkübasyon süreleri sonrasında hücreler ekstrakte edildi ve elde edilen ekstraktlar (lizatlar) kullanılarak, lusiferaz ve beta galaktosidaz aktivite tayinleri ile transfeksiyon etkinliği saptandı.

*Üç farklı transfeksiyon çalışmasında*, mutlaka negatif kontrol olarak kullanılacak, transfeksiyon yapılmayan bir kuyu çalışıldı. Bunun yanı sıra mutlaka bir kuyu, pozitif kontrol amacıyla, maksimum transfeksiyon özelliği olan RSV plazmiti çalışmada kullanılan yöntem ile transfekte edildi. Negatif ve pozitif kontrol çalışmaları sayesinde transfeksiyon etkinlikleri mukayese edilebildi. Tüm çalışmalarımızda kullandığımız diğer ortak parametre ise transfekte edilen insan C/EBPδ promotör plazmiti ile beta galaktosidaz

plazmitinin birlikte transfekte edilmesiydi, böylece sonuçlar göreceli olarak değerlendirilebildi.

#### **2.2.5.4. Hücre Ekstraktlarının Hazırlanması**

Sitokin muamelesinin 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süresinin dolmasıyla birlikte kuyucuklardan medyum uzaklaştırıldı. Her kuyu iki kez PBS ile yıkandı ve 150 µL 1XRLB (Reporter Lysis Buffer) ilave edilerek 5dk horizontal çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra ısı şoku için yarım saat -80 °C dondurucuda inkübe edildi. Süre sonunda 37°C su banyosunda hızlıca çözümleri sağlandı. Daha sonra hücre kazıyıcısı ile her bir kuyu kazınarak ependorflara alındı. 15 saniye vorteks yapıldı, ardından 30 saniye 13000 rpm'de santrifüj yapılarak süpernatant ayrı bir ependorfa alındı ve hemen aktiviteleri okundu. Daha sonra kullanılmak amacıyla kalan lizatlar -80 °C dondurucuda saklandı.

#### **2.2.5.5. Geçici Transfeksiyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Geçici transfeksiyon çalışmaları iki farklı sistemde analiz edildi. Elde edilen iki farklı sonuç normalize edilerek gerçek transfeksiyon aktivitesi belirlendi.

##### **2.2.5.5.1. Lusiferaz Aktivite Tayini**

2.2.5.4.'de belirtildiği gibi hazırlanan lizattan 20µL lumünometre cihazına özel 96 kuyucuklu kabın her bir kuyusuna eklendi. Oda sıcaklığına getirilen lusiferin substratı cihaza yerleştirerek varolan programda (her kuyuya 100µL substrat enjeksiyonu yapıldı) lümunometrik ölçümün yapılması sağlandı.



### 2.2.5.5.2. Beta-Galaktosidaz Aktivite Tayini

**Çizelge 2.8.** 2X Assay Buffer

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	120mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80mM
B-Merkaptoetanol	100mM
ONPG	1,33mg/μL
MgCl <sub>2</sub>	2mM
Hazırlanan solüsyon -20 <sup>o</sup> C’de saklandı.	

2.2.5.4.’de belirtildiği gibi hazırlanan lizattan 50μL spektrofotometre cihazına özel 96 kuyucuklu kabın her bir kuyusuna eklendi. Lizatın üzerine 50 μL Çizelge 2.8’ de anlatıldığı gibi hazırlanan 2X assay buffer eklendi. 37<sup>o</sup>C’ ye ayarlanan etüvde en az yarım saat ( maksimum 3 saat) inkübasyona bırakıldı. Kuyularda gözle ayırt edilebilen bir renk değişimi (sarı renk oluşumu) oluştuğunda 100μL 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek reaksiyonun durması sağlandı. 420nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

### 2.2.6. RNA İle İlgili Teknikler

#### 2.2.6.1. RT-PCR çalışmaları

C/EBPδ’nın mRNA seviyesinde ekspresyon analizleri RT-PCR çalışmaları ile belirlendi. Bu amaçla transfeksiyon yapmaksızın, Hep3B hücre hattı genomunda var olan C/EBPδ geninin ekspresyon analizleri kullanıldı. Sitokinlerin, C/EBPδ geninin ekspresyonuna olan etkisi önce RT-PCR ve ardından PCR çalışması yapılarak belirlendi.

RT-PCR’da kullanılmak üzere total RNA izolasyonu yapıldı. Öncelikle kullanılması planlanan hücreler, buldukları yüzeyi %80-90 oranında kapladıklarında içinde buldukları medyum uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez steril 2.2.3.3.de anlatıldığı gibi hazırlanan PBS ile yıkandı ve tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerine serum içerikli medyum eklendi ve 1000 rpm’de 5dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet %10 oranında FCS içeren yaklaşık 5ml medyumda çözüldü. Süspansiyondaki canlı hücre sayısını belirlemek amacıyla trypan blue exclusion 2.2.3.8.’de anlatıldığı gibi yapıldı. Ve canlı hücre sayısı belirlendi ve 1500.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapıldı (25cm<sup>2</sup> flask kullanıldı). Her flask toplam hacim 6mL olacak şekilde DMEM ile tamamlandı. *RNeasy mini kit (Qiagen)*’ te belirtildiği üzere RNA izolasyonu için en az 3000000 hücre gerektirmesi sebebiyle her inkübasyon süresi için iki flask kullanıldı. 6s, 24s, 48s ve 72s, inkübasyon süreleri için ayrı 8 flask deney (sitokin uygulanan) grubu ve 8 flask kontrol (sitokin uygulanmayan) grubu hazırlandı. Ekimden 24s sonra sitokin deney gruplarına tatbik edildi. Sitokin ünitesi olarak her sitokin için transfeksiyon deneylerinde tespit edilen maksimum ekspresyona neden olan ünite tercih edildi. Sitokin uygulanmasından 6s, 24s, 48s ve 72s sonrasında *RNeasy mini kit (Qiagen)* kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

#### **2.2.6.1.1. Total RNA İzolasyonu**

*RNeasy mini kit* kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Öncelikle hücrelerin içinde bulunduğu medyum uzaklaştırıldı. PBS kullanılarak hücreler 2 kez yıkandı. Tripsin-EDTA kullanılarak hücreler tripsinize edildi. 500rpm’de 5dk. santrifüj yapılarak hücreler çöktürüldü. Medyum tamamen uzaklaştırıldı. 1000µL RLT buffer ve 10µL β-merkaptotanol içerikli çözeltiden 350µL çöktürülen hücrelerin üzerine eklenerek hücreler liziz edildi. Daha sonra, kitteki protokol aynen uygulanarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu sonrasında miktar ve kalitesinin tayini

amacıyla örnekler formaldehit agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve UV absorpsiyonu ile okundu.

### 2.2.6.1.2. RNA Miktarı ve Kalitesinin Ölçülmesi

#### 2.2.6.1.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

RNA, 1:200 oranında dH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı ve kuvarz küvetler kullanılarak 260 nm’de RNA’nın UV absorpsiyonu okundu. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak RNA konsantrasyonu hesaplandı. Aynı zamanda elde edilen RNA’nın saflığında OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> oranı elde edilerek öğrenildi.

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

#### 2.2.6.1.2.2. Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

Çizelge 2.9. 10X FA Jel Tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
HOPS	41.9gr
Na-acetate 3H <sub>2</sub> O	6.8gr
EDTA(0.5M)	20 mL
dH <sub>2</sub> O	1000 mL tamamlanır
pH =7.0 olacak şekilde hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edildi.	

Çizelge 2.10. RNA Jelde Yürütme Tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
10XFA	50mL
Formaldehit	20mL
DEPC li H <sub>2</sub> O	450mL
Hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edilir.	

**Çizelge 2.11.** RNaz İçermeyen dH<sub>2</sub>O

<b>Kimyasal Madde</b>	<b>Miktar</b>
DEPC	100µL
dH <sub>2</sub> O	100mL
Hazırlanan tampon otavlandı ve daha sonra 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Tampon +4°C’de muhafaza edildi	

Görüntülenmesi gereken RNA örnekleri formaldehit agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. 0,5gr agaroz, 5mL 10XFA tamponu RNase free H<sub>2</sub>O ile 50mL ye tamamlandı. Hazırlanan %1’lik jel kaynatıldıktan sonra 50°C’ye kadar soğutuldu. Son konsantrasyonu 0,5µg/mL olacak tarzda etidyum bromid ve %37’ lik 900µL formaldehit eklendi. Agaroz jel aparatlarına döküldü ve polimerize oluncaya kadar beklendi. DNA örnekleri yükleme tamponuyla karıştırılarak agaroz jele yüklenerek, 80 voltta yürütüldü. Elde edilen jel dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi.

### **2.2.6.1.3. RT-PCR**

2.2.6.1.1.’de anlatıldığı gibi izole edilen RNA örnekleri kullanılarak RNA’dan revers transkriptaz enzimi ve diğer parametreler sayesinde yapılan RT-PCR yapıldı. Çizelge 2.12. ve 2.13.’de belirtilen miktar ve konsantrasyonlarda RT-PCR için gerekli parametreler eklenerek total RNA’dan cDNA elde edildi.

**Çizelge 2.12.** RT-PCR Birinci Aşama

<b>RT-PCR İçerik</b>	<b>Miktar ve Son Konsantrasyon</b>
RNA örneği	650µg
oligodt	2µL(70µM)
dNTP	2µL(25mM)
dH <sub>2</sub> O	...µL
Toplam hacim	20µL
70 <sup>0</sup> C de 10dk inkübe edilir.Örnekler buz üzerine alınarak hemen diğer aşamaya geçilir.	

**Çizelge 2.13.** RT-PCR İkinci Aşama

<b>RT-PCR İçerik</b>	<b>Miktar ve Son Konsantrasyon</b>
RNaz inhibitör	2µL (40ü/µL)
RT enzim	2µL(200ü/µL)
5X Buffer	8µL
dH <sub>2</sub> O	8µL
Toplam hacim	20µL
42 <sup>0</sup> C de 50dk inkübe edildi.	

### 2.2.6.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

RT-PCR sonucunda elde edilen cDNA'dan insan C/EBP $\delta$  geninin çoğaltılması amacıyla PCR reaksiyonları yapıldı. PCR reaksiyonları 50 $\mu$ L'lik toplam hacimde, aşağıda Çizelge 2.14' de belirtilen miktarların ilavesi ile gerçekleştirildi.

**Çizelge 2.14.** PCR İçeriği

PCR İçerik	Miktar ve Son Konsantrasyon
Tampon 10x	5 $\mu$ L (1x)
dNTP	1 $\mu$ L (100mM)
Forward primer	1 $\mu$ L (100 $\mu$ M)
Reverse primer	1 $\mu$ L (100 $\mu$ M)
cDNA	1 $\mu$ L (650ng/ $\mu$ l)
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L (1 Mm)
Taq DNA polimeraz	0,5 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)
dH <sub>2</sub> O	38,5 $\mu$ L
Toplam	50 $\mu$ L

**Çizelge 2.15.** PCR Koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94 <sup>0</sup> C	2 dakika
2	35	94 <sup>0</sup> C	30 saniye
		60 <sup>0</sup> C	30 saniye
		72 <sup>0</sup> C	30 saniye
1	1	72 <sup>0</sup> C	5 dakika

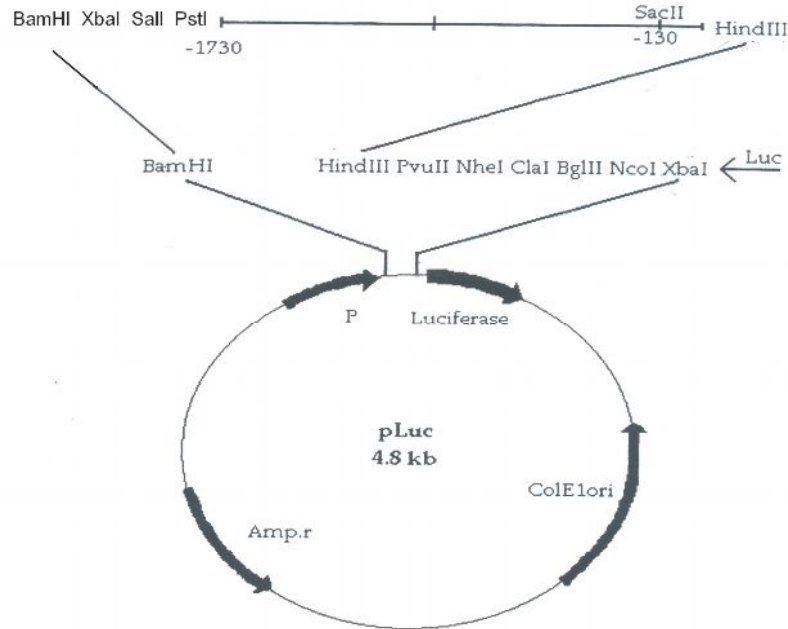
### **2.2.7. Sonuçların İstatistiksel olarak analiz edilmesi**

Tüm istatistiki analiz alışmaları, Minitab14 (Anova analizi kullanılmıştır) versiyonu kullanılarak yapıldı.  $P < 0.001$  olarak saptanan değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

### 3. BULGULAR

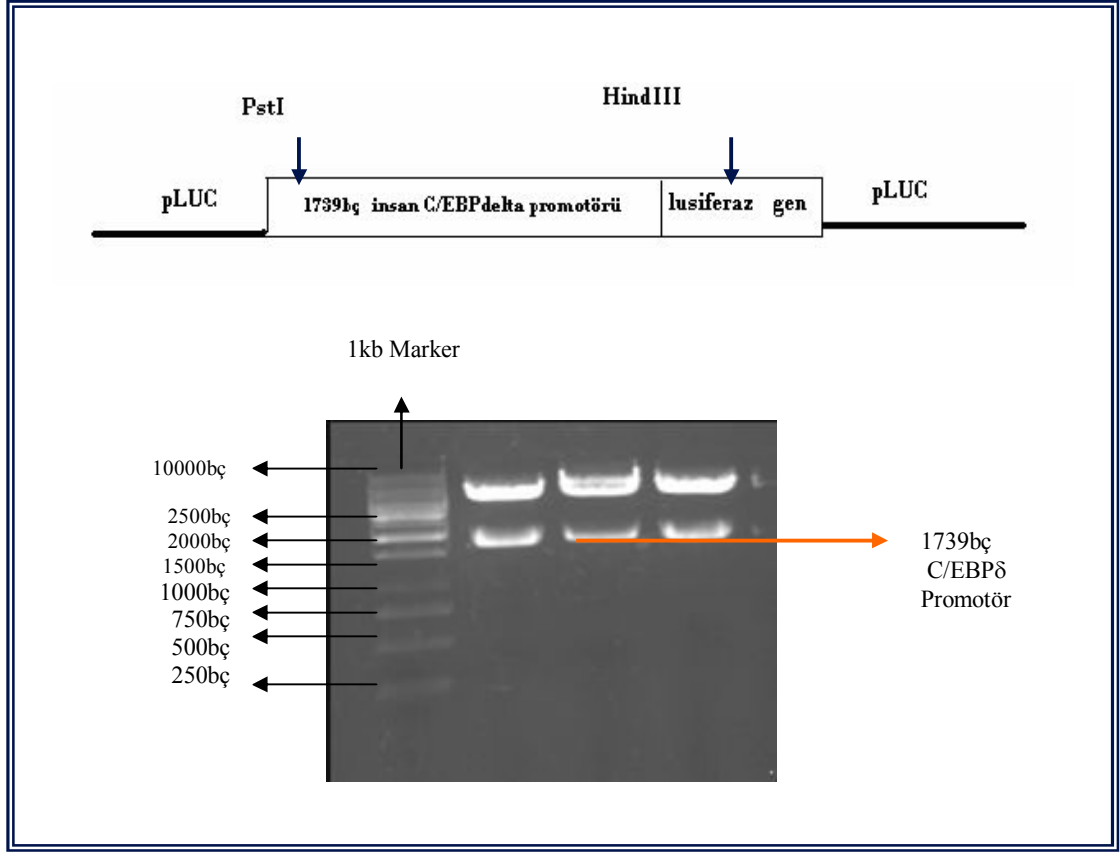
#### 3.1. iC/EBP $\delta$ Promotörünün Bioinformatik Analizi

iC/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amacıyla 1739bç büyüklüğündeki iC/EBP $\delta$  promotörü pLUC vektörüne klonlanmış ve dizi analizleri yapılmış olarak Dr. Dipak Ramji'den temin edilmiştir. Restriksiyon haritası Şekil 3.1'de gösterilmektedir. 1739bç iC/EBP $\delta$  promotör plazmitinin doğrulanması amacıyla, PstI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile 2.2.4.1'de anlatıldığı gibi kesim yapılmış ve restriksiyon endonükleazları ile yapılan kesim sonucunun agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. pLUC vektörünün restriksiyon haritası





**Şekil 3.2.** 1739bp pLUC ekspresyon plazmitinin, HindIII / PstI restriksiyon enzimleri ile yapılmış kesimin agaroz jel elektroforez görüntüsü

1739bp iC/EBP $\delta$  promotörünün dizi analizi İngiltere LARK teknoloji’de otomatik dizi analizine gönderilmiş ve plazmit klonunun restriksiyon kesimi ile doğrulanması yapılmıştır. Buna göre Şekil 3.3’de muhtemel transkripsiyon başlangıç noktası ve muhtemel TATA kutusu gösterilmiştir. Muhtemel transkripsiyon faktörlerinin bağlanma motifleri ise WEB bazlı bir program olan TRANSFAC programı kullanılarak belirlenmiştir. Bunlardan önemli olanlarının bazıları direkt promotör üzerinde bağlanma yönüne göre gösterilmiştir. Kısa bir özet teşkil etmesi açısından bazı önemli muhtemel transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri de Çizelge.3.1’de ayrıca belirtilmiştir.





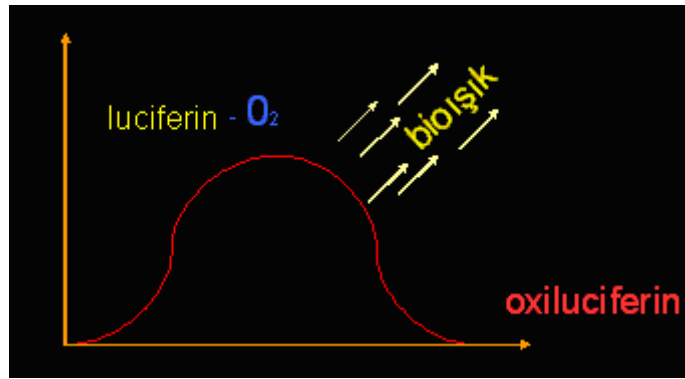
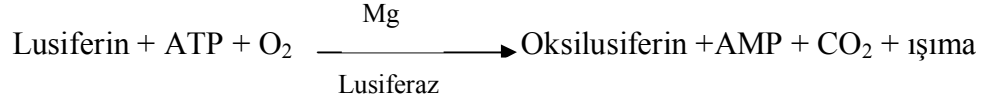
**Çizelge 3.1.** Transkripsiyon faktörlerinin insan C/EBP $\delta$  promotörü üzerinde var olan bağlanma bölgeleri

Transkripsiyon faktörleri	Lokasyon	Bağlandığı nokta sayısı
CREB	-39, -1239	2
C/EBP	-925	1
SP1	-20, -54, -28, -383	4
ADR1	-54, -39,-99, -89,-107,-137,-167,-155,-205, -179,-442,-474,-482,-509,-268,-314,-320, -392, -1389, -1430	20
NF-kap	-155,-165,-1676,-1685	4
GATA-1	-490, -713,-889,-1017,-1027,-1055-1455,- 1471,-1601,-1625,	10
AP-2	-129,-392,-431,-576	4
STAT	-968	1

### 3.2. Geçici Transfeksiyon Stratejisi

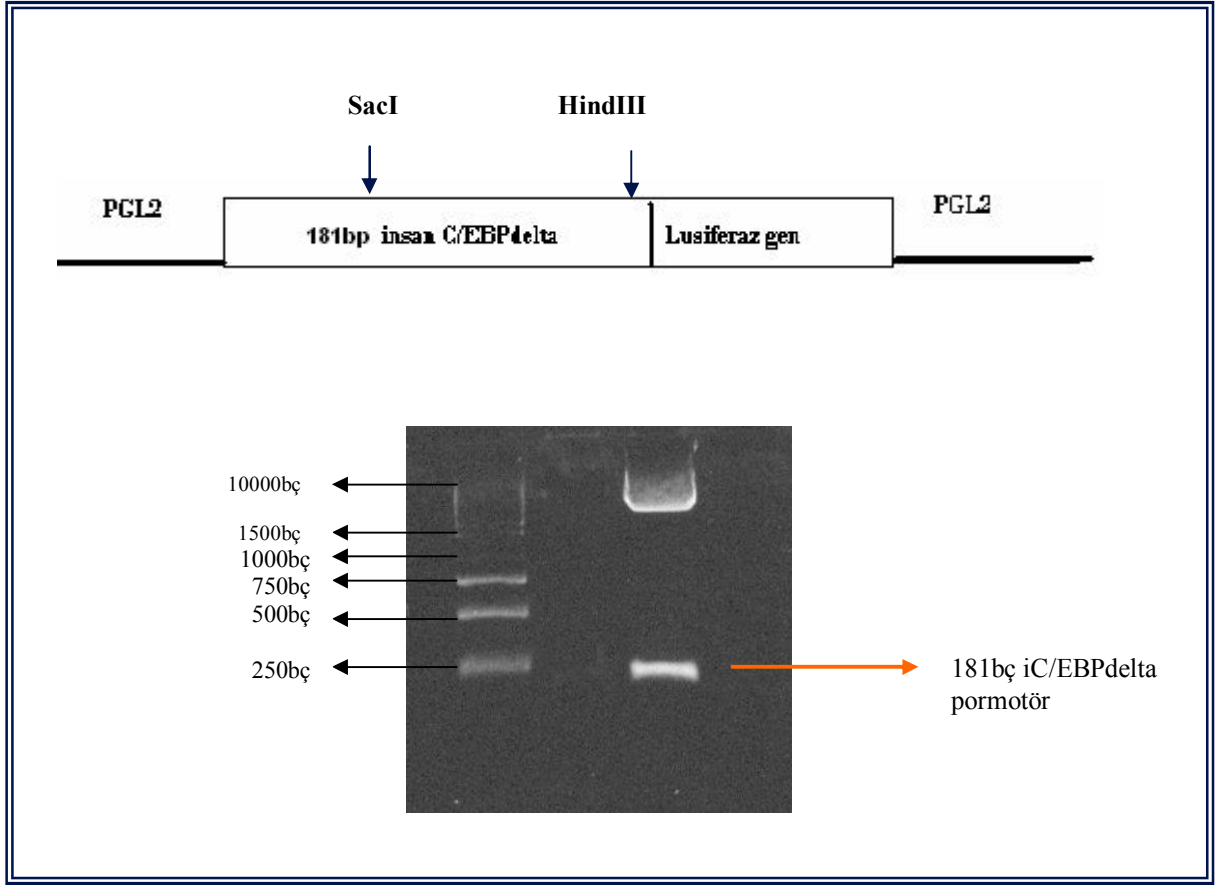
Geçici transfeksiyon deneylerinde model hücre olarak insan hepatoma hücreleri olan Hep3B hücreleri kullanıldı. Bu hücreler Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK (Bilkent, Ankara)'ten temin edildi. C/EBP genlerinin oldukça iyi ekspres oldukları bir model olması ve pek çok transkripsiyonel regülasyonda kullanılması sebebiyle, çalışmalarımızda Hep3B hücre hattı tercih edildi [5]. iC/EBP $\delta$  transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesinde lusiferaz assay sistemi kullanıldı. Bu sisteme göre promotör fragmentleri lusiferaz geninin ön kısmına klonlandı ve ardından hücre içine 2.2.5.3.'de anlatıldığı gibi transfekte edildi. Bu doğrultuda promotör aktivitesi ile lusiferaz enzim aktivitesi doğru orantılı olmaktadır. Bu sebeple elde edilen lusiferaz aktiviteleri değerlendirilmiş ve dolayısıyla promotör aktivitesi belirlenebilmiştir. Ancak geçici transfeksiyon deneylerinde şartların optimumluğunu sınamak amacıyla farklı bir ekspresyon plasmidi ve farklı bir sistem olan beta galaktosidaz sistemi de kullanılmıştır. Kullanılan beta galaktosidaz sistemi sonucunda beta-galaktosidaz

aktivitesi belirlenmiştir. Böylece, elde edilen lusiferaz ve beta galaktosidaz aktiviteleri oranlanarak göreceli olarak lusiferaz sonuçları değerlendirilebilmiştir (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Lusiferaz reaksiyonu ve reaksiyonun şematik gösterimi

Transkripsiyonel aktiviteyi tam olarak aydınlatılabilmek, transkripsiyonel aktivitenin maksimum gerçekleşebileceği bölgeleri tespit etmek ve transkripsiyonel kontrolün C/EBPδ için en önemli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma motiflerini içerdiği bölgelerin tespit etmek için kısaltılarak yapılan promotör delesyonları oluşturuldu. İlk promotör delesyon plasmidi Dr. Feray KÖÇKAR tarafından PCR'a dayalı strateji ile gerçekleştirildi. Buna göre yüksek güvenilirlikte bir enzim olan Herculkase (Stratagene) ile çoğaltılmış promotör parçası pGL2 Basic lusiferaz vektörüne klonlandı. 181bp iC/EBPδ promotör plazmidi, SacI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile 2.2.4.2' de anlatıldığı gibi kesim yapılarak doğrulandı (Şekil 3.5).

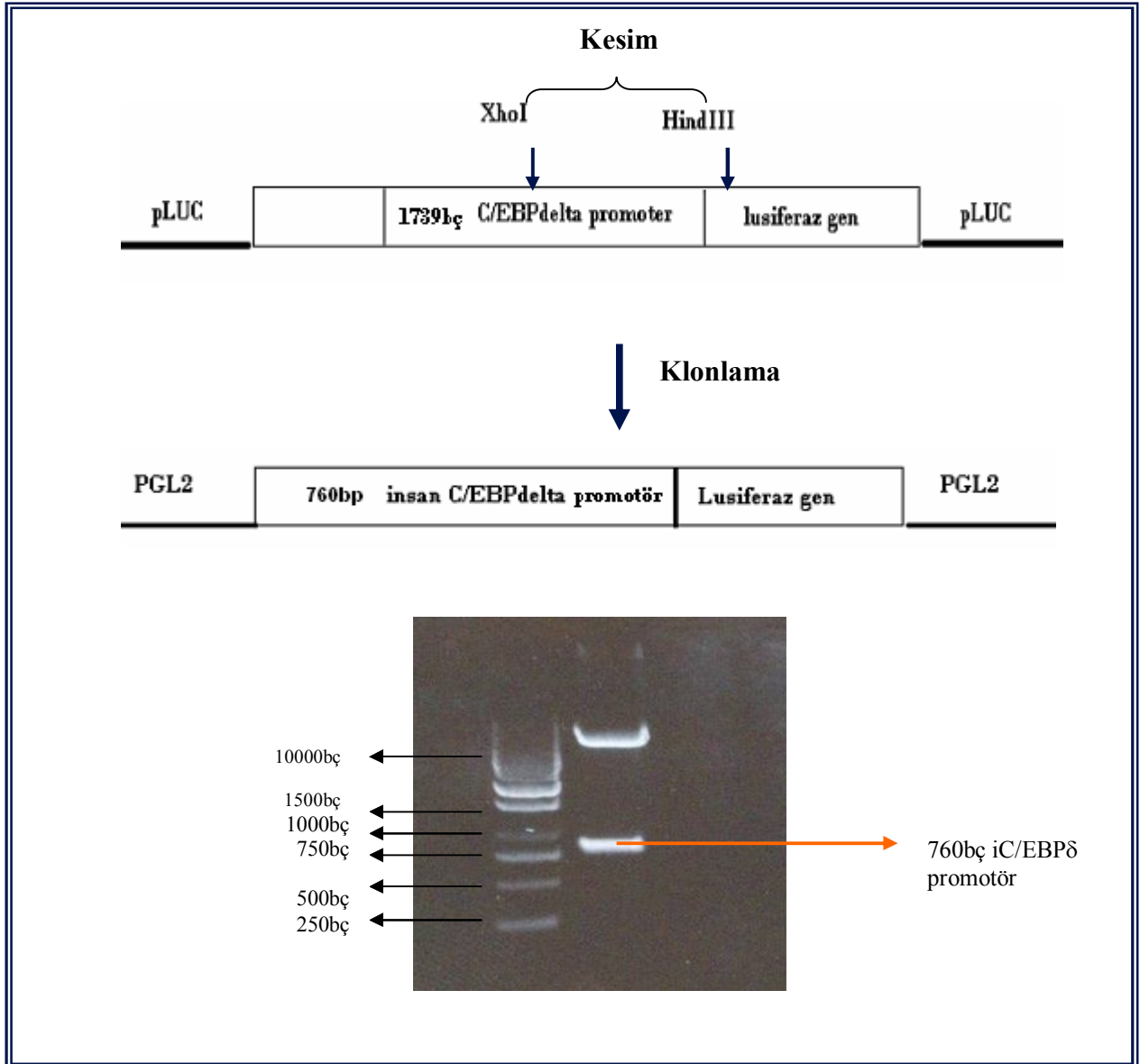


**Şekil 3.5.** 181bç iC/EBP delta promotör plazmitinin restriksiyon endonükleazları ile kesim stratejisi ve agaroz jel elektroforez görüntüsü

### 3.3. Kısaltılarak Hazırlanan 760bç C/EBPδ Promotör Plazmiti

Çalışmada, 1739bç ve 181bç promotör büyüklüklerinin ortasında bir diziyi temsil eden üçüncü bir promotör delesyonu, restriksiyon haritalaması sonucunda hazırlandı. Öncelikle 1739bç büyüklüğündeki insan C/EBPδ promotör plazmiti ve pGL2 basic lusiferaz vektörü, plazmit haritasındaki kesim noktaları dikkate alınarak 2.2.4.1.'de anlatıldığı gibi XhoI (NEB) ve HindIII (NEB) enzimleri ile kesildi. 2.2.4.2.'de anlatıldığı gibi 760bç C/EBPδ promotör dizisi ve pGL2 plazmiti jelden geri kazanıldı. 2.2.4.3.'de anlatıldığı gibi iki DNA örneği ligasyona tabi tutularak 760bç uzunluğundaki C/EBPδ promotörü pGL2 plazmitine klonlandı. Daha sonra kompetent DH5α hücrelerine 2.2.2.6.'da belirtildiği gibi transforme edildi. Hücreler

beta galaktosidaz geni taşımaması sebebiyle mavi beyaz seleksiyon yapılamamıştır. Bu sebeple, rekombinant plazmitlerin tespiti için olası üç ayrı koloni incelemeye alındı. 2.2.2.7.'de anlatıldığı gibi düşük ölçekli plazmit DNA izolasyonu (miniprep) izolasyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen 760bç iC/EBP $\delta$  promotör plazmiti, XhoI ve HindIII restriksiyon endonükleazları ile 2.2.4.2' de anlatıldığı gibi tekrar kesim yapılarak doğrulandı (Şekil3.5).



**Şekil 3.6.** 760bç iC/EBP delta promotör plazmitinin kısaltılarak hazırlanma stratejisi ve restriksiyon enzimleri ile kesimin agaroz jel elektroforez görüntüsü

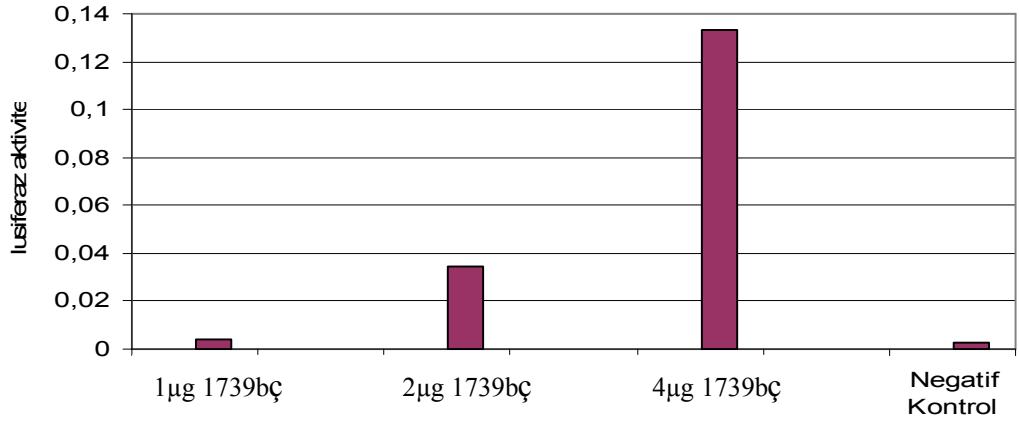
1739bç iC/EBPδ promotör plazmiti, 181bç iC/EBPδ promotör plazmiti ve 760bç iC/EBPδ promotör plazmiti elde edilmesinin ardından ve 2.2.2.8.'de anlatıldığı gibi transfesksiyon yapılabilecek düzeyde temiz ve bol miktarda DNA eldesi için yüksek ölçekli plazmit DNA izolasyonu (maksiprep) yapıldı. Elde edilen DNA miktar ve kalitesi 2.2.4.2.'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir.

### **3.4. Geçici Transfeksiyon Deneylerinin Optimizasyonu**

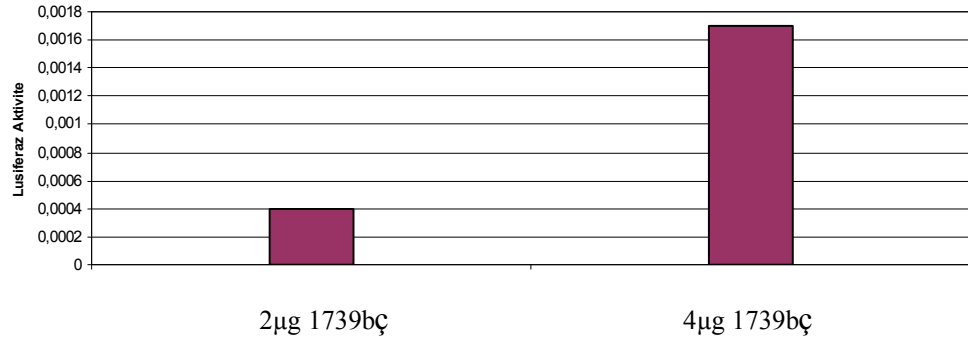
Transfeksiyon deneylerinin optimizasyon aşamasında üç farklı strateji kullanıldı. Transfeksiyon deneylerinin ilk denemesinde 2.2.5.1.'de belirtildiği gibi kalsiyum fosfat yöntemi kullanıldı. Ancak lusiferaz ölçümlerinin sürekli düşük çıkması sebebiyle (Şekil 3.7) farklı bir transfeksiyon metodu kullanıldı. Ticari bir sistem olan 2.2.5.2.'de belirtildiği gibi Fugune Hd kit sistemi denendi. Ölçümlerin ilk çalışmaya göre daha düşük çıkması nedeniyle (Şekil 3.8) üçüncü bir transfeksiyon yöntemi belirlendi. 2.2.5.3.'de belirtildiği gibi farklı bir kalsiyum fosfat yöntemi denendi. Bu yöntem kullanılan kalsiyum yönteminin modifikasyonu ile elde edildi. Transfeksiyon aktivitesinin diğer metotlara oranla 10 kat artması nedeniyle bu yöntem sonraki tüm transfeksiyon çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 3.9.).

Transfeksiyon çalışmaları 2.2.5.3.'de anlatıldığı gibi modifiye kalsiyum fosfat presipitasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Promotör plazmiti sonuçların normalizasyonunda kullanılmak üzere, beta-galaktosidaz plazmiti ile birlikte transfekte edildi. Her transfeksiyon çalışmasında, negatif kontrol olarak kullanacağımız transfeksiyon yapılmayan ve pozitif kontrol olarak kullanacağımız RSV plazmiti transfekte edilen iki kuyu mutlaka çalışıldı. Negatif ve pozitif kontrol çalışmaları sayesinde transfeksiyon etkinlikleri mukayese edilebildi.

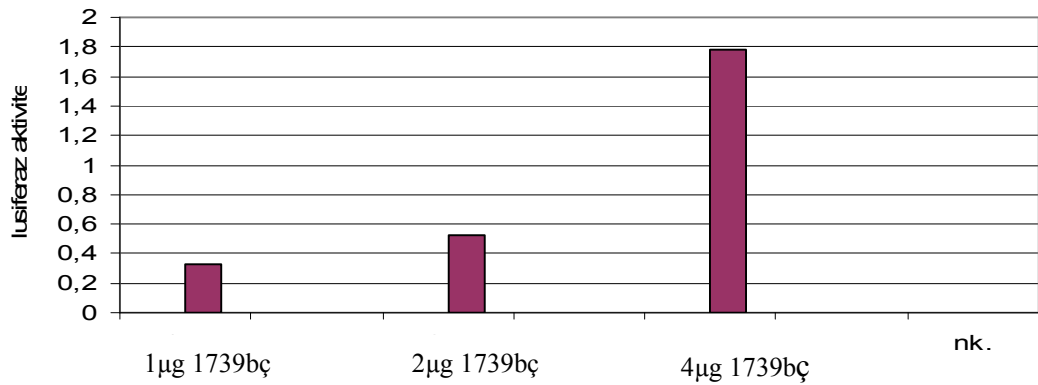




**Şekil 3.7.** Kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile bazal aktivitenin belirlenmesi



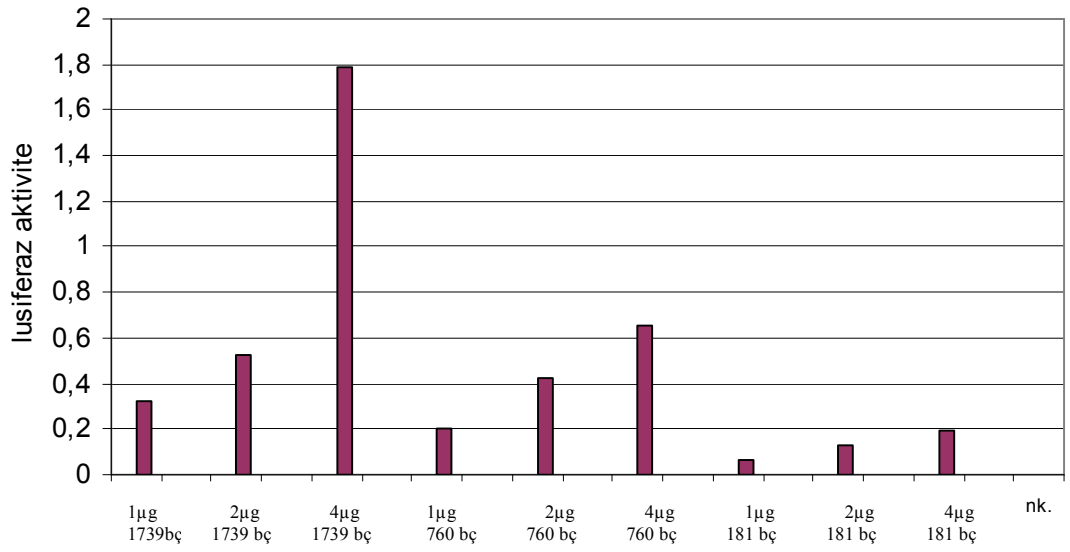
**Şekil 3.8.** Fugune hd kit transfeksiyon çalışması ile bazal aktivitenin belirlenmesi



**Şekil 3.9.** Modifiye kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile bazal aktivitenin belirlenmesi

### 3.5. Bazal Promotör Aktivitelerin Belirlenmesi

Hazırlanmış olduğumuz üç farklı ekspresyon plazmiti için öncelikle bazal aktivite tayini yapıldı. 1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g ve 4 $\mu$ g olmak üzere hazırlanmış olduğumuz her bir promotör plazmiti için üç farklı konsantrasyonda transfeksiyon uygulaması yapıldı. Transfeksiyondan 24s sonra transfeksiyon etkinliği 2.2.5.5.1.'de anlatıldığı gibi lusiferaz aktivitesi ve 2.2.5.5.2.'de anlatıldığı gibi beta-galaktosidaz aktivitesi belirlenerek saptandı.



**Şekil 3.10.** Modifiye kalsiyum fosfat transfeksiyon yöntemi ile üç farklı promotör plazmitinin bazal lusiferaz aktivitesi

### 3.6. Farklı Sitokin Uygulamaları

Transfeksiyon işleminden 24s sonra sitokin uygulaması yapıldı. IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , ve IL-6 olmak üzere beş farklı sitokin 1000U olacak şekilde uygulandı. Sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s sonra lusiferaz ve beta galaktosidaz aktiviteleri belirlenerek sitokinlerin bazal aktiviteye olan etkileri saptandı. Daha sonraki çalışmalarda ise etkinliği saptanan her bir sitokin için 1000U, 500U, 100U ve 10U olacak şekilde dört farklı konsantrasyonda sitokin muamelesi yapıldı.

### 3.7. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

181bç'lık promotör fragmentinin transfeksiyonu sonrasında, uygulanan TGF- $\beta$  sitokini ile farklı konsantrasyonlarda ve zaman aralıklarında yapılan analizler sonucunda, özellikle 48s ve 72s'lik zaman dilimlerinde 1000U, 500U ve 100U konsantrasyonlarının iC/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel regülasyonunu arttırdığı görülmektedir. Aynı durumun 1739bç ve 760bç'lık daha büyük promotörlerde özellikle 48s ve 72s zaman aralıklarında görülmektedir. Bu sonuçlar, TGF- $\beta$  sitokininin özellikle ilk 181bç'da bulunan *cis acting element* yardımıyla C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel regülasyonunu arttırdığı önerilebilir (Şekil 3.11, Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).

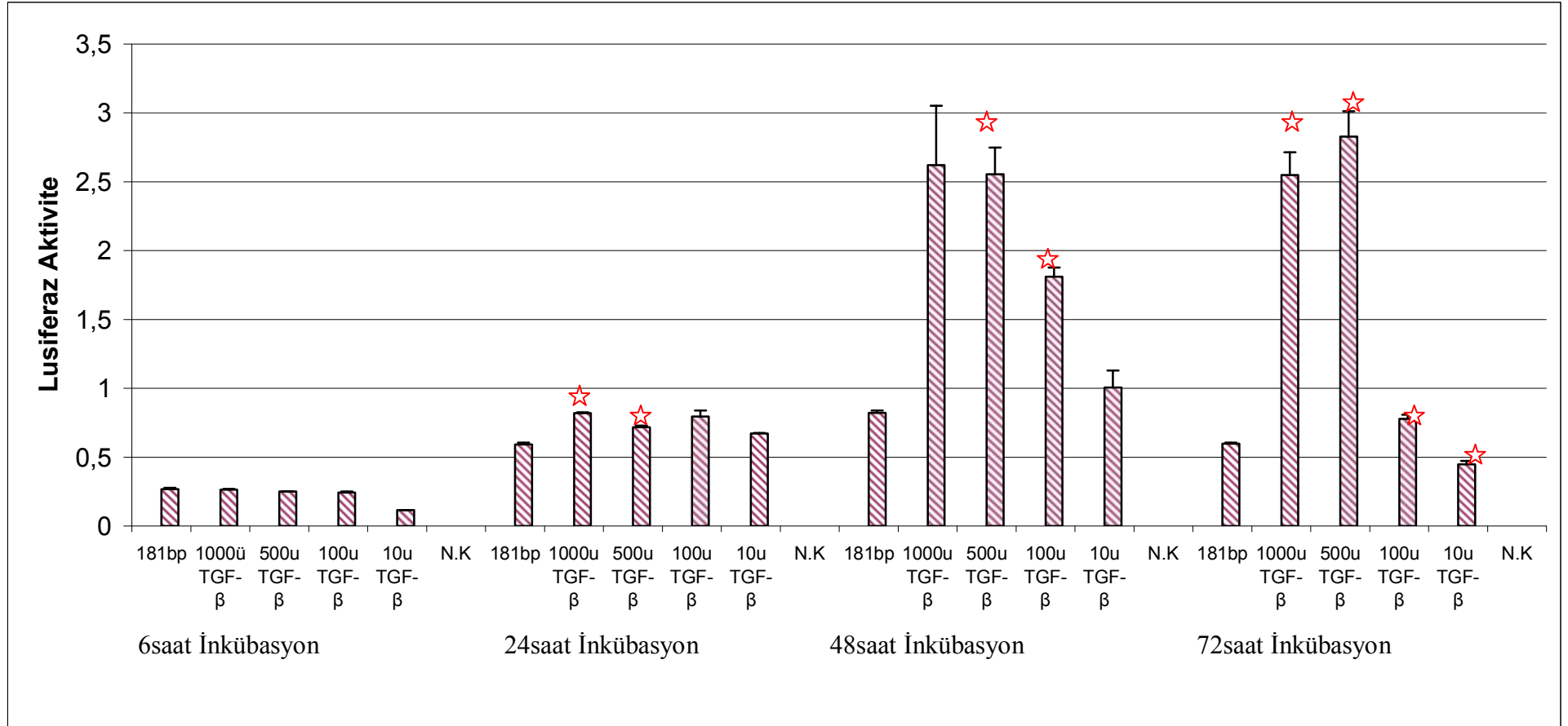
TNF- $\alpha$  sitokinin aynı konsantrasyon ve inkübasyon aralıklarında 6s'te 181bç ve 760bç için önemli olmadığı istatistiksel olarak görülmektedir. Fakat 1739bç'lık promotör fragmentinin 6s inkübasyon süresi sonucunda tüm konsantrasyon aralıklarında, transkripsiyonel aktivitenin negatif olarak regüle olduğu görülmektedir. 24s'lik zaman aralığında tüm promotör parçalarında istatistiki açıdan önemli olabilecek fark yaratmadığı gibi, 48s ve 72s'te hem 181bç, hem de 760bç büyüklüğündeki promotör üzerinde pozitif yönde transkripsiyonel bir artış sağladığı görülmektedir. 1739bç'lık promotör fragmentinde istatistiki açıdan herhangi bir önemli fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Hatta 72s'lik inkübasyon süresi sonucunda transkripsiyonel aktiviteyi azaltma gibi bir eğilim göstermiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15 ve Şekil 3.16).

IFN- $\gamma$  sitokininin post transkripsiyonel sonrasında, farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon aralıklarında sitokin uygulamaları herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek farklılık yaratmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.19 ).

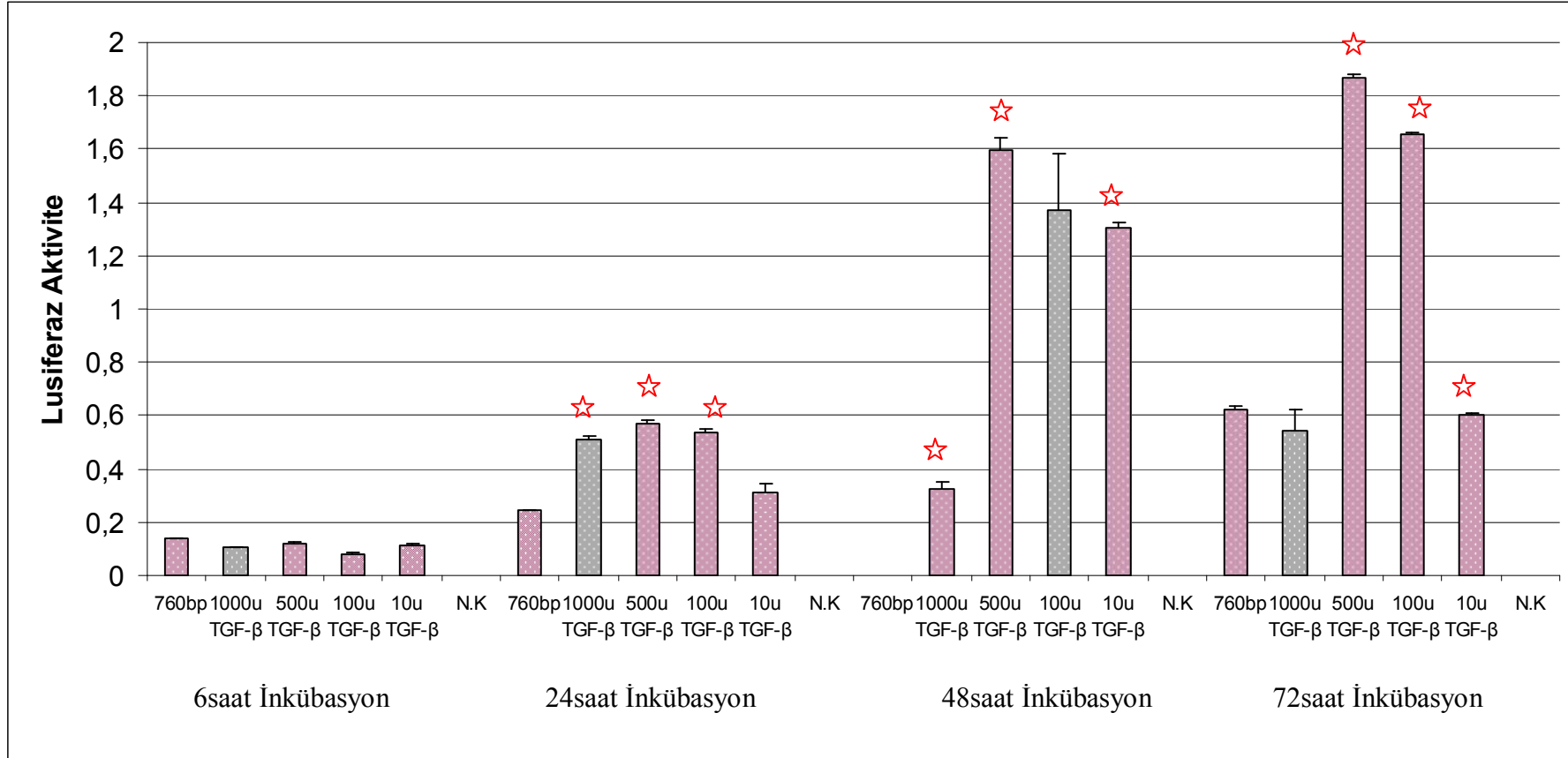
IL-1, 181bç C/EBP $\delta$  promotörünün transfeksiyon sonrasında uygulanan IL-1 sitokini 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon aralıklarında tüm konsantrasyonlarda bir etki

oluşturmadığı gözlenmektedir. 760bç'lık promotör parçası için, 6s, 24s ve 48s zaman aralıklarında istatistiki olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı gözlenmektedir. 72s inkübasyon sonucunda ise bir aktivite azalmasına rastlanmaktadır. 1739bç'lık promotör parçasıda IL-1 sitokinine karşı herhangi bir cevap oluşturmadığı gözlenmektedir. Sadece 72s inkübasyon sonucunda pek çok dozda istatistiki olarak bir artış görülmektedir (Şekil 3.20, Şekil 3.21 ve Şekil 3.22).

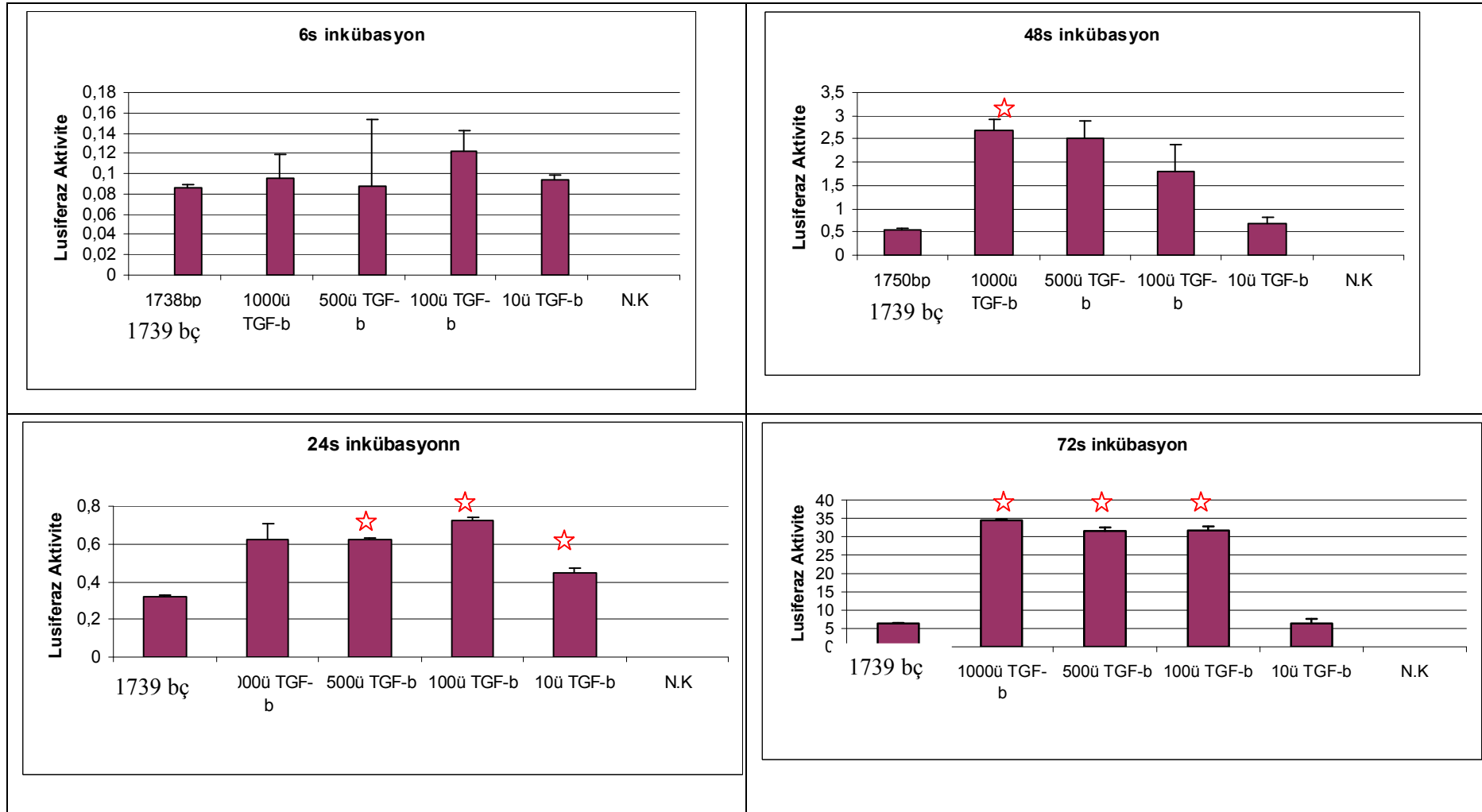
IL-6 sitokininde özellikle 6s'te bir pozitif regülasyon var olmasına rağmen diğer zaman aralıklarında bu artış görülmemektedir (Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25 ).



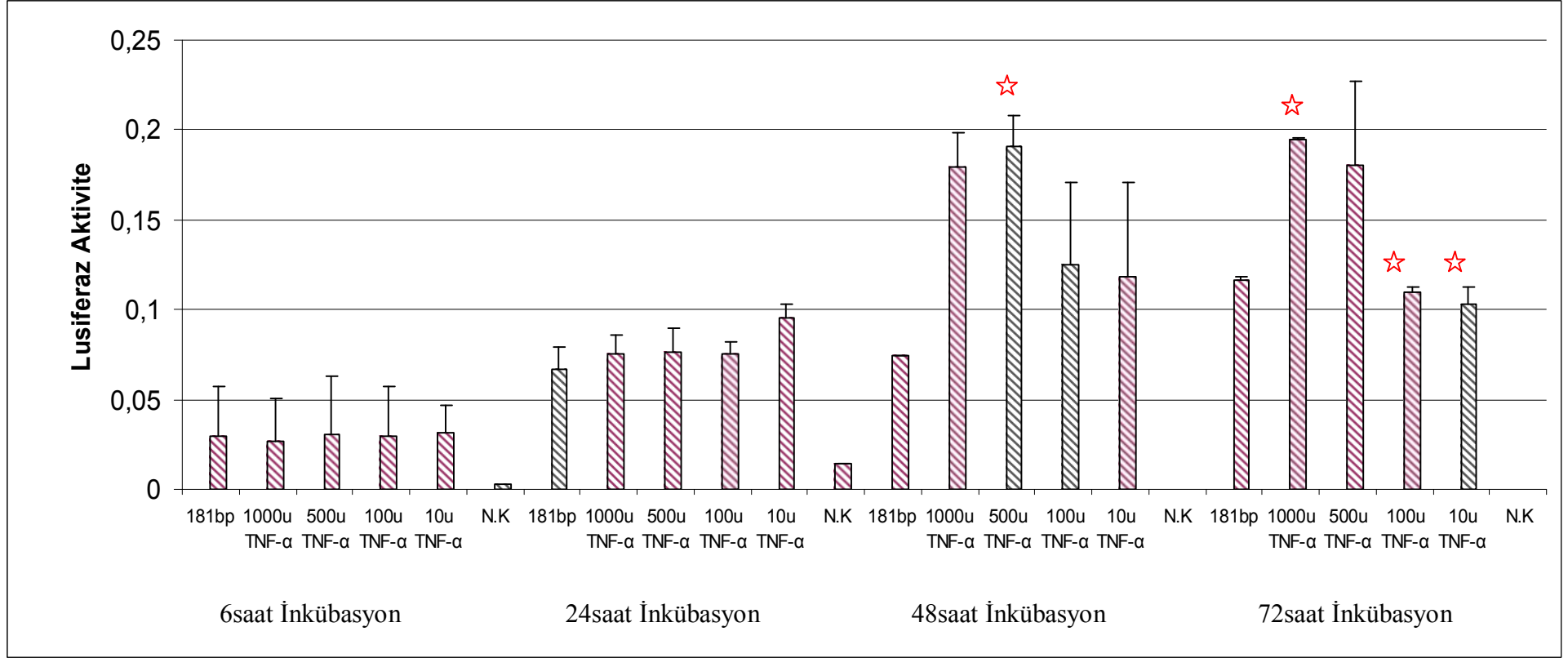
**Şekil 3.11.** TGF-β sitokinininin, 181bp büyüklüğündeki C/EBPδ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi. ☆ İstatistiki olarak önemli olan  $p < 0.001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.



**Şekil 3.12.** TGF- $\beta$  sitokinininin, 760bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi. ☆ istatistiki olarak önemli olan  $p < 0.001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.

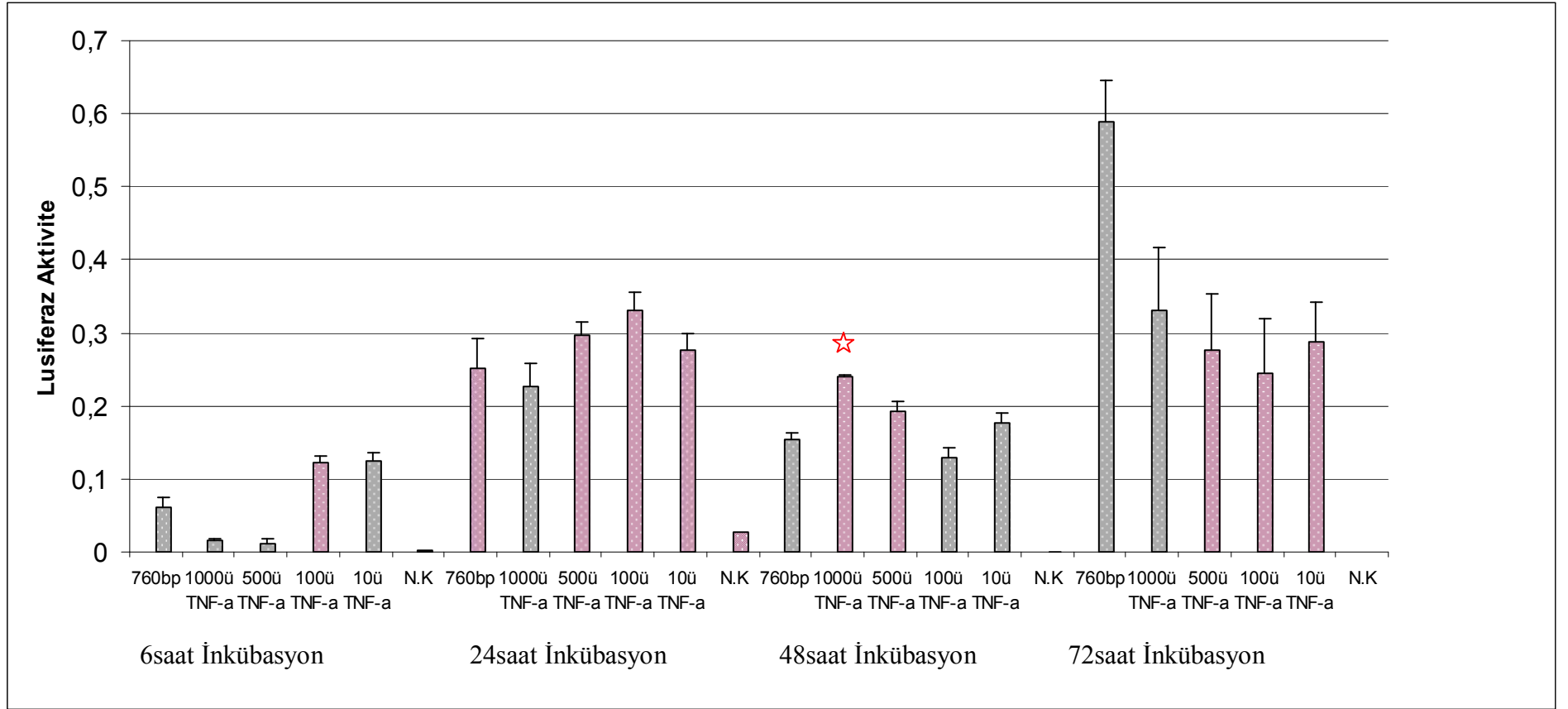


**Şekil 3.13.** TGF- $\beta$  sitokinininin, 1739bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi. ☆ istatistiki olarak önemli olan  $p < 0.001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.

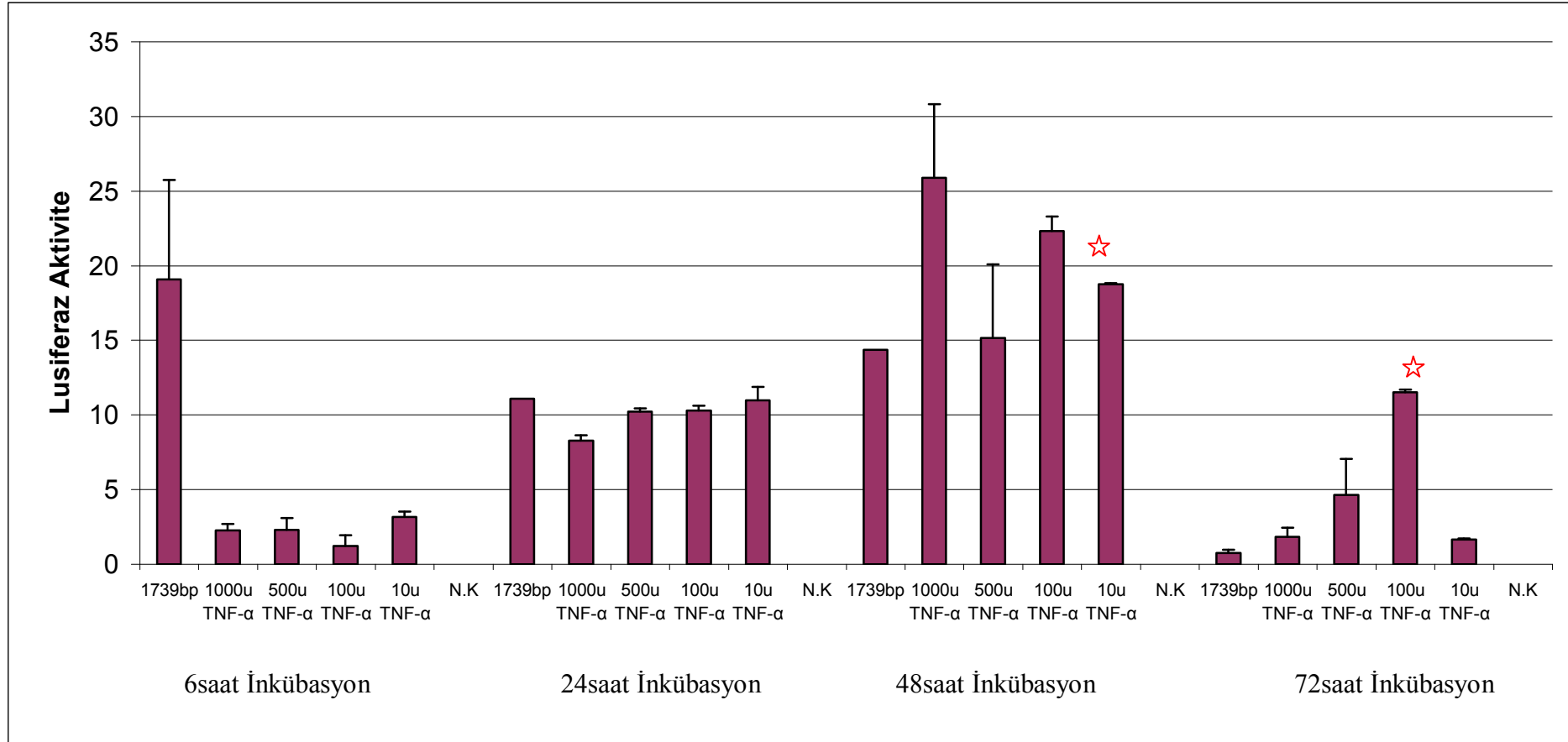


**Şekil 3.14.** TNF- $\alpha$  sitokininin, 181bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazminin ekspresyonuna olan etkisi, . ☆ istatistiki olarak önemli olan  $p < 0,001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.

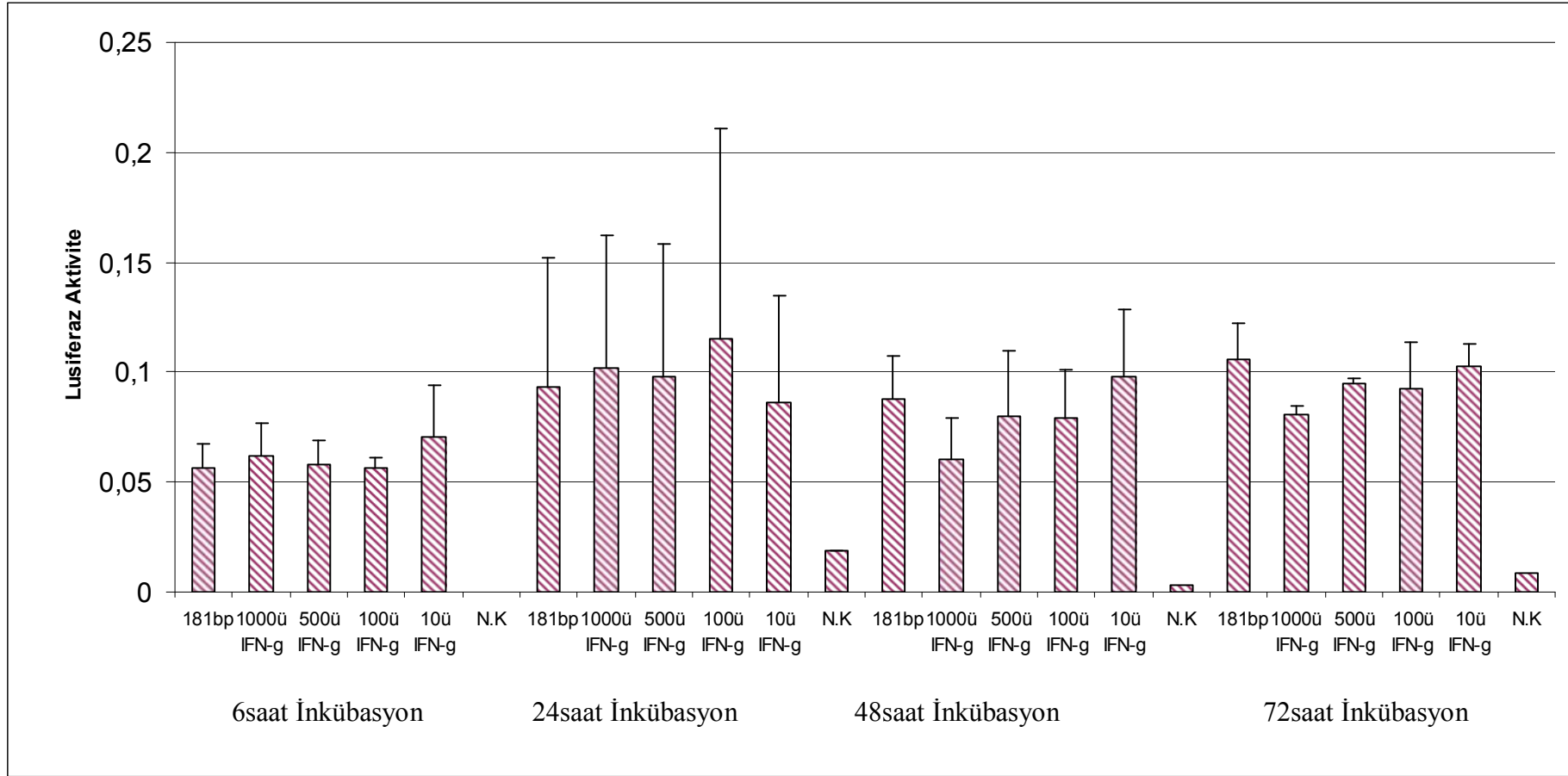




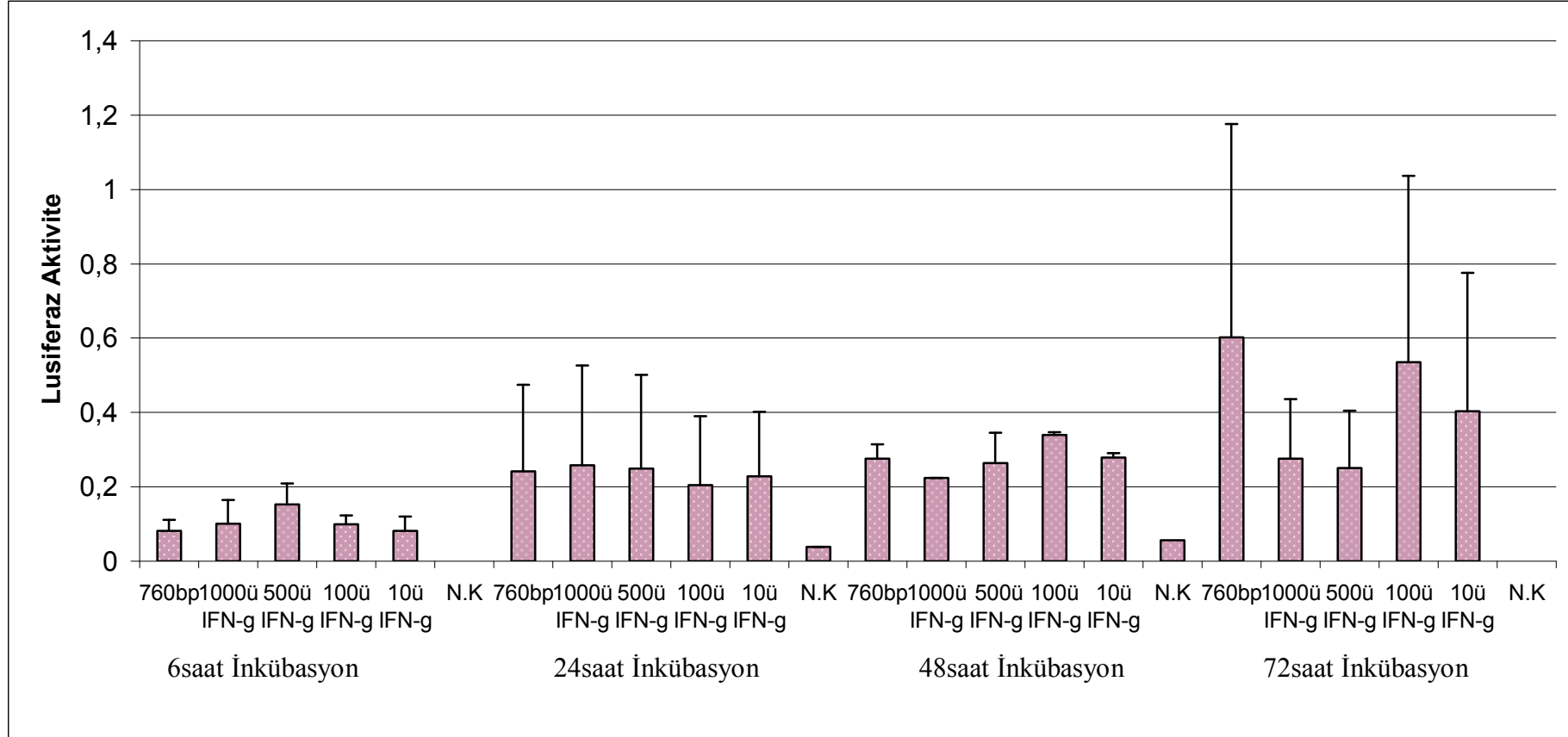
Şekil 3.15-TNF- $\alpha$  sitokininin, 760bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazminin ekspresyonuna olan etkisi. İstatistik olarak önemli olan  $p < 0.001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.



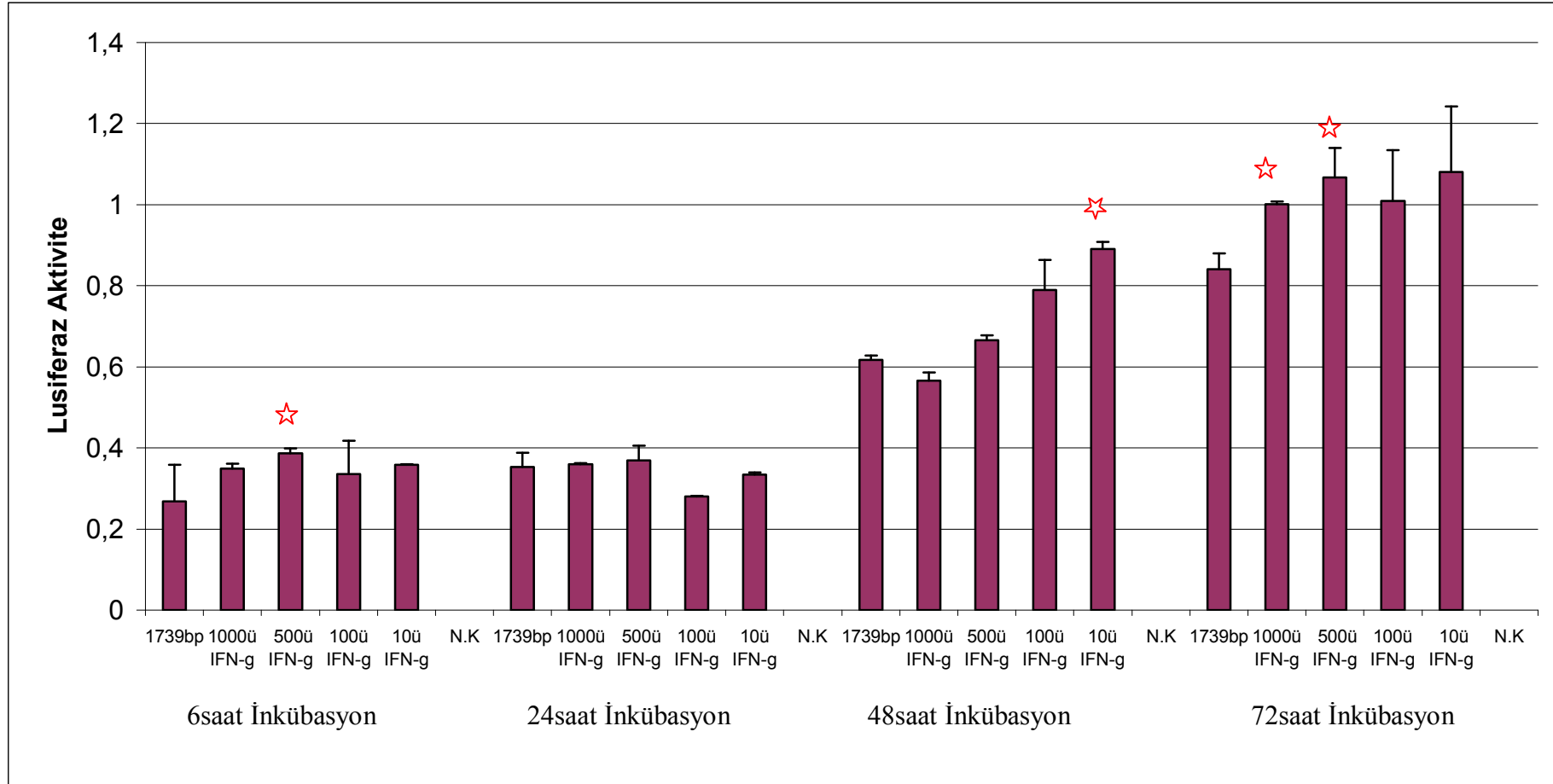
Şekil 3.16 TNF- $\alpha$  sitokinininin, 1739bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmidinin ekspresyonuna olan etkisi, . ☆ istatistik olarak önemli olan  $p < 0.001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.



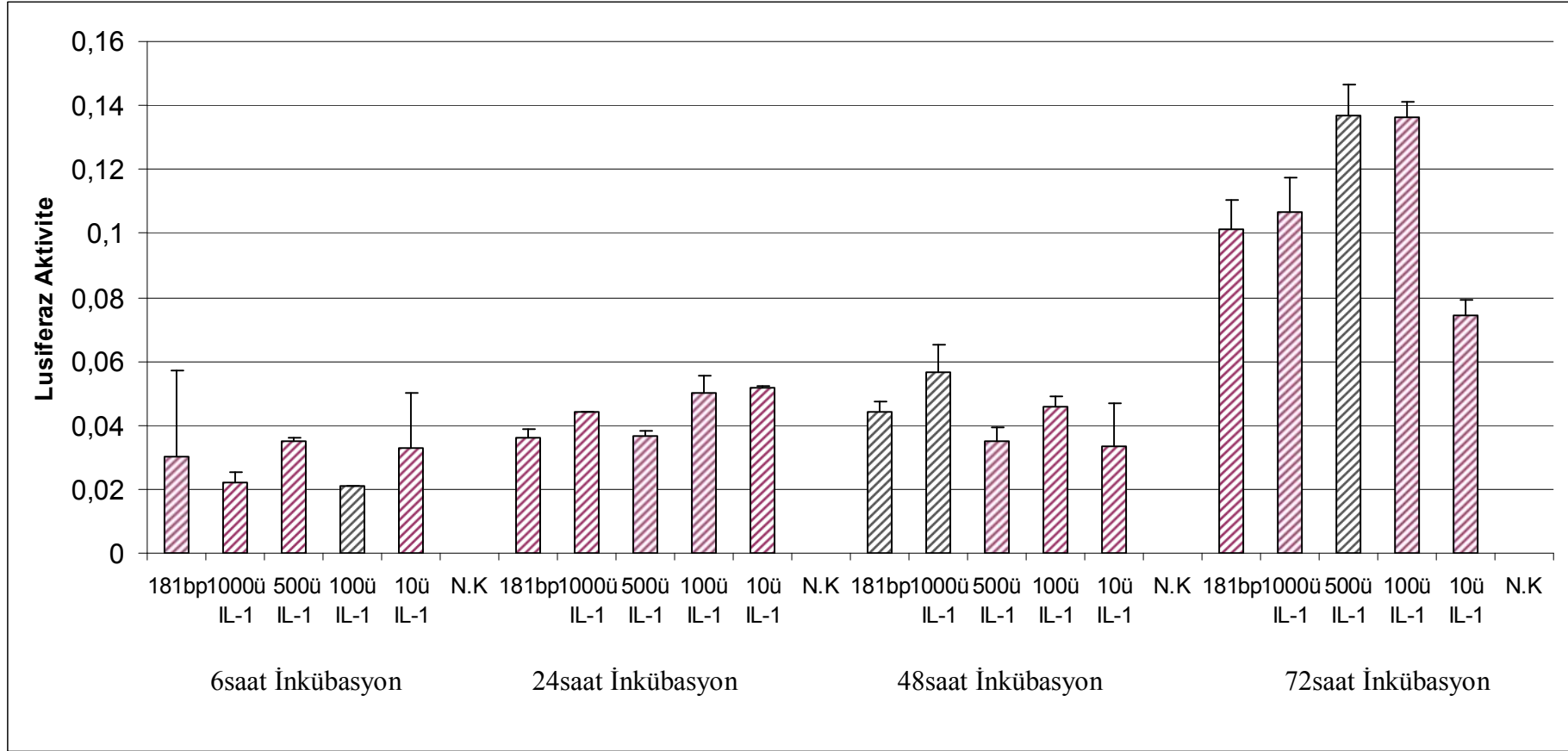
Şekil 3.17. IFN $\gamma$  sitokininin, 181bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazminin ekspresyonuna olan etkisi



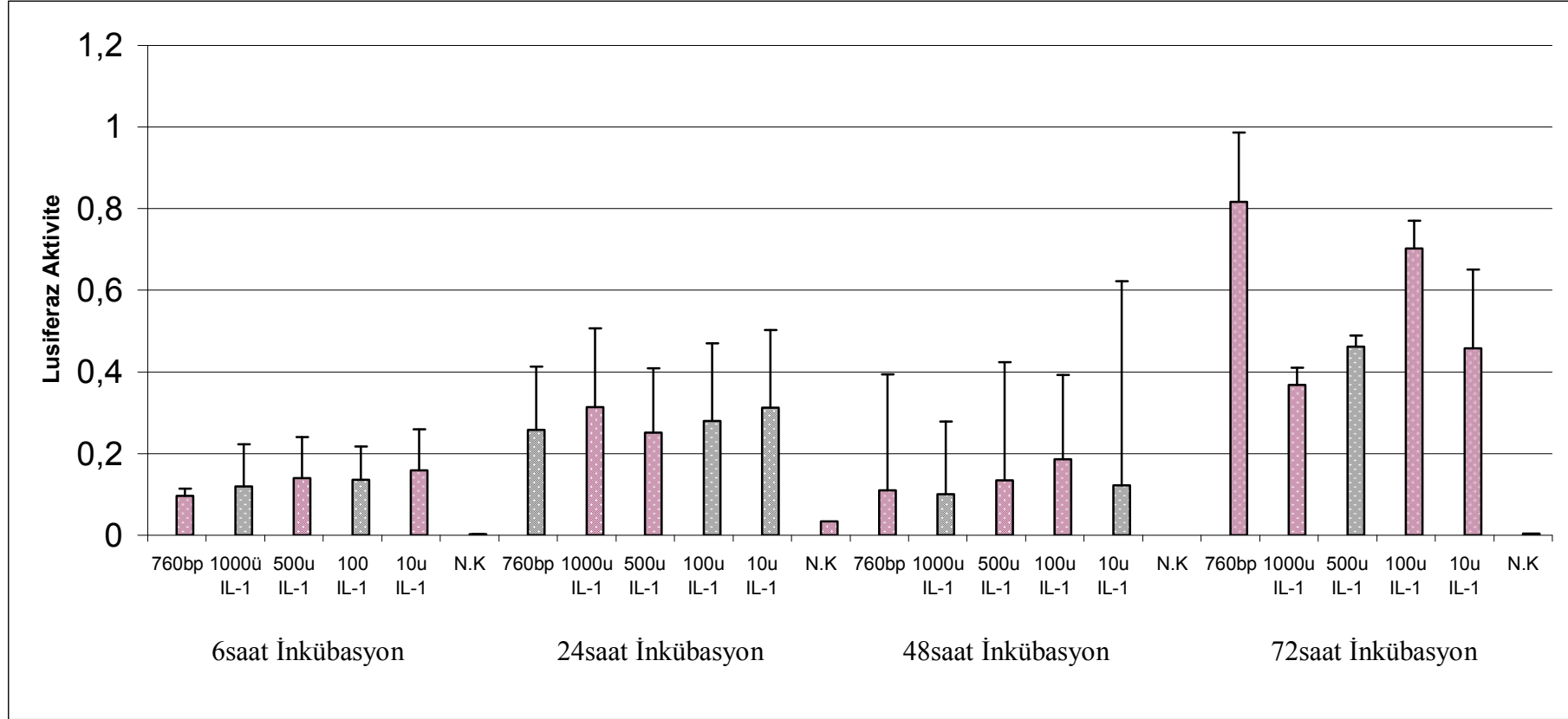
**Şekil 3.18** IFN- $\delta$  sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi



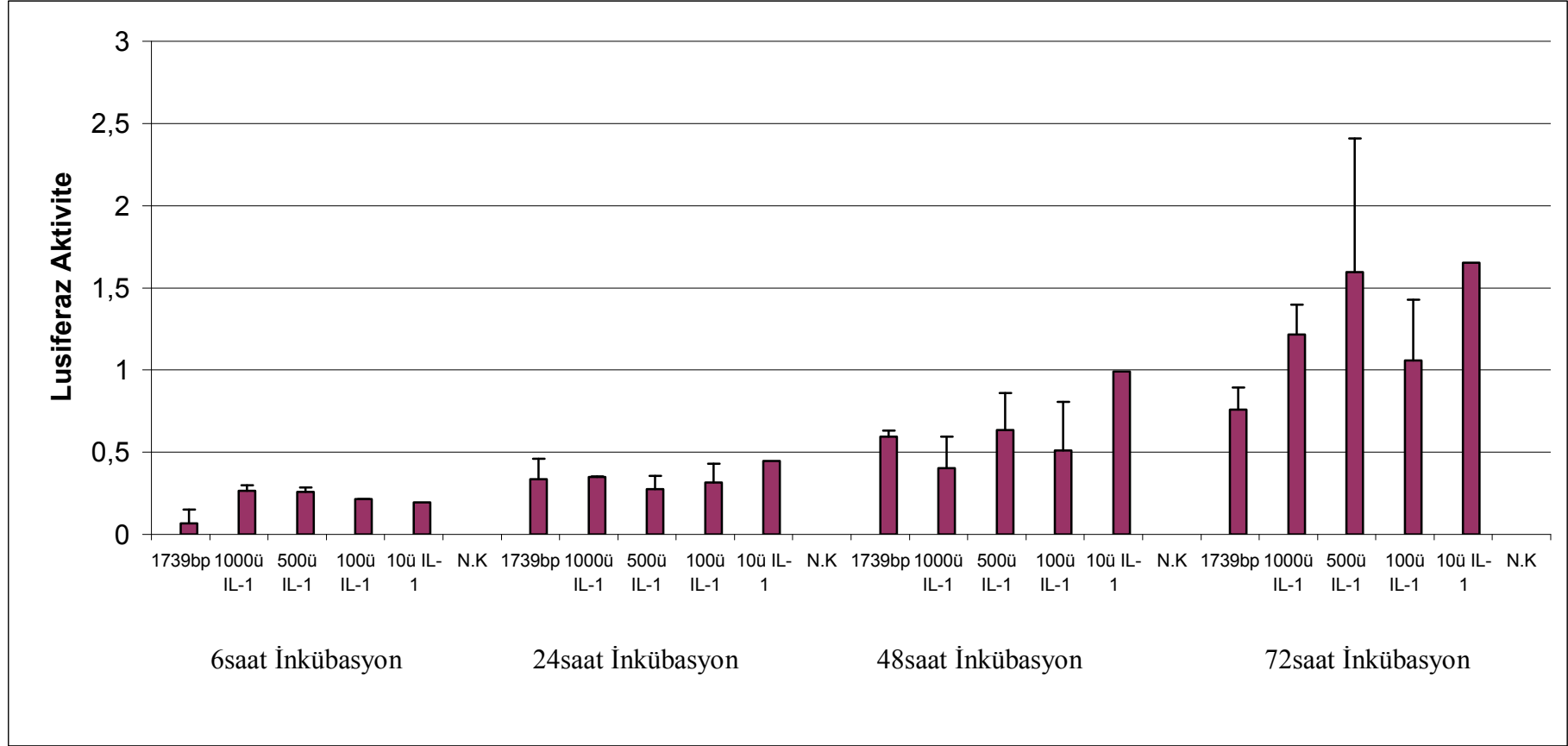
Şekil 3.19 IFN- $\delta$  sitokininin, 1739bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi, \* istatistiki olarak önemli olan  $p < 0.001$  değerlerini belirtmek için kullanılmıştır.



**Şekil 3.20.** IL-1 sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi.

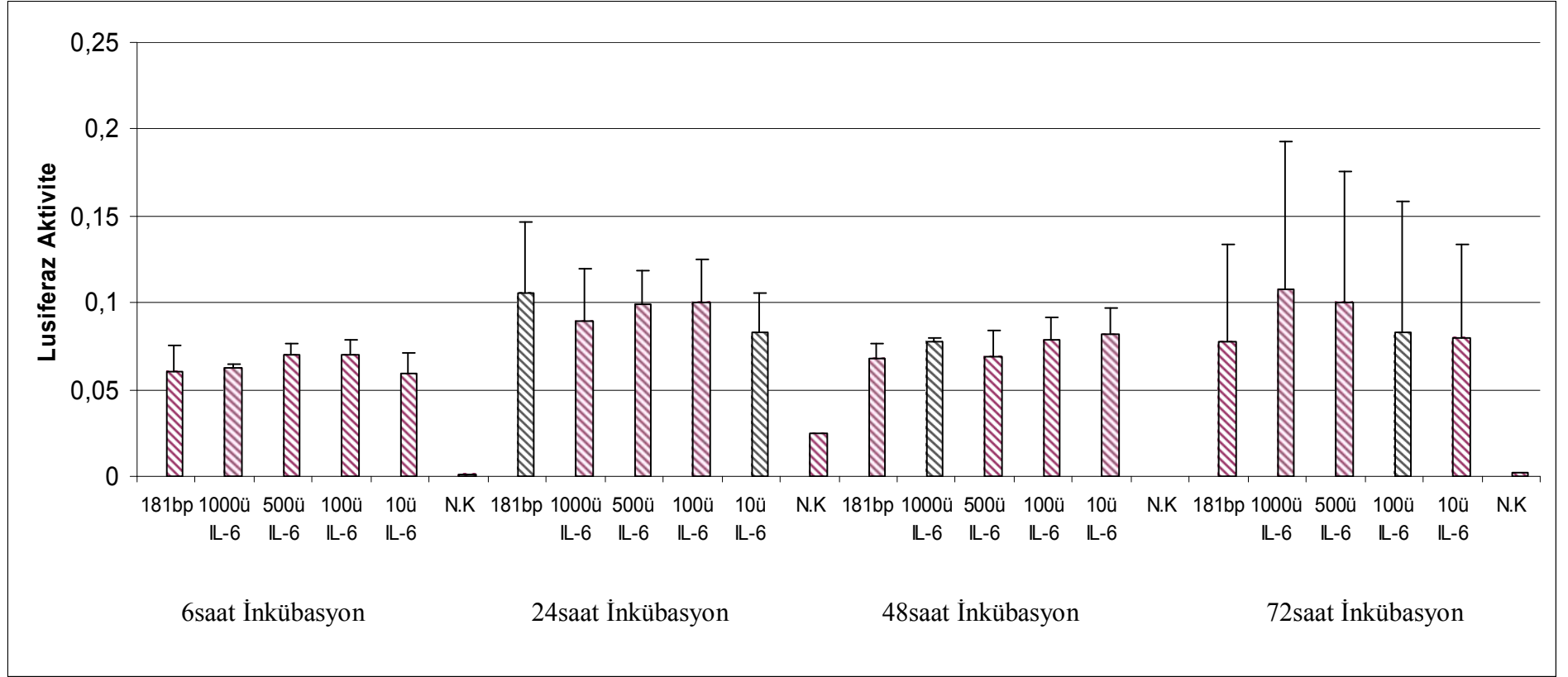


Şekil 3.21 IL-1 sitokininin, 760bp büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi

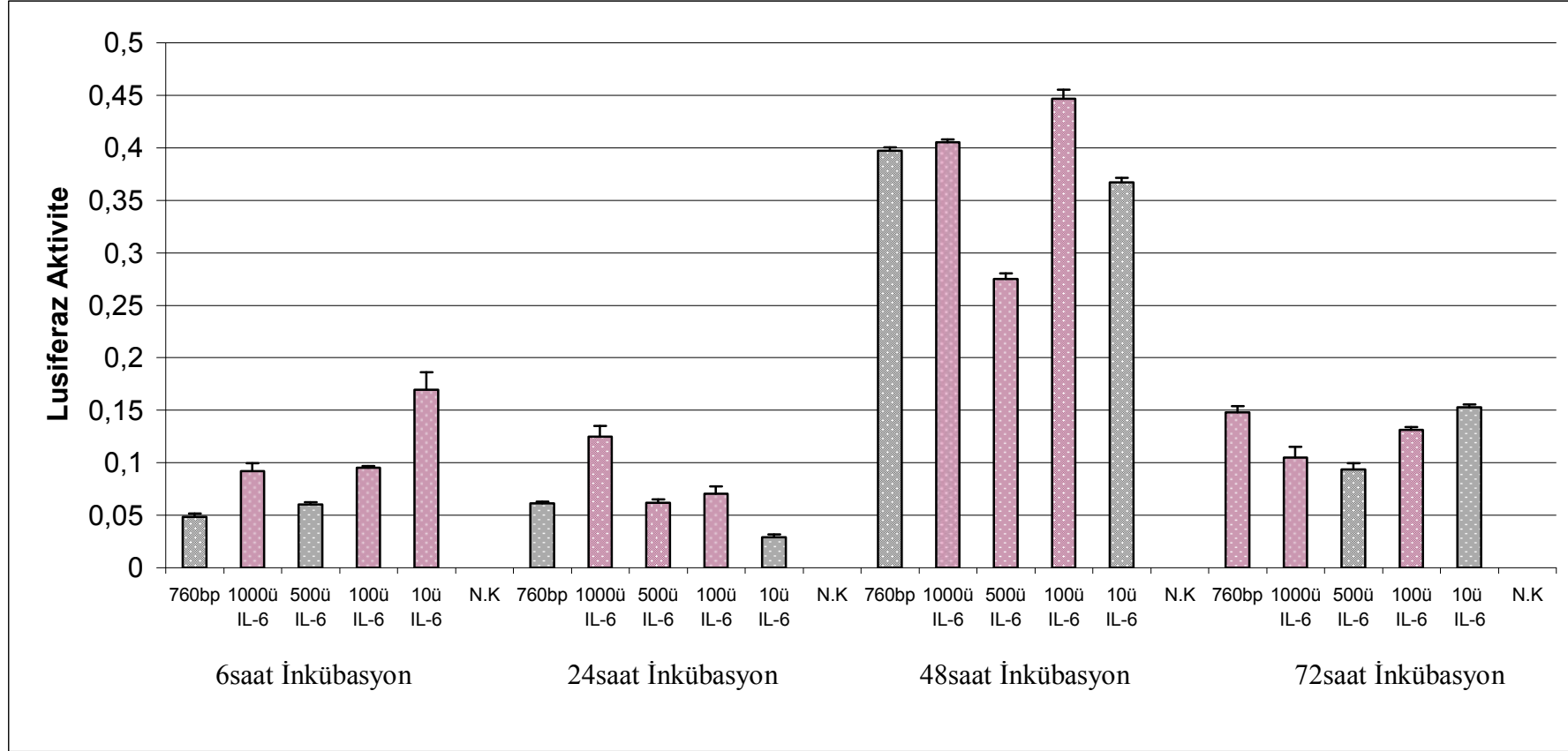


**Şekil 3.22** IL-1 sitokininin, 1739bç büyüklüğündeki C/EBPδ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi

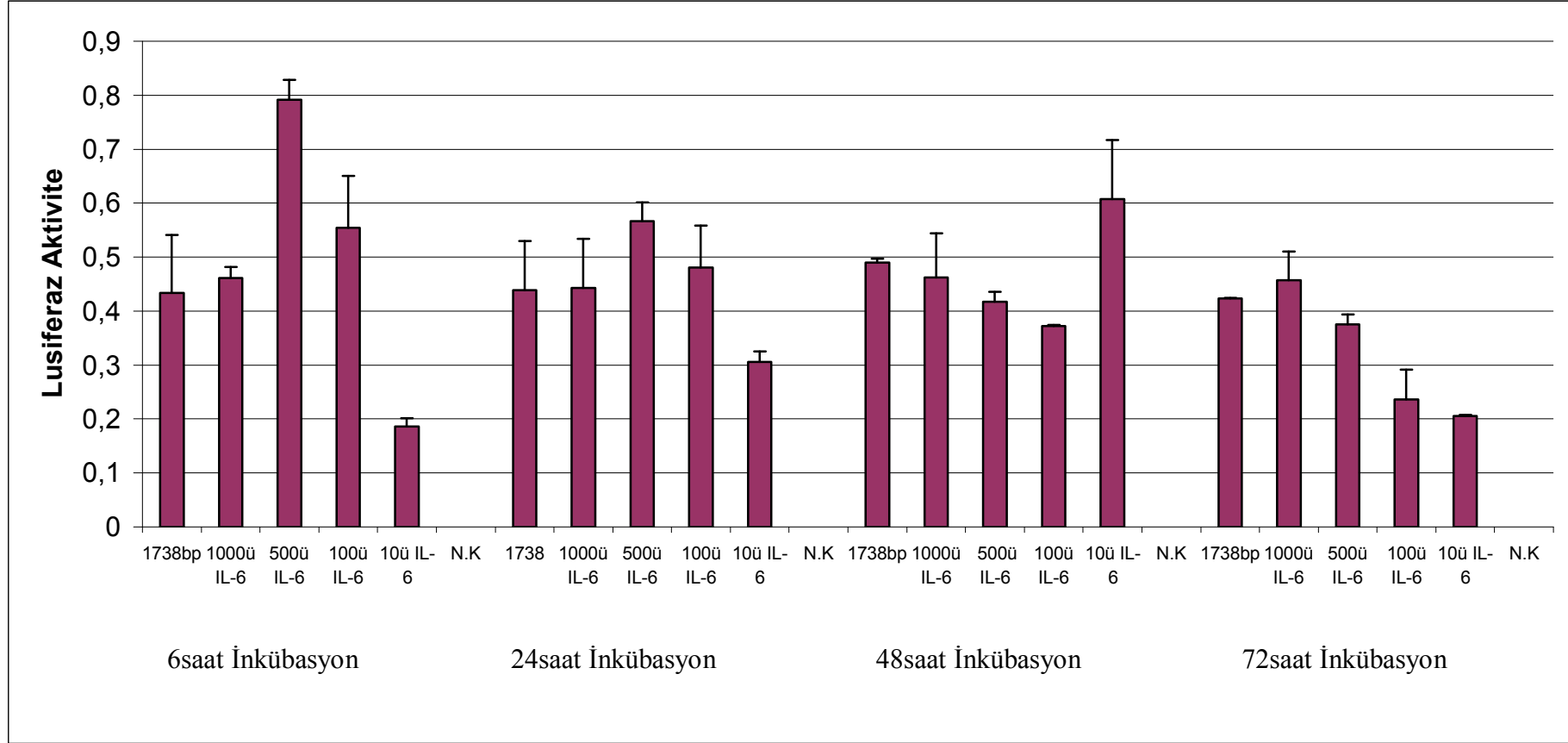




**Şekil 3.23.** IL-6 sitokininin, 181bç büyüklüğündeki C/EBPδ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi



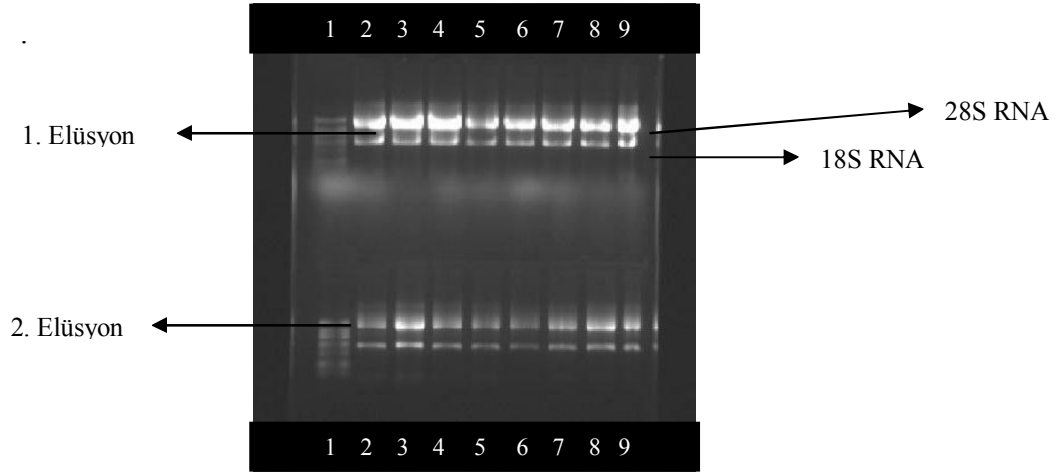
**Şekil 3.24** IL-6 sitokininin, 760bç büyüklüğündeki C/EBP $\delta$  promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi



Şekil 3.25 IL-6 sitokininin, 1739bç büyüklüğündeki C/EBPδ promotör plazmitinin ekspresyonuna olan etkisi

### 3.6. RT-PCR Çalışmaları

C/EBP $\delta$ 'nın mRNA seviyesindeki ekspresyon analizi RT-PCR çalışmaları ile belirlendi. RT-PCR çalışmaları, transfeksiyon uygulaması yapılmaksızın sitokinlerin Hep3B hücre hattı genomunda var olan C/EBP $\delta$  geninin ekspresyonuna olan etkisi aydınlatılmaya çalışıldı. RT-PCR çalışmasının ardından ise PCR yapılarak C/EBP $\delta$  geni amplifiye edildi. 2.2.6.1.'de anlatıldığı gibi kurulan RT-PCR deneyinin ardından sitokin muamelesi (tüm sitokinler 500U olacak şekilde uygulanmıştır) yapıldı. Sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s sonra RNA izolasyonu yapıldı ve 2.2.6.1.2.'de anlatıldığı gibi RNA miktar ve kalitesi saptandı. Temsili olarak RT-PCR çalışmaları kullanılmak üzere, IL-1 sitokini muamelesi sonrasında elde edilen total RNA örnekleri Şekil 3.26'da belirtilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri RT-PCR çalışmasında kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.



**Şekil 3.26.** 500U IL-1sitokini uygulandıktan sonra yapılan RNA izolasyonunun agaroz jel elektroferez görüntüsü. 1. RNA Low range marker, 2-9. Farklı zaman aralıklarında elde edilmiş RNA örnekleri.

RT-PCR çalışmasında kullanılacak RNA örneklerinin aynı miktarda olmasına dikkat edilerek çizelge 2.12'de belirtilen şartlarda RT-PCR ilk aşaması yapıldı ve ardından 2.13'de belirtilen ikinci aşamaya geçildi. RT-PCR sonrası elde edilen cDNA örnekleri PCR çalışmasında kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

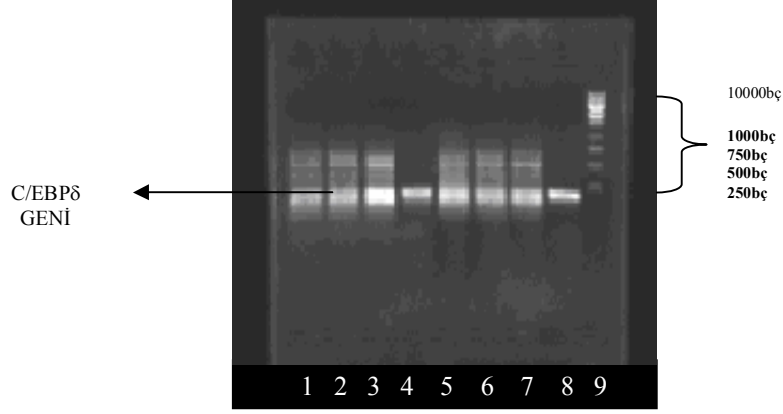
### 3.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

PCR çalışmasında, C/EBP $\delta$  geni için dizayn edilmiş primerler kullanılarak yaklaşık 200bp'lik C/EBP $\delta$  geni okuma çerçevesinde amplifiye edildi. Çizelge 3.2'de PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin dizisi, T<sub>m</sub> değeri ve uzunlukları belirtilmiştir. İlk PCR çalışmasında farklı konsantrasyonlarda MgCl<sub>2</sub> ve cDNA uygulanarak PCR optimize edildi (Şekil 3.27).

PCR çalışmalarında her hücrede aynı seviyede ekspres olma özelliğine sahip GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) geni PCR etkinliğinin ölçümüne olanak vermesi sebebiyle pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu sebeple GAPDH için özel dizayn edilmiş primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir.

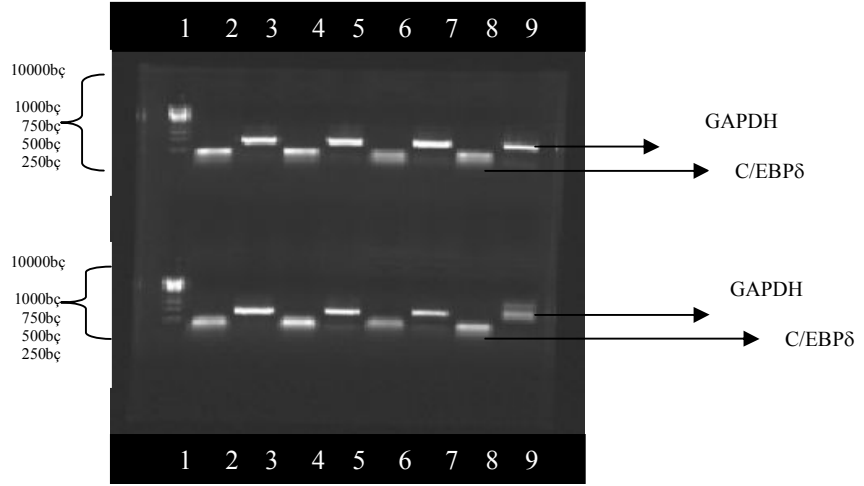
**Çizelge 3.2.** PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin dizisi, T<sub>m</sub> değeri ve uzunlukları

Primer	Uzunluk	T <sub>m</sub>	Dizisi
iC/EBP delta- F	20	62.45	AGAAGTTGGTGGAGCTGTCG
iC/EBP delta -R	20	62.45	GGTATGGGTCGTTGCTGAGT
iGAPDH -F	25	64.58	CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG
iGAPDH -R	23	66.33	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG



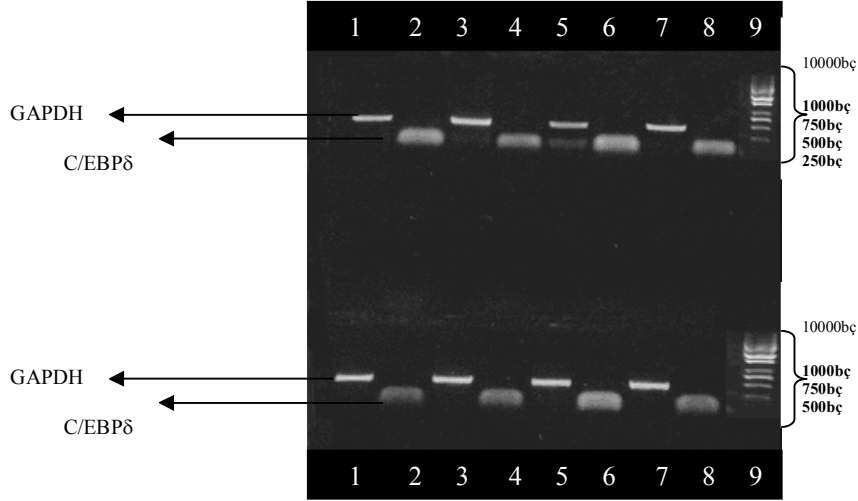
**Şekil 3.27.** PCR optimizasyon çalışmasının agaroz jel elektroforez görüntüsü. **1-** 4mM MgCl<sub>2</sub>, 2µL cDNA, **2-** 3mM MgCl<sub>2</sub>, 2µL cDNA, **3-** 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2µL cDNA, **4-** 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2µL cDNA, **5-** 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1µL cDNA, **6-** 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1µL cDNA, **7-** 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1µL cDNA, **8-** 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1µL cDNA, **9-** 1kb marker,

C/EBP $\delta$  geninin amplifiye edilmesinde en uygun şartların saptanabilmesi için elde edilen RNA örneklerinden yalnızca biri kullanılarak farklı koşullar altında PCR çalışması yapıldı. Değiştirilen parametreler, MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ve cDNA miktarı iken, diğer tüm parametreler sabit tutuldu. 2.2.6.4.1.'de anlatılan PCR içeriği ve PCR şartları kullanıldı. Şekil 3.27'de gösterildiği gibi 4. ve 8. örneklerde tek bir bant şeklinde C/EBP $\delta$  geni amplifiye edilebildi böylece PCR çalışmaları için en uygun koşullar saptanmış oldu. Bundan sonraki PCR çalışmaları 1mM MgCl<sub>2</sub> ve 1µL cDNA olmak üzere Çizelge 2.14'deki parametreler kullanılarak yapıldı.



**Şekil 3.28.** IL-1 sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$  mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **Üst** 1- 1 kb marker 2- 6s ink kontrol grubu, 3- 6s ink kontrol grubu için GAPDH, 4- 6s ink deney grubu, 5- 6s ink deney grubu için GAPDH, 6- 24s ink kontrol grubu, 7- 24s ink kontrol grubu için GAPDH, 8- 24s ink deney grubu, 9- 24s ink deney grubu için GAPDH, **Alt** 1-1kb marker 2- 48s ink kontrol grubu, 3- 48s ink kontrol grubu için GAPDH, 4- 48s ink deney grubu, 5- 48h ink deney grubu için GAPDH, 6- 72s ink kontrol grubu, 7- 72s ink kontrol grubu için GAPDH, 8- 72s ink deney grubu, 9- 72h ink deney grubu için GAPDH (Kontrol Grubu; sitokin uygulanmayan hücreler, Deney Grubu; sitokin uygulanan hücreleri temsil etmektedir.)

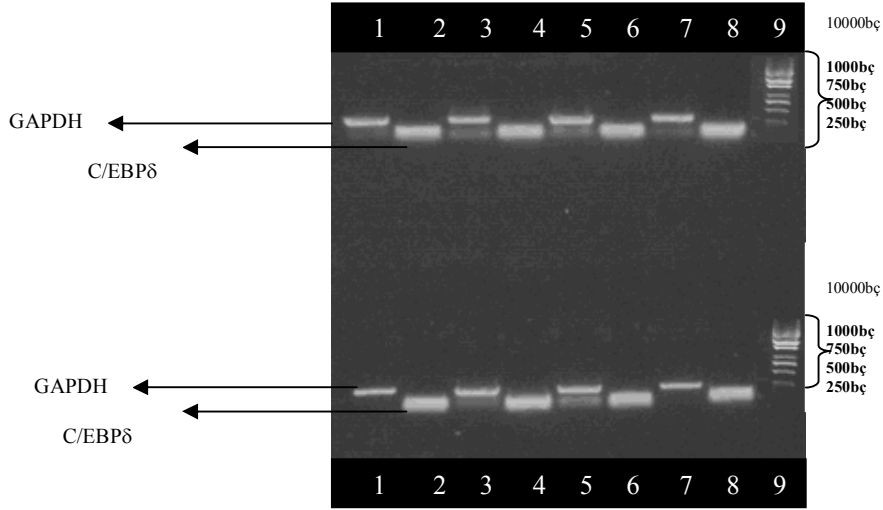
500U IL-1 sitokini uygulanan Hep3B hücreleri, sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında sırasıyla; RNA izolasyonu, RT-PCR ve PCR çalışmalarına tabi tutulmuştur. Şekil 3.28’de gözleendiği gibi 6s inkübasyon sonrasında kontrol ve deney grupları arasında ekspresyon seviyesinde bir fark gözlenmemektedir. 24s, 48s ve 72s inkübasyon sürelerinde ise deney (sitokin uygulanan) grupları kontrol (sitokin uygulanmayan) grupları ile kıyaslandığında bir artışın olduğu gözlenmektedir. Yapılan GAPDH amplifikasyonu ile birlikte densitometrik analiz yapılarak bu sonuçların doğrulanması gerekmektedir.



**Şekil 3.29.** IL-6 sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$  mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **Üst** ;1- 24s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 24s ink. deney grubu C/EBP $\delta$ , 3- 24s ink. kontrol grubu için GAPDH, , 4- 24s ink. kontrol grubu, 5- 6s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 6s ink. deney grubu, 7- 6s ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 6s ink. kontrol grubu, **Alt**; 1- 72s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 72h ink. deney grubu, 3- 72h ink. kontrol grubu için GAPDH, 4- 72s ink. kontrol grubu, 5- 48s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 48h ink. deney grubu, 7- 48h ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 48s ink. kontrol grubu, 9-1kb marker, (Kontrol Grubu; sitokin uygulanmayan hücreler, Deney Grubu; sitokin uygulanan hücreleri temsil etmektedir.)

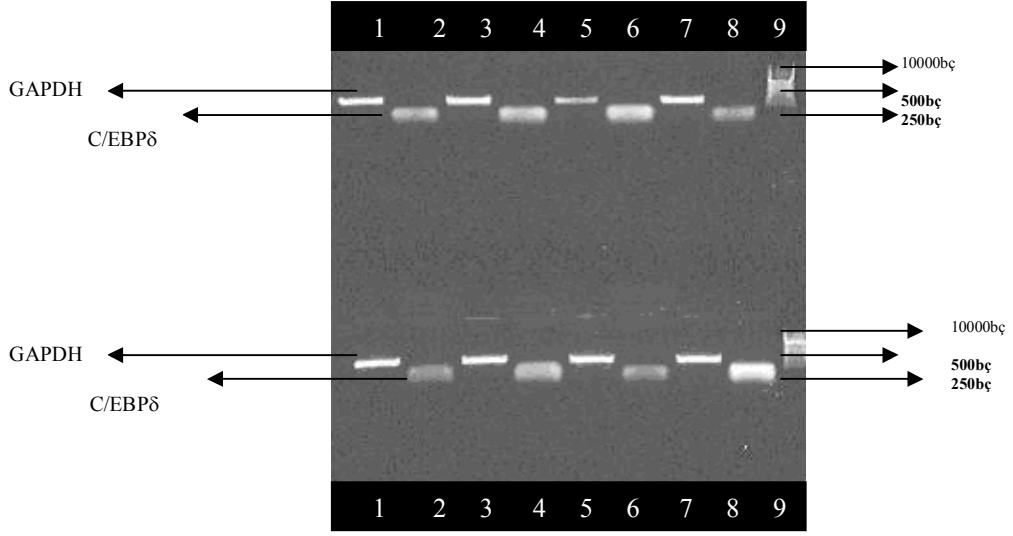
500U IL-6 sitokini uygulanan Hep3B hücreleri, sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında sırasıyla; RNA izolasyonu, RT-PCR ve PCR çalışmalarına tabi tutulmuştur. Şekil 3.29'da gözlemlendiği gibi 6s, 24s ve 48s sonrasında kontrol grupları (sitokin uygulanmayan) ile deney (sitokin uygulanan) grupları kıyaslandığında C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde dikkat çekici bir artışın olduğu gözlenmektedir. 72s inkübasyon süresi sonrasında ise deney ve kontrol grupları göz önüne alındığında ekspresyon seviyesinde dikkat çekici bir değişim olmadığı gözlenmektedir.





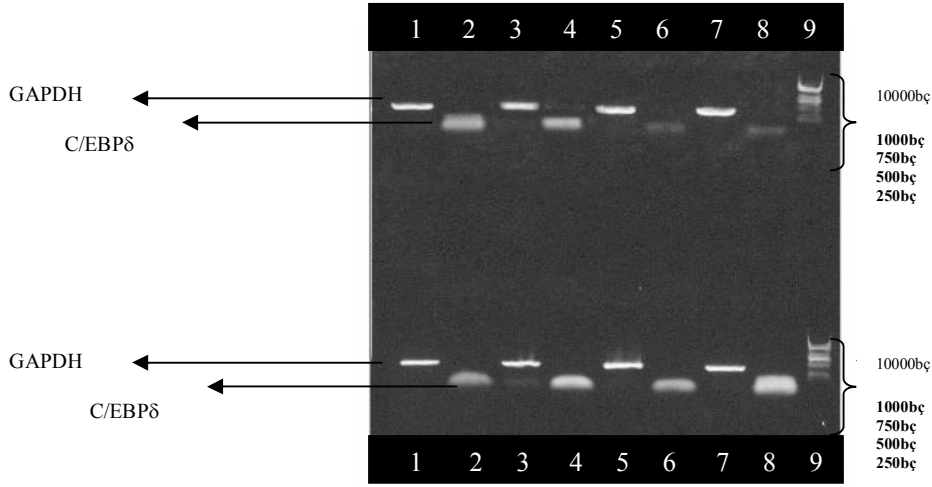
**Şekil 3.30.** TGF- $\beta$  sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$  mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **Üst** ;1- 24s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 24s ink. deney grubu C/EBP $\delta$ , 3- 24s ink. kontrol grubu için GAPDH, , 4- 24s ink. kontrol grubu, 5- 6s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 6s ink. deney grubu, 7- 6s ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 6s ink. kontrol grubu, **Alt**; 1- 72s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 72h ink. deney grubu, 3- 72h ink. kontrol grubu için GAPDH, 4- 72s ink. kontrol grubu, 5- 48s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 48h ink. deney grubu, 7- 48h ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 48s ink. kontrol grubu, 9-1kb marker, (Kontrol Grubu; sitokin uygulanmayan hücreler, Deney Grubu; sitokin uygulanan hücreleri temsil etmektedir.)

500U TGF- $\beta$  sitokini uygulanan Hep3B hücreleri, sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında sırasıyla; RNA izolasyonu, RT-PCR ve PCR çalışmalarına tabi tutulmuştur. Şekil 3.30'da gözlendiği gibi tüm inkübasyon süreleri için kontrol ve deney grupları arasında büyük bir fark gözlenmemektedir. Ancak densitometrik analiz sonucunda anlamlı bir sonuç alabileceğimiz kanısındayız.



**Şekil 3.31.** IFN- $\gamma$  sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$  mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **Üst**; 1- 24s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 24s ink. deney grubu C/EBP $\delta$ , 3- 24s ink. kontrol grubu için GAPDH, 4- 24s ink. kontrol grubu, 5- 6s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 6s ink. deney grubu, 7- 6s ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 6s ink. kontrol grubu, **Alt**; 1- 72s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 72h ink. deney grubu, 3- 72h ink. kontrol grubu için GAPDH, 4- 72s ink. kontrol grubu, 5- 48s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 48h ink. deney grubu, 7- 48h ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 48s ink. kontrol grubu, 9-1kb marker, (Kontrol Grubu; sitokin uygulanmayan hücreler, Deney Grubu; sitokin uygulanan hücreleri temsil etmektedir.)

500U IFN- $\gamma$  sitokini uygulanan Hep3B hücreleri, sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında sırasıyla; RNA izolasyonu, RT-PCR ve PCR çalışmalarına tabi tutulmuştur. Şekil 3.31’de gözlemlendiği gibi 6s inkübasyon süresi sonucunda deney ve kontrol grupları dikkate alındığında C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde dikkat çekici bir artışın varlığı gözlenmektedir. 24s, 48s ve 72 s inkübasyon deney ve kontrol grupları dikkate alındığında ise tam aksine C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir azalışın varlığı bantların parlaklığının kıyaslanması sonucunda gözlenmektedir.



**Şekil 3.32.** TNF- $\alpha$  sitokini uygulanması sonucu, C/EBP $\delta$  mRNA seviyesindeki ekspresyon analizinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. **Üst** ;1- 24s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 24s ink. deney grubu C/EBP $\delta$ , 3- 24s ink. kontrol grubu için GAPDH, 4- 24s ink. kontrol grubu, 5- 6s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 6s ink. deney grubu, 7- 6s ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 6s ink. kontrol grubu, **Alt**; 1- 72s ink. deney grubu için GAPDH, 2- 72h ink. deney grubu, 3- 72h ink. kontrol grubu için GAPDH, 4- 72s ink. kontrol grubu, 5- 48s ink. deney grubu için GAPDH, 6- 48h ink. deney grubu, 7- 48h ink. kontrol grubu için GAPDH, 8- 48s ink. kontrol grubu, 9-1kb marker, (Kontrol Grubu; sitokin uygulanmayan hücreler, Deney Grubu; sitokin uygulanan hücreleri temsil etmektedir.)

500U TNF- $\alpha$  sitokini uygulanan Hep3B hücreleri, sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında sırasıyla; RNA izolasyonu, RT-PCR ve PCR çalışmalarına tabi tutulmuştur. Şekil 3.31’de gözlemlendiği gibi, 6s inkübasyon süresi sonucunda C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlenmemiştir. 24s inkübasyon sonrasında ise C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir artışın olduğu, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonucunda ise tam aksine C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir azalma söz konusudur.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Hücre kültürü temelli model sistemler kullanılarak, C/EBP ailesinin hedef genlerinin, promotör bölgelerinin analizi, C/EBP ekspresyonlarının indüklenmesi ve inhibe edilmesi gibi yapılan farklı çalışmalarda, C/EBP ailesinin işlevi hakkında yeterli olmasa da epeyce bilgi sağlanmıştır. C/EBP proteinlerinin tanımlanmış temel fonksiyonları; hücrel farklılaşma, bağışıklık ve enfeksiyon sürecinde çeşitli hastalıklara karşı verilen hücrel cevabın oluşturulması karaciğer yenilenmesi, hücrel metabolizma, hücreler arası iletişim gibi önemli yaşamsal fonksiyonlardır [36]. Bunların yanı sıra, son on yıl içerisinde yapılan çalışmalarda; hücrelerde proliferasyon, farklılaşma, apoptosis, metabolizmanın kontrolü ve spesifik genlerin regülasyonu gibi işlevlerin sürdürülmesinde C/EBP'lerin çok önemli bir yeri olduğunu gösterilmiştir.

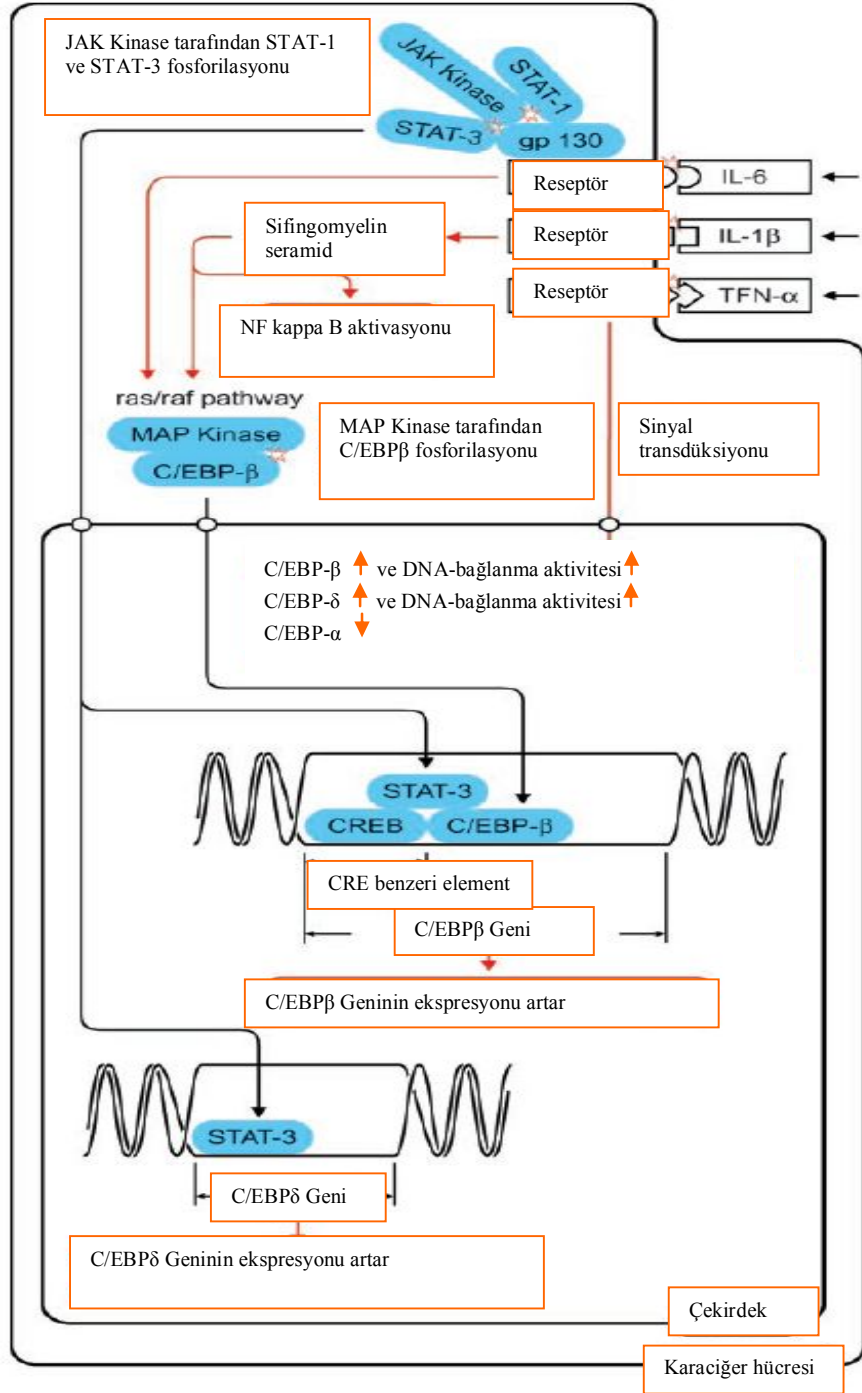
C/EBPδ'nın, meme epitel hücrelerinin apoptosisinde, hücre proliferasyonunda, yağ doku farklılaşmasında, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ve hepatositlerde akut faza cevapta önemli rol oynadığı bilinmektedir. C/EBPδ gen haritası 8. kromozomdadır. İnsan kanserlerinin çoğu kromozom 8p'de var olan mutasyonlar sebebiyle olmaktadır [100]. Bu sebeptendir ki C/EBPδ son çalışmalarda bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmaktadır. Bunlara ilave olarak C/EBPδ geninin, alzheimer hastalığı patolojisinde, prostat kanseri, apoptosiz, hücrel farklılaşma ve embriyonik gelişim gibi önemli fonksiyonlara sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [101-119].

İnflamasyon; doku yaralanmaları, travma, enfeksiyon ve doku hasarlarının dahada artmaması ve onarım mekanizmalarının aktive edilmesi gibi durumları kapsayan fiziksel bir cevaptır. İnflamasyonun erken safhalarında çoğu organda, APR (acute-phase response) olarak bilinen, metabolik ve katabolik değişimler meydana gelir. APR özellikle akciğerden sentezlenen birçok serum akut faz proteinlerinin değişimleri ile karakterize edilmiştir. APR meydana geldikten kısa bir süre sonra birçok akut faz proteinlerinin serumdaki konsantrasyonu 1000 kat kadar artmıştır[124]. Söz konusu bu durumda C/EBPδ konsantrasyonunda akut faz proteinleri kadar arttığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Akut faz genlerinin

hepatositlerdeki aktivasyonu IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , gibi sitokinleride içeren birçok inflamasyon sinyalleri tarafından tetiklenmektedir [125]. Bu sitokinler akut faz genlerinin aktivasyonundan doğrudan sorumlu olabildikleri gibi bu sitokinlerin önce C/EBP'lerin ekspresyonunu arttırdığı ve ekspre edilen bu C/EBP'lerinde akut faz proteinlerini dolaylı yoldan aktive ettiği tespit edilmiştir [126].

Hepotositlerde akut faza cevap (APR) esnasında, IL-6 bağlı C/EBP $\delta$  transkripsiyonu için STAT-3 bağlanma bölgesine ihtiyaç vardır [129]. APR esnasında STAT-3 bağımlı C/EBP $\delta$  ekspresyon seviyesi uzunca bir periyot devam etmesine rağmen, STAT-3 ün aktivitesi geçici olmaktadır [130]. C/EBP $\delta$ 'nın ekspresyon seviyesi uzun olması otoaktivasyon sayesinde [131]. Fare, sıçan ve koyun C/EBP $\delta$  promotöründe yapılan analizler otoregülasyonun türden türe farklı mekanizmalar ile yürütüldüğü gibi şaşırtıcı sonuçlar elde edilmiştir [131]. Yapılan otoregülasyon çalışmalarında C/EBP $\delta$  promotör bölgesinin yukarı bölgesinin 6kb yukarısında otoregülasyon gözlenmiştir, fakat genin 3' ucunda iki C/EBP tanıma bölgesine ihtiyaç duymaktadır [132]. Buna karşı, fare ve koyun C/EBP $\delta$  geninin 5' ucu otoaktivasyon için yeterlidir [133]. Koyun promotöründe ise varsayılan C/EBP tanıma dizisi içermemektedir [131]. Dolayısıyla insan C/EBP $\delta$  insan C/EBP $\alpha$  genine benzeyebilmekte, o da indirek otoregülasyona sebep olabilmektedir [134].

Prostat kanser hücre hattı olan LNCaP ile yapılan çalışmalarda IL-6 sitokininin C/EBP $\delta$  geninin ekspresyonuna olan etkisi araştırılmış ve C/EBP $\delta$  promotöründe, STAT transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinin varlığı mutasyonel çalışmalarla tespit edilmiştir. Bazı sitokinlerin, C/EBP'lerin transkripsiyonel regülasyonuna olan etkisi bir model üzerinde açıklamak gerekirse; Şekil 4.1'de görüldüğü gibi IL-1, IL-6, ve TNF $\alpha$  sitokinleri karaciğer hücre zarında var olan ve her sitokin için spesifik olan reseptörlere tutunarak hücre içi sinyal iletimini başlatırlar. IL-6 sitokini STAT-JAK kinaz yolağını aktive ederek C/EBP $\delta$  promotöründe var olan STAT bağlanma bölgesine STAT transkripsiyon faktörünün bağlanmasını tetikler ve buna bağlı olarak C/EBP $\delta$  ekspresyonu arttırılmaktadır.



**Şekil 4.1** Bazı sitokinlerin C/EBP genlerinin ekspresyonlarını düzenleme modeli

[146]

Bu çalışmanın amacı, insan C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel aktivitesi konusunda var olan bilgilerin üzerine, biraz daha bilgi eklemektir. C/EBP $\delta$  promotörü 1739bç'lik kısmı 760bç ve 181bç olmak üzere 5' delesyon çalışmaları yapılmış ve ardından bazal promotör aktivitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla elde edilen 5' delesyon mutant promotör parçaları geçici transfeksiyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. Geçici transfeksiyon çalışmalarında hücre modeli olarak insan hepatoma hücre hattı (Hep3B) kullanılmıştır. Bu hücre hattının seçilmesinin nedeni C/EBP genlerinin transkripsiyonel regülasyonunun aydınlatılması amaçlı çok sayıda çalışmada kullanılıyor olmasıdır [5]. Geçici transfeksiyon çalışmalarında, 3 metot denenmiş, relatif lusiferaz aktivitesi en iyi tespit edilen kalsiyum fosfat transfeksiyon metodu transfeksiyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

Bazal lusiferaz aktiviteleri 181 bç'lık en küçük promotörün aktivitesinin transkripsiyonel aktivite için yeterli olmasına rağmen transkripsiyonel aktivitenin 1739bç'lık kısmına kadar çıkan bölgenin daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Buda bize transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesi için promotörün yukarı bölgelerinin de önemli olduğunu göstermektedir.

Çalışmalarımızda C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel aktivitesinin sitokinler tarafından ne şekilde etkide bulunduğunu araştırmak amacıyla, IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve TGF- $\beta$  sitokinleri uygulanmıştır. Bu sayede sitokinlerin C/EBP $\delta$  geninin ekspresyonuna olan etkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bunun için farklı C/EBP $\delta$  promotör fragmentleri transfekte edilerek, farklı sitokinler farklı konsantrasyonda ve farklı zaman aralıklarında uygulanmıştır.

Buna göre sitokinlerin farklı promotör fragmentlerini farklı bir şekilde kontrol ettiği belirlenmiştir (çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1.** İstatistiksel olarak değerlendirilen verilerin şematik olarak gösterimi; ( ↓ ) transkripsiyonel aktivitenin azaldığını, ( ↑ ) transkripsiyonel aktivitenin arttığını, ( — ) transkripsiyonel aktivitenin değişmediğini göstermektedir.

sitokinler	181bç promotör fragmenti	760bç promotör fragmenti	1739bç promotör fragmenti
1000U IL-1	—	72s ink. ↓	72s inkübasyon ↑
500U IL-1	—	72s ink. ↓	—
100U IL-1	—	72s ink. ↓	—
10U IL-1	—	72s ink. ↓	72s ink. ↑
1000U TGF-β	24s,48s,72s ink. ↑	24s,48s,72s ink. ↑	24s,48s,72s ink. ↑
500U TGF-β	24s,48s,72s ink. ↑	24s,48s,72s ink. ↑	24s,48s,72s ink. ↑
100U TGF-β	24s,48s,72s ink. ↑	24s,48s,72s ink. ↑	24s,72s ink. ↑
10U TGF-β	—	24s,48s ink. ↑	24s ink. ↑
1000U TNF-α	.72s ink. ↑	6s ink. ↓	48s ink. ↑
500U TNF-α	48s ink. ↑	6s ink. ↓	—
100U TNF-α	—	—	—
10U TNF-α	—	—	—
1000U IL-6	—	6s ink. ↑	6s ink. ↑
500U IL-6	—	—	6s ink. ↑
100U IL-6	—	6s ink. ↑	—
10U IL-6	—	6s ink. ↑	—
1000U IFN-γ	—	—	6s,72s ink. ↑
500U IFN-γ	—	—	—
100U IFN-γ	—	—	—
10U IFN-γ	—	—	48s ink. ↑



Geçici transfeksiyon ve ardından sitokin uygulamaları sonucunda, TGF- $\beta$  sitokini C/EBP $\delta$  transkripsiyonel regülasyonunda en etkili sitokin olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonda muamele edilen TGF- $\beta$  sitokininin muamelesinden 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonucunda, C/EBP $\delta$  geninin ekspresyonunda büyük oranda bir artış olduğunu tespit edilmiştir. Ancak sitokin muamelesinden 6s inkübasyon süresi sonrasında ekspresyon seviyesinde bir etki tespit edilememiştir. Yine TGF- $\beta$  sitokininin uygulanan 10U, 100U konsantrasyonları, 1000U ve 500U'lik konsantrasyonlara kıyaslandığında regülasyona olan etkilerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu gibi çalışmalarda öncelikle gen regülasyonuna etkili olabilecek en uygun konsantrasyonun tespiti gerekmekte ve ardından sitokinin etki süresinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan diğer sitokin olan IL-6'in 6 saatlik zaman diliminde transkripsiyonel regülasyonu arttırdığı (çizelge 4.2.) tespit edilmiştir. Diğer zaman aralıklarında belirgin bir artış istatistiki olarak tespit edilmemiştir. IL-6'nın insan prostat kanser hücre hattı olan LNCaP hücrelerinde, Go fazında C/EBP $\delta$  pozitif yönde regüle ettiği diğer çalışmalarda belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda IL-6'nın regülasyonunun tam olarak belirlenmesi için farklı zaman aralıklarında inkübasyonunun genişletilmesi gerekmektedir. Sitokin uygulamalarında uygulanan doz kadar, farklı zaman aralıklarında regülasyonuna olabilecek etkisinin gözlenmesi için gereklidir.

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, farklı zaman aralıklarında ve dozlarda uygulanan sitokinlerin C/EBP $\delta$  ekspresyonu farklı şekillerde etkilediği görülmektedir. Bu sonuçlar standart sapmalarının dikkate alındığı istatistiki analizle değerlendirilmiştir.

Çalışmalarımızda sitokinlerin Hep3B hücrelerinde var olan C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonuna olan etkisinin araştırılması amacıyla, Hep3B hücreleri üzerine belirlenen dozajlarda sitokin uygulanan hücreler, sitokin muamelesinden 6s, 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında sırasıyla; RNA izolasyonu, RT-PCR ve PCR çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu çalışmalar sayesinde Hep3B hücreleri genomunda var olan C/EBP $\delta$  genin ekspresyonundaki değişimler saptanmıştır. Sitokinlerin

C/EBP $\delta$  genin ekspresyonuna olan etkileri, transfeksiyon çalışmalarına oranla daha net gözlenmiştir.

IFN- $\gamma$  sitokini uygulanan hücrelerde, 6s inkübasyon süresi sonucunda deney ve kontrol grupları dikkate alındığında C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde dikkat çekici bir artışın varlığı gözlenmektedir. 24s, 48s ve 72 s inkübasyon deney ve kontrol grupları dikkate alındığında ise tam aksine C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir azalışın varlığı bantların parlaklığının kıyaslanması sonucunda gözlenmektedir.

IL-1 sitokini uygulanan hücrelerde, 6s inkübasyon sonrasında kontrol ve deney grupları arasında ekspresyon seviyesinde bir fark gözlenmemektedir. 24s, 48s ve 72s inkübasyon süreleri sonrasında ise deney (sitokin uygulanan) grupları, kontrol (sitokin uygulanmayan) grupları ile kıyaslandığında bir artışın olduğu gözlenmektedir.

IL-6 sitokini uygulanan hücrelerde, 6s, 24s ve 48s sonrasında kontrol (sitokin uygulanmayan) grupları ile deney (sitokin uygulanan) grupları kıyaslandığında C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde dikkat çekici bir artışın olduğu gözlenmektedir. 72s inkübasyon süresinin sonrasında ise ekspresyon seviyesinde farklılık olmadığı deney ve kontrol gruplarının oluşturduğu bantların parlaklıklarından anlamak mümkün olmuştur.

TNF- $\alpha$  sitokini uygulanan hücrelerde, 6s inkübasyon süresi sonucunda C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlenmemiştir. 24s inkübasyon sonrasında ise C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir artışın olduğu, 48s ve 72s inkübasyon süresi sonucunda ise tam aksine C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesinde bir azalma söz konusudur.

TGF- $\beta$  sitokini uygulanan hücrelerde, tüm inkübasyon süreleri için kontrol ve deney grupları arasında büyük bir fark gözlenmemektedir.

Yapılan tüm RT-PCR çalışmalarında, elde edilen bantların yoğunluğunun değerlendirilmesi için GAPDH, kontrol (sitokin uygulanmayan) ve deney (sitokin uygulanan) gruplarının bir arada kıyaslanabilmesine olanak veren densitometrik analizin yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada insan C/EBP $\delta$  geninin transkripsiyonel regülasyonunun belirlenmesi amacıyla; farklı sitokinlerin C/EBP $\delta$  gen promotörüne olan etkileri geçici transfeksiyon çalışmaları ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Aynı zamanda bu sitokinlerin Hep3B hücre genomunda var olan C/EBP $\delta$  geninin ekspresyonuna olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla da RT-PCR çalışmaları yapılarak mRNA düzeyinde belirlenmiştir.

Tıbbi açıdan önem teşkil eden böylesi genlerin regülasyon çalışmaları sayesinde bir çok hastalık için yeni teröpatik stratejiler geliştirilebilecektir. Örneğin; C/EBP $\delta$  geninin ekspresyon seviyesindeki azalmaya bağlı olabilecek bazı hastalıkların tedavilerinde, çalışmamızda tespit ettiğimiz konsantrasyonlarda TGF- $\beta$  sitokini uygulaması kullanılabilir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Marians, K.J. ,Prokaryotic DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.* (1992) **61**, 673–719
- [2] Moss, B. Regulation of Vaccinia virus Transcription. *Annu. Rev. Biochem.*, (1990) **59**, 661–88.
- [3] Nikolov, D.B. and Burley , S.K.*Proc.Natl. Acad.Sci.USA.*(1997) **94**,15-22
- [4] William S.Klug, Michael R. Cummings Concepts of GENETICS 6<sup>th</sup> Edition (2002)
- [5] Tura Kockar F., ‘Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene’, PH. D. Thesis Cardiff School of Biosciences, Cardiff University (1999)
- [6] Wolffe, A., In *Chromatin: Structure And Function* (2<sup>nd</sup> Edn.), Academic Pres London. (1995)
- [7] Latchman, D. S. In *Eukaryotic Transcription Factors*, Academic Press, London, (1998)
- [8] Zawell, L. And Reinberg, D., *Annu. Rev.Biochem.*, (1995) **62**,161-190.
- [9] Roeder, R.G. *Trends Biochem. Sci.*, (1996) **21**,327-334.
- [10] Ham, J., Steger, G And Yaniv. M. *Febs Lett.* (1992) **307**, 81-86.
- [11] Maniatis,T., Fritsch, E.F. And Sambrook, J. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York (1982)
- [12] Latchman, D.S. In *Eukaryotic Transcription Factors*, Academic Pres, London. (1998)
- [13] Bjorlund, S. And Kim, Y.J. *Trends Biochem. Sci.* (1996) **21**,335-337.
- [14] Ogbourne, S. And Antalis, T.M. *Biochem J.* (1998) **331**,1-14.
- [15] Kamakaka, R. T. *Trends Biol. Sci.* (1997) **22**, 124-127
- [16] G, E, Davies. *C/ebp Delta Gene* October PhD Thesis. Cardiff university,(1999)
- [17] Van Holde, K.E. *Biochemistry.* The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. (1990)
- [18] Pabo, C.O. *Protein–DNA Recognition. Annu. Rev. Biochem.* (1984) **53**, 293–

321.

- [19] Von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D., McSwiggen, J.A. 'Protein–Nucleic Acid Interactions in Transcription: a Molecular Analysis'. *Annu. Rev. Biochem.* (1984) **53**, 389–446.
- [20] Harrison, S.C. *Nature*. (1991) **353**,715-719.
- [21] Paba, C. And Sauer, R.T. *Annu.Rev.Biochem.* (1992) **61**, 1053-1095.
- [22] Traver , A. *Dna-Protein Interactions*, Chapman And Hall, London. (1993)
- [23] Mitchell, P.J. And Tjian, *Science*, (1989) **245**,371-378.
- [24] Triezenberg, S.J. *Curr. Opinion Genet. Dev.* (1995) **5**. 190-196.
- [25] Marcu, K.B., Bossone, S.A., Patel, A.J. 'Myc Function and Regulation.' *Annu. Rev. Biochem.* (1992) **61**, 809–60.
- [26] Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. 'The leucine zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA–Binding Proteins' *Science*, (1988) **240**, 1759–1762.
- [27] Johnson, F.F., McKnight, S.L. 'Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins'. *Annu. Rev. Biochem.* (1989) **58**, 799–839.
- [28] Radetsky, P. 'The Homeobox. From Egg to Adult, a Report from the Howard Hughes' *Medical Institute*, 55 pp. (1991)
- [29] Coverley, D., Laskey, R.A. 'Regulation of Eukaryotic DNA Replication'. *Annu. Rev. Biochem.* (1994) **63**, 745–76.
- [30] Johnson, P. F. and McKnight, S. L. 'Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins.' *Annu. Rev. Biochem.* (1989) **58**, 799-839
- [31] Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J. and McKnight, S. L. 'Isolation of a Recombinant Copy of the Gene Encoding C/EBP'. *Genes Dev.* (1988) **2**, 786-800
- [32] Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. 'The DNA Binding Domain of the Rat Liver Nuclear Protein C/EBP is Bipartite.' *Science* (1989) **243**, 1681-1688
- [33] Vinson, C. R., Sigler, P. B. and McKnight, S. L. 'Scissors-grip Model for DNA Recognition by a Family of Leucine Zipper Proteins.' *Science* (1989) **246**, 911-916
- [34] Agre, P., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. 'Cognate DNA Binding Specificity Retained After Leucine Zipper Exchange Between GCN4 and

- C/EBP.' *Science* (1989) **246**, 922-926
- [35] Akira, S., Isshiki, H., Sugita, H., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. 'A Nuclear Factor for IL-6 Expression (NF-IL6) is a Member of a C/EBP family.' *EMBO J.* (1990) **9**, 1897-1906
- [36] Poli, V., Mancini, F. P. and Cortese, R. 'IL-6DBP, a Nuclear Protein Involved in Interleukin-6 Signal Transduction, Defines a New Family of Leucine Zipper Proteins Related to C/EBP.' *Cell* (1990) **63**, 643-653
- [37] Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. and Schibler, U. 'LAP, a Novel Member of the C/EBP Gene Family, Encodes a Liver-enriched Transcriptional Activator Protein.' *Genes Dev.* (1990) **4**, 1541-1551
- [38] Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. 'Regulated Expression of Three C/EBP Isoforms During Adipose Conversion of 3T3-L1 cells.' *Genes Dev.* (1991) **5**, 1538-1552
- [39] Antonson, P., Stellan, B., Yamanaka, R. and Xanthopoulos, K. G. 'A Novel Human CCAAT/enhancer Binding Protein Gene, C/EBPe, is Expressed in Cells of Lymphoid and Myeloid Lineages and is Localized on Chromosome 14q11.2 Close to the T-cell Receptor  $\alpha/\delta$  Locus.' *Genomics* (1996) **35**, 30-38
- [40] Williams, S. C., Cantwell, C. A. and Johnson, P. F. 'A Family of C/EBP Related Proteins Capable of Forming Covalently Linked Leucine Zipper Dimers in vitro.' *Genes Dev.* **5**, 1553-1567
- [41] Antonson, P. and Xanthopoulos, K. G. 'Molecular Cloning, Sequence, and Expression of the Human Gene Encoding CCAAT/enhancer Binding Protein a (C/EBPa).' *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995) **215**, 106-113
- [42] Katz, S., Kowenz-Leutz, E., Muller, C., Meese, K., Ness, S. A. and Leutz, A. 'The NF-M Transcription Factor is Related to C/EBPb and Plays a Role in Signal Transduction, Differentiation and Leukemogenesis of Avian Myelomonocytic Cells.' *EMBO J.* (1993) **12**, 1321-1332
- [43] Kousteni, S., Kockar, F. T., Sweeney, G. E. and Ramji, D. P. 'Characterization and Developmental Regulation of the *Xenopus laevis* CCAAT-Enhancer Binding Protein b Gene.' *Mech. Dev.* (1998) **77**, 143-148

- [44] Kinoshita, S., Akira, S. and Kishimoto, T. 'A Member of the C/EBP Family, NF-IL6b, Forms a Heterodimer and Transcriptionally Synergizes with NF-IL6.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) **89**, 1473-1476
- [45] Lekstrom-Himes, J. A. 'The Role of C/EBPe in the Terminal Stages of Granulocyte Differentiation.' *Stem Cells.* (2001) **19**, 125±133
- [46] Ron, D. and Habener, J. F. 'CHOP, a Novel Developmentally Regulated Nuclear Protein that Dimerizes with Transcription Factors C/EBP and LAP and Functions as a Dominant-negative Inhibitor of Gene Transcription.' *Genes Dev.* (1992) **6**, 439-453
- [47] CCAAT/Enhancer-Binding Protein 8 Gene Expression Is Mediated by APRF/STAT31 Tomoko Yamada, Kazuki Tobita, Shigehiro Osada, Tsutomu Nishihara, and Masayoshi Imagawa<sup>2</sup> Department of Environmental Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamada- Oka, Suita, Osaka 565 Received for publication, December 4, (1996)
- [48] Vinson, C. R., Sigler, P. B. and McKnight, S. L. 'Scissors-grip Model for DNA Recognition by a Family of Leucine Zipper Proteins.' *Science* (1989) **246**, 911-916
- [49] Agre, P., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. 'Cognate DNA Binding Specificity Retained After Leucine Zipper Exchange Between GCN4 and C/EBP.' *Science* (1989) **246**, 922-926
- [50] Tahirov, T. H., Inoue-Bungo, T., Morii, H., Fujikawa, A., Sasaki, M., Kimura, K., Shiina, M., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M. et al. Structural analysis of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFb. *Cell* (2001) **104**, 755-767
- [51] Johnson, P. F. 'Identification of C/EBP Basic Region Residues Involved in DNA Sequence Recognition and Half-site Spacing Preference.' *Mol. Cell. Biol.* (1993) **13**, 6919-6930
- [52] Chumakov, A. M., Grillier, I., Chumakova, E., Chih, D., Slater, J. and Koeffler, H. P. 'Cloning of the Novel Human Myeloid-cell-specific C/EBPe Transcription Factor.' *Mol. Cell. Biol.* (1997) **17**, 1375-1386
- [53] Ron, D. and Habener, J. F. 'CHOP, a Novel Developmentally Regulated

- Nuclear Protein that Dimerizes with Transcription Factors C/EBP and LAP and Functions as a Dominant-negative Inhibitor of Gene Transcription.’ *Genes Dev.* (1992) **6**, 439-453
- [54] Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. ‘the leucine zipper:a hypothetical structure common to a new class of DNA binding’ *Proteins.Science* (1988) **240**, 1759-1764.
- [55] Williams, S. C., Baer, M., Dillner, A. J. and Johnson, P. F. ‘CRP2 (C/EBPb) Contains A Bipartite Regulatory Domain That Controls Transcriptional Activation, DNA Binding And Cell Specificity.’ *EMBO J.* (1995) **14**, 3170-3183
- [56] Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G. ‘Biological Role Of The CCAAT/Enhancer-Binding Protein Family Of Transcription Factors’. *J. Biol. Chem.*(1998) **273**, 28545-28548
- [57] Buck, M., Zhang, L., Halasz, N. A., Hunter, T. and Chojkier, M. ‘Nuclear Export Of Phosphorylated C/Ebpb Mediates The Inhibition Of Albumin Expression By TNF-A’. *EMBO J.* (2001) **20**, 6712-6723
- [58] Ron, D. T. Chop And The Role Of Rna-Binding Proteins In Oncogenic Transformation. In:Rauscher Fj Iii, Vogt Pk, Editors.Chromosomal Translocations And Oncogenic Transkription Factors.Heidelberg, Germany:Springer. (1997) p.131-42.
- [59] Tenen dg. Abnormalities of the c/ebp alpha transcription factor :a major target in acute myeloid *Leukemia* (2001), **15**, 688-9
- [60] Halmos B, Huettner CS, Kocher O, Ferenczi K, Karp DD, Tenen DG. Down regulation and antiproliferative role of c/ebp  $\alpha$  in lung cancer. *Cancer Res.* (2002), **62**, 528-34
- [61] Vegasan V, Takeuchi s, Hofmann W.K, Ikeezoe T, Tavor S, Krug U, Fermin A.C., Heaney a, miller C.W Kooffler hp. c/ebp- $\beta$ , c/ebp- $\delta$  PU.1, AML1 genes;mutational analysis in 381 samples of hematopoietic and solid malignancies.*Leukemia Res* (2001), **26**, 451-7
- [62] Makoto, M., Masashi, M., Kiyoshi, T. ‘Ectopic Expression Of Chop (*Gadd153*) Induces Apoptosis In M1 Myeloblastic Leukemicells’ 1996 *Febs Letters* (1996) **395**, 143-147



- [63] Greenbaum, L. E., Li, W., Cressman, D. E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V. And Taub, R. 'CCAAT Enhancer-Binding Protein B Is Required For Normal Hepatocyte Proliferation In Mice After Partial Hepatectomy.' *J. Clin. Invest.* (1998) **102**, 996-1007
- [64] Cao ,Z ., Umek , R.M. and McKnight, S.L. *Genes and Dev*(1991).**5**,1538-1552.
- [65] Li, F., Rosenberg, E., Smith, C., Noterfrancesco, K., Reisher, S.R., Shuman, H. And Feinstein, S. *Am. J.physiol.* (1995) **269**, L241-L247.
- [66] Lee, Y. H., Sauer, B., Johnson, P. F. and Gonzalez, F. J. 'Disruption Of The C/Ebpa Gene In Adult Mouse Liver.' *Mol. Cell. Biol.* (1997) **17**, 6014-6022
- [67] Ramji,D.P., Cortese, R. and Ciliberto, G..'In acute-phase proteins:molecular biology, biochemistry and clinical applications.
- [68] Mackiewicz, A., Kushner, M.D. and Baumann, H. (edz). *Crc pres. Pp.* 365-395.
- [69] Cardinaux, J. R., Allaman, I. and Magistretti, P. J. 'Pro-Inflammatory Cytokines Induce The Transcription Factors C/Ebpb And C/Ebpd In Astrocytes.' *Glia* (2000) **29**, 91-97
- [70] Tengku-Muhammad, T. S., Hughes, T. R., Ranki, H., Cryer, A. and Ramji, D. P. 'Differential Regulation Of Macrophage CCAAT-Enhancer Binding Protein Isoforms By Lipopolysaccharide And Cytokines.' *Cytokine* (2000) **12**, 1430-1436
- [71] Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E. and Mori, M. 'Nitric-Oxide-Induced Apoptosis In Pancreatic B Cells Is Mediated By The Endoplasmic Reticulum Stress Pathway.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001) **98**, 10845-10850
- [72] Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E. and Mori, M. 'Targeted Disruption Of The Chop Gene Delays Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Diabetes.' *J. Clin. Invest.* (2002) **109**, 525-532
- [73] Gombart, A. F., Shiohara, M., Kwok, S. H., Agematsu, K., Komiyama, A. And Koeffler, H. P. 'Neutrophil-Specific Granule Deficiency : Homozygous Recessive Inheritance Of A Frameshift Mutation In The Gene Encoding Transcription Factor CCAAT/Enhancer Binding Protein-E.' *Blood*

- (2001) **97**, 2561-2567
- [74] Pabst, T., Mueller, B. U., Zhang, P., Radomska, H. S., Narravulu, S., Schnittger, S., Behre, G., Hiddemann, W. and Tenen, D. G. 'Dominant-Negative Mutations Of CEBPA, Encoding CCAAT/Enhancer Binding Protein-A (C/Ebpa), In Acute Myeloid Leukaemia.' *Nat. Genet.* (2001) **27**, 263-270
- [75] Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and Mcknight, S.L. *Science* (1989) **243**,1681-1688.
- [76] Szpirer, C., Riviere, M., Cortese, R., Nakamura, T., Islam, M.Q., Levan, G. And Szpirer, J. *Genomics*, (1992) **13**, 293-300.
- [77] Lin, F.T., *Proc. Natl. Acad.Sci. Usa.* (1994) **91**,L241-L247
- [78] Alam,T., An, M.R. and Papaconstantinou, J. (1992) *J.Biol. Chem.* **267**, 5021-5024
- [79] Alberini, C.M., Ghirardi, M., Metz, R. and Kandel, E.R. *Cell* (1994) **76**,1099-1114.
- [80] Jenkinsen, N.C., Gilbert, D.J., Cho, B. C., Strobel, M.C., Williams, S. C., Copeland, N.G. and Johnson, P.F. *Genomics*, (1995) **28**,333-336.
- [81] Cao, Z., Umek, R.M. and Mcknight, S.L. *Genes and dev.* (1991) **5**,1538-1552
- [82] Poli, V., Mancini, F.P. and Cortese, R. *Cell* (1990) **63**,643-653
- [83] Sabatakos, G., Kousteni, S., Cryer, A. and Ramji, D.P. *J. Animal. Sci.* (1998) **76**, 2953-2954
- [84] Baglia, L. A., Bowers, W.J. And Rudell, A. *Gene* (1997) **190**, 297-302.
- [85] Cooper , C. L., Berrier, A.L., Roman, C. And Calame, K.L. *J. Immunol.* (1994) **153**, 5049-5058
- [86] Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N. And Calame, K. *Nucl. Acids Res.* (1995) **23**, 4371-4377.
- [87] Sabatokos, G., Davies, G. E., Grosse, M., Cryer, A. And Ramji, D. P. *Biochem. J.* (1998) **15**, 205-210
- [88] Yamanaka, R., Barlow, C., Lekstrom-Himes, J., Castilla, L.H., Liu, P.P., Eckhaus, M.,Decker, T., Wynshaw-Boris, A. And Xanthopoulos, K. G. *Proc.Natl. Acad. Sci. Usa.* (1997) **94**, 13187-13192.
- [89] Fornece , A. J. J., Nebert, D. W., Hollander, M.C., Kuethy, J. D.,

- Papathanasiou, M., Fargnoli, J. And Holbrook, N. *J. Mol. Cell. Biol.* (1989) **9**, 4196-4203.
- [90] Park, J. S. ,Luethy, J.D., Wang, M. G., Fargnoli, J., Fornace, A. J. J., Mcbride, O.W. And Holbrook, N. J. *Gene* (1992) **116**, 259-267.
- [91] Carlston, S. G., Fawcett, T. W., Barlett, J. D., Nbernier, M. And Holbrook, N. J. *Mol.Cell.Biol.* (1993) **13**, 4736-4744.
- [92] Williams, S. C., Cantwell, C. A., And Johnson, P. F. ‘a Family Of C/EBP Related Proteins Capable Of Forming Covalently Linked Leucine Zipper Dimers In Vitro.’ *Genes Dev.* (1991). **5**:1553-1567.
- [93] Kageyama, R., Sasai, Y, And Nakanishi, S. ‘Moleculer Characterizationof Transcription Factors That Bind To The Camp Responsive Region Of The Substance P Precursor Gene.’ *J. Biol. Chem.* (1991) **266**:15525-15531.
- [94] Williams, S. C., Cantwell,C. A.and Johnson P. F. *Genes and Dev.* (1991) **5**, 1553-1567
- [95] C. B. J. M. Cleutjens, C. C. E. M. Van Eekelen ,H. Van Dekken, E.M.E. Smit, A.Hagemuer, M.J.Wagner, D.E. Wells, And J.Trapman ‘The Human C/EBPδ(CRP3/CELF) Gene: Structure and Chromosomal Localization’ *Genomics* (1992) **16**, 520-523.
- [96] Cherif, D., Julier, C., Delattre, O., Dere, J., Latrop, G. M., And Berger, R. ‘Simultaneous localization of cosmids and chorosome r-banding by fluorescence microscopy: application to regional mapping of human chromosome 11’ *.Proc. Natl. Acad. Sci.USA* (1990) **87**, 6639-6643.
- [97] Dekken, H. Van, Pizollo, J. G., Kelson, D.P., And Melamed, M.R. ‘Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific dna probes.’ *Cancer* (1990) **66**, 491-497
- [98] Kinoshita, S.,Akira, S. And Kishimoto, T. *Proc.Natl. Aced.Sci.USA.* (1992) **89**,1473-1476.
- [99] Cao, Umek, R. M. Andmcknight, S. L. *Genes and Dev.* (1991) **5**,1538-1552
- [100] Porter, D., Krop I., Nasser, S., Sgroi, D., Kaelin, C., Marks, Jr., Riggins, G., Polyak, K., ‘View Of Breast Tumor Progression.’ *Cancer Res* (2001), **61**, 5697-702
- [101] Poli, V. ‘The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions.’ *J. Biol. Chem.* (1998), **273**, 29279– 29282

- [102] McCarthy TL, Ji C, Chen Y, Kim K, Centrella M. 'Time- And Dose-Related Interactions Between Glucocorticoid And Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate On CCAAT/Enhancer-Binding Protein-Dependent Insulin Like Growth Factor I Expression By Osteoblasts *Endocrinology*. (2000) **141**, 27–137.
- [103] Yeh WC, Cao Z, Classon M, Mcknight SL. 'Cascade Regulation Of Terminal Adipocyte Differentiation By Three Members Of The C/EBP Family Of Leucine Zipper Proteins.' *Genes Dev.* (1995), **9**, 168–181.
- [104] O'Rourke, J.P., Newbound, G.C., Hutt, J.A., Dewille, J., 1999. 'CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\gamma$  Regulates Mammary Epithelial Cell G0 Growth Arrest And Apoptosis.' *J. Biol. Chem.* **274**, 16582–16589
- [105] Gery, S., Tanosaki, S., Hofmann, W. K., Koppel, A. and Koeffler, H. P. 'C/Ebpdelta Expression In A BCR-ABL-Positive Cell Line Induces Growth Arrest And Myeloid Differentiation.' *Oncogene* (2005), **24**, 1589-97.
- [106] A Candidate tumor suppressor gene in breast cancer. James w. deWille, Ph.D.september 2003
- [107] Imbert, A., Chaffanet, M., Essioux, L., Noguchi, T., Adelaide, J., Keraguven, F., Le Paslier, D., Bonaiti- Pellie, C., Sobol, H., Birnboum, D., Pebusque, M-J. 'Integrated Map Of The Chromosome 8p12-P21 Region Involved In Human Cancers And Werner Syndrome.' *Genomics* (1996), **32**, 29-38.
- [108] Rummukainen, J., Kytola, S., Karhu, R., Farnebo, F., Larsson, C., Isola, J., 'Aberrations Of Chromosome 8 In 16 Cell Lines By Comparative Genomic Hybridization , Fluorescence In Situ Hybridization, And Spectral Karyotyping.' *Cancer Genet Cytogenet* (2001), **126**, 1-7.
- [109] Parker, SL., Tong, T., Bolden, S., Wingo, PA., *Cancer J Clin.* (1997), **47**, 5–27.
- [110] Furuya, Y., Krajewski, S., Epstein, JI., Reed, JC., Isaacs, JT., 'Expression Of Bcl-2 And The Progression Of Human And Rodent Prostatic Cancers.' *Clin Cancer Res.* (1996), **2**, 389–398.
- [111] Genyan, Yang., Christopher, W., Gregory, Q. S., Deborah, A., 'Differential Expression Of CCAAT/Enhancer-Binding Protein- (C/EBP) in Rat

- Androgen-Dependent Tissues And Human Prostate Cancer' *J Androl* (2001) **22**, 471-480
- [112] Darlington, GJ., Ross, SE., Macdougald, OA., 'The Role Of C/EBP Genes In Adipocyte Differentiation.' *J Biol Chem.* (1998), **273**, 30057–30060.
- [113] Hoyer, S. 'Oxidative Energy Metabolism in Alzheimer's Brain. Studies in Early-Onset And Late-Onset Cases.' *Mol Chem Neuropathol* (1992), **16**, 207–24
- [114] Ishizuya-Oka et al.,1998)
- [115] Masayuki, I., Kobayashi, K., Shigeki, Y., Ichiro, I., 'Expression of CCAAT/enhancer binding protein  $\gamma$  is closely associated with degeneration of surface mucous cells of larval stomach during the metamorphosis of *Xenopus laevis*', Sophia University, Life Science Institute, Kioi-cho 7-1, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8554, Japan
- [116] Yukawa, K., T. Tanaka, S. Tsuji, and S. Akira. 'Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as  $Ca^{2+}$ /calmodulin kinases activation in hippocampal neurons.' *J Biol Chem* (1998), **273**, 31345-51.
- [117] Sanford, D. C. 'C/Ebp $\delta$  Expression And Function In Prostate Cancer Biology' PhD Thesis, Ohio State University By The Ohio State University 2006
- [118] Johnson, L., Levis, F., Abelson, H., Green, H. and Penman, S. 'Changes In RNA In Relation To Growth Of The Fibroblast. IV.Alterations In Theproduction And Processing Of Mrna And rRna In Resting And Growing Cells.' *J Cell Biol* (1976).**71**, 933-8.
- [119] O'Rourke, J. P., Newbound, G. C., Hutt, J. A. and Dewille, J. 'CCAAT/Enhancer-Binding Protein Delta Regulates Mammary Epithelial Cell G0 Growth Arrest And Apoptosis.' *J Biol Chem* (1999), **274**,16582-16589.
- [120] Tsukada, J., Saito, K., Waterman, WR., Webb, AC., Auron, PE. 'Transcription Factors NF-IL6 And CREB Recognize A Common Essential Site in The Human Prointerleukin 1 Beta Gene.' *Mol Cell Biol* (1994), **14**, 7285–97.
- Chandrasekar, B., Mitchell, DH., Colston, JT., Freeman, GL., 'Regulation

- [121] Of CCAAT/Enhancer Binding Protein Interleukin-6, Interleukin-6 Receptor, And Gp130 Expression During Myocardial Ischemia/Reperfusion.' *Circulation* (1999), **99**, 427–33
- [122] Shen, Y., Lue, L-F., Yang, L-B., Roher, AE., Kuo, Y-M., Strohmeyer, R., 'Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.' *Neurosci Lett* (2001), **305**, 165–168.
- [123] Galea, E., Feinstein, DL., 'Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP.' *Faseb J* (1999), **13**, 2125–37.
- [124] Steel, D.M. and Whitehead, A.S. 'The Major Acute Phase Reactants: C-Reactive Protein, Serum Amyloid P Component And Serum Amyloid A Protein.' *Immunol.Today* (1994), **15**, 81-88.
- [125] Nordeen, S.K. 'Luciferase Reporter Gene Vectors For Analysis Of Promoters And Enhancers.' *Bio Techniques* (1998), **6**, 454-457.
- [126] Carrie, A., Cantwell, E. and Johnson, P.F. 'Interleukin -6- Specific Activation Of The C/Ebpδ Gene In Hepatocytes Is Mediated By Stat3 And Sp1' *Molecular and Cellular Biology*, (1998), 2108-2117
- [127] Mccarthy, T. L., Ji, C., Chen, Y., Kim, K. K., Imagawa, M., Ito, Y. and Centrella, M. 'Runt Domain Factor (Runx)-Dependent Effects On CCAAT/Enhancer Binding Protein D Expression And Activity In Osteoblasts.' *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 21746-21753
- [128] Hutt, J. A., O'Rourke, J. P. And Dewille, J. 'Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 Activates CCAAT/Enhancer Binding Protein-D Gene Transcription In G0 Growth-Arrested Mouse Mammary Epithelial Cells And in Involuting Mouse Mammary Gland.' *J. Biol. Chem.* (2000), **275**, 29123-29131
- [129] Cantwell, C. A., Sterneck, E. and Johnson, P. F. 'Interleukin-6-specific activation of the C/EBPd gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1.' *Mol. Cell. Biol.* (1998) **18**, 2108-2117
- [130] Ramji, D. P., Vitelli, A., Tronche, F., Cortese, R. and Ciliberto, G. 'The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBPd/NF-IL6b, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms.' *Nucleic Acids Res.* (1993), **21**, 289-294

- [131] Davies, G. E., Sabatakos, G., Cryer, A. and Ramji, D. P. The ovine CCAAT-enhancer binding protein d gene : cloning, characterization, and species-specific autoregulation.' *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) **271**, 346-352
- Yamada, T., Tsuchiya, T., Osada, S., Nishihara, T. and Imagawa, M.
- [132] 'CCAAT/enhancer binding protein d gene expression is mediated through downstream binding sites.' *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998), **242**, 88-92
- [133] O'Rourke, J. P., Hutt, J. A. and DeWille, J. 'Transcriptional regulation of C/EBPd in G(0) growth-arrested mouse mammary epithelial cells.' *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) **262**, 696-701
- [134] Timchenko, N., Wilson, D. R., Taylor, L. R., Abdelsayed, S., Wilde, M., Sawadogo, M. and Darlington, G. J. 'Autoregulation of the human C/EBPa gene by stimulation of upstream stimulating factor binding.' *Mol. Cell. Biol.* (1995), **15**, 1192-1202
- [135] Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G. 'Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors.' *J. Biol. Chem.* (1998) **273**, 28545-28548
- [136] Berg, A., Tobias, N., Cassel, A., Per, E., Schwarze, B. and Magnus, N. 'Glucocorticoids Regulate The CCSP And CYP2B1 Promoters Via C/Ebpb And D In Lung Cells.' *Biochemical And Biophysical Research Communications* (2002), **293**, 907-912
- [137] Hutt, J. A., O'Rourke, J. P. And Dewille, J. 'Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 Activates CCAAT Enhancer-Binding Protein Delta Gene Transcription In Go Growth-Arrested Mouse Mammary Epithelial Cells And In Involuting Mouse Mammary Gland.' *J Biol Chem* (2000), **275**, 29123-31.
- [138] Ray, A. and Ray, B. K. 'Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBPb and C/EBPd and their activation by phosphorylation.' *Mol. Cell. Biol.* (1994), **14**, 4324-4332
- [139] <http://www.protocol-online.org>

- [140] Van der Eb, *Virology*, (1973), **52**, 456.
- [141] Pediatrik Moleküler Patoloji and Genetik kongresi. Eylül, (2003)
- [142] S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi (2003-2004) Eğitim Yılı Seminerleri
- [143] Rosa, M.S., Bienveu, J., Whichen, J. ‘Cytokines, Ch 21. In: Burtis CA, Ashwood Ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (3th Ed). s. 541-564, Philadelphia (1999)
- [144] Kılıçturgay, K. *İmmunoloji*. s. 147-176, Nobel Tıp Kitapevi, Bursa (1997)
- [145] Gillis S.D., (1998)
- [146] [www.promega.com](http://www.promega.com) (12,06,07)
- [147] Temizkan, G., Arda, N., ‘Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler’, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), Yayın no: 2, Nobel tıp kitabevleri, (2004)