

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



**İNSAN PSMD4 PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM GÜLER

BALIKESİR, ARALIK - 2015

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



**İNSAN PSMD4 PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM GÜLER

Jüri Üyeleri : Yrd. Doç.Dr. SümeyyeA.TÜRKOĞLU(Tez Danışmanı)

Prof. Dr.Feray KÖÇKAR (Eş Danışmanı)

Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞAHİN ER

BALIKESİR, ARALIK -2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gizem GÜLER tarafından hazırlanan “İNSAN PSMD4 PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28.12.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

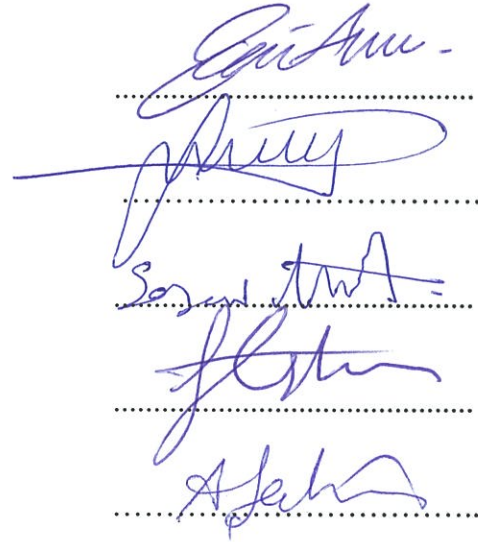
Danışman
Yrd.Doç.Dr.Sümeyye A.TÜRKOĞLU

Eş Danışman
Prof.Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Prof.Dr.Sezai TÜRKEK

Üye
Doç.Dr.Fatih COŞKUN

Üye
Yrd.Doç.Dr.Aylin ŞAHİN ER



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi tarafından 2014-109 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**İNSAN PSMD4 PROMOTORUNUN KLONLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
GİZEM GÜLER
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: YRD.DOÇ.DR SÜMEYYE A.TÜRKOĞLU)
(EŞ DANIŞMAN: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, ARALIK - 2015**

26S proteazom işlevini yitirmiş proteinlerin yıkımında görevli hücrel bir yapıdır. PSMD4 geni 26S proteazomun yapı birimi olan 19S düzenleyici yapı biriminde görev yapmaktadır. PSMD4 geni (26S proteazom non ATPase subunit S5A) 3 protein kodlamaktadır. Bunlardan S5A; yapısında bulunan poliubikitin bağlanma domaini sayesinde hücrel işlevini yitirmiş proteinlerin yıkımından sorumludur. ASF intestinal sıvı taşıma düzenlenmesinde işlevli kolera toksini ile indüklenen bir salgılanmış proteindir. Angiosidin proteini ise birçok tümör ve endotel hücrelerde yüksek düzeyde ifade olmaktadır. Bu protein anjiogenez ve tümör büyümesini engellemektedir.

Literatürde çok işlevli protein ifadesi sağlayan bir gen olan PSMD4 hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Tez çalışması kapsamında PSMD4 geninin transkripsiyonel düzeydeki regülasyonu ve hipoksik ile koşul ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışma kapsamında ilk olarak Hep3B, PC-3, DU-145, MCF7, HT-29, HUVEC, MG-63, Saos-2, PANC, HeLa hücre hatlarında PSMD4'ün mRNA ve PC-3, HUVEC, Saos-2 ve Hep3B hücre hatlarında protein ifadesi belirlenmiştir. Daha sonra PSMD4 -617/+65, 261/+65 ve -85/+65 promotor bölgeleri pMetLuc lusiferaz haberci vektör sistemine klonlanmıştır. Bazal aktiviteleri geçici transfeksiyon analizleri ile belirlenmiştir. Bazal aktivitesi en yüksek promotor parçası -85/+65 bç olduğu görülmüştür. Hipoksik koşullar altında tüm promotor parçalarının aktif olduğu gözlenmiştir. Ancak en aktif yine en küçük (-85/+65) promotor parçasının olduğu görülmüştür. Hipoksik koşullardaki değişimler mRNA, protein ve transkripsiyonel aktivite düzeyinde PC-3 ve HUVEC hücre hattında belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: PSMD4, S5a, ASF, Hipoksiya.

ABSTRACT

**CLONING AND CHARACTERIZATION
OF THE HUMAN PSMD4 PROMOTOR
MSC THESIS
GİZEM GÜLER
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY
(SUPERVISOR: ASSIST.PROF.DR. SÜMEYYE A.TÜRKOĞLU)
(CO-SUPERVISOR: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, DECEMBER 2015**

26S proteasome is a cellular structure employed in degradation of the proteins that lost their functions. PSMD4 gene serve in 26S proteasome structure which 19S regulatory subunit. PSMD4 (26S proteasom non ATPase subunit S5A) encodes 3 proteins. One of these, S5a is the polyubiquitin binding subunit of the 26S proteasome and destroy protein. ASF; is a plasma-bound protein known to inhibit cholera toxin-induced intestinal fluid secretion in rats. Angiocidin is a protein over-expressed in many different solid tumors. This protein inhibits angiogenesis and tumor growth.

PSMD4 gene is a multifunctionally expressed protein but there is a limited information about the regulation of this gene in the literature. The main focus of our study is transcriptional regulation of PSMD4 gene and explaining its relationship with the hypoxic conditions.

By this study, firstly; mRNA and protein exspressions of PSMD4 gene were determined in Hep3B, PC-3, DU-145, MCF7, HT-29, HUVEC, MG-63, Saos-2, PANC, HeLa cell lines.

Different PSMD4 promoter constructs (-617/+65, 261/+65 and -85/+65) were cloned in pMetLuc lusiferase vector. Basal transcriptional activity was determined by transient transfection assays. -85/+65 bp PSMD4 promoter construct had high basal activity. All promoter fragments were active under hypoxic conditions. The most active fragment was -85/+65 bp PSMD4 promoter in hypoxic conditions. PSMD4 protein, mRNA and transcriptional activity levels were determined under hypoxic and normal conditions in HUVEC and PC-3 cell line.

KEYWORDS: PSMD4, S5a, ASF, Hypoxia.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Proteazomun Keşfi	1
1.2 Proteazomun Yapısı ve Organizasyonu	2
1.2.1 20S Kor Partikülü	3
1.2.2 19S Düzenleyici Partikül	4
1.2.3 11S Düzenleyici Partikülü	4
1.3 Proteazom Çeşitleri	5
1.4 26S Proteazom.....	6
1.5 Ubikitinasyon ve Protein Yıkımı.....	7
1.5.1 Ubikitin Bağımsız Protein Yıkımı	8
1.5.2 Ubikitin-Proteazom Yolağının Kanserdeki Rolü.....	8
1.5.2.1 Ras Aracılığı ile Kansereleşmeye Etkisi.....	10
1.5.2.2 TGF- β ile İlişkili Kansereleşme.....	10
1.5.2.3 Nf-k β Etkinliğinin Ubikitin-Proteazom Yolağı ile Düzenlenmesi	11
1.5.2.4 TNF- α ve Ubikitin Proteazom Yolağı Arasındaki İlişki.....	11
1.5.2.5 Tümör Baskılayıcı Gen Olan p53'ün Düzenlenmesinde Ubikitin Proteazom Yolağının Etkinliği	11
1.5.2.6 İlaç Direnci ve Ubikitin Proteazom Yolağı.....	12
1.5.3 26S Proteazomun Kansere İlişkisi	12
1.5.3.1 Hücre Döngüsü Kontrolü	12
1.5.3.2 Apoptoz	13
1.5.3.3 Hücre Stresine Cevabı.....	14
1.5.3.4 İmmün Sistemdeki Görevi	15
1.6 26S Proteazom İnhibitörleri	16
1.7 26S Proteazome Non-ATPase Regulatory Subunit4 (PSMD4)	17
1.7.1 S5a Proteini.....	17
1.7.2 ASF (Anti-Sekretory Faktör) Protein	19
1.7.3 Angiosidin.....	20
1.7.3.1 Angiosidin ve Kansere	21
1.8 Hipoksi	25
1.8.1 Kimyasal Hipoksi	25
1.8.2 Hipoksi ve Proteasom İlişkisi	26
1.9 Çalışma Amacımız	27
2. MATERYAL VE METOT	30
2.1 Materyal	30
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	30
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	31
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyu.....	32

2.1.4	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları	33
2.1.5	Çalışmada Kullanılan Vektörler	33
2.2	Metod	36
2.2.1	Çalışmada Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu.....	36
2.2.2	Klonlama.....	37
2.2.2.1	Primer Tasarımı.....	37
2.2.2.2	Kandan Genomik DNA İzolasyonu	37
2.2.2.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR).....	38
2.2.2.4	DNA Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
2.2.2.5	Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	39
2.2.2.6	DNA Miktar Tayini.....	39
2.2.2.7	PZR Ürünlerinin T:A Klonlanması.....	40
2.2.3	Transformasyon	40
2.2.3.1	Kompetent Hücre Hazırlanması.....	40
2.2.3.2	Kompetant Hücrenin Etkinliğinin Hesaplanması.....	41
2.2.3.3	Vektörün Kompetent Hücreye Transformasyonu	41
2.2.4	Plazmit DNA İzolasyonu	42
2.2.4.1	Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu.....	42
2.2.4.2	Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu.....	42
2.2.5	DNA'nın Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi.....	42
2.2.6	Dizi Analizi.....	43
2.2.7	pMet-Luc Vektörüne Alt Klonlama.....	43
2.2.8	Hücre Kültürü Teknikleri.....	44
2.2.8.1	Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı.....	44
2.2.8.2	Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları.....	44
2.2.8.3	Hücre Soyunun Başlatılması, Büyütülmesi ve Dondurulması..	45
2.2.8.4	Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı.....	45
2.2.8.5	MTT Testi	46
2.2.9	Transfeksiyon Çalışmaları	46
2.2.9.1	Deney Düzenin Kurulması.....	46
2.2.9.2	Lipofectamine 2000 Reagent Kullanılarak Geçici Transfeksiyon.....	47
2.2.9.3	Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi	47
2.2.9.4	SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü	48
2.2.10	RNA ile İlgili Teknikler.....	49
2.2.10.1	Deney Düzenin Kurulması.....	49
2.2.10.2	Hücre Pelleterinden RNA İzolasyonu.....	49
2.2.10.3	RNA Jel Elektroforezi.....	49
2.2.10.4	RNA Miktar Tayini.....	50
2.2.10.5	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PZR).....	50
2.2.10.6	Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PZR).....	52
2.2.11	Protein Teknikleri	53
2.2.11.1	Deney Düzenin Kurulması.....	53
2.2.11.2	RIPA Tamponu Kullanılarak Protein Ekstraktların Hazırlanması	54
2.2.11.3	Protein Miktarının Belirlenmesi.....	55

2.2.11.4 SDS PAGE	55
2.2.11.5 SDS Jelinin Blotlanması	57
2.2.11.6 Proteinlerin Belirlenmesi	57
2.2.11.7 Sonuçların Filme Aktarılması	58
2.2.12 İstatiksel Analiz	58
3. BULGULAR	59
3.1 Farklı Hücre Hatlarında PSMD4 Ekspresyonunun mRNA ve Protein Düzeyinde Belirlenmesi	59
3.1.1 Farklı Hücre Hatlarında mRNA Seviyesinde PSMD4 Ekspresyon Profili.....	60
3.1.2 Farklı Hücre Hatlarında Protein Seviyesinde PSMD4 Ekspresyon Profili.....	62
3.2 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Geninin mRNA ve Protein Seviyesinin Belirlenmesi.....	63
3.2.1 Hipoksik Koşulların Oluşturulması	63
3.2.1.1 Hipoksik Koşulların Doğrulanması.....	63
3.2.2 Hipoksik Koşulların Hücre Proliferasyonuna Etkisinin MTT ile Analizi.....	65
3.2.3 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Geninin mRNA Seviyesinin Belirlenmesi	67
3.2.4 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Protein Seviyesinin Belirlenmesi	69
3.3 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Klonlaması	71
3.3.1 PSMD4 Geninin Promotoruna Spesifik Primerlerin Tasarımı	71
3.3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	72
3.3.3 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının PCR ile Çoğaltılması	73
3.3.4 Farklı Büyüklükteki İnsan PSMD4 Promotor PCR Ürünlerinin pGEM-T-Easy Vektörüne Klonlanması	75
3.3.5 Farklı Büyüklükteki İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Haberci Lusiferaz Vektörüne Klonlanması	80
3.4 İnsan PSMD4 Promoter Parçalarının Miktar Optimizasyonu ve Bazal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	81
3.4.1 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi	82
3.4.2 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitelerinin Belirlenmesi	83
3.5 PSMD4 Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	85
3.5.1 PSMD4 Genine Spesifik Klonlama Primerlerin Tasarımı.....	85
3.5.2 PSMD4 Geninin Klonlanması	86
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
5. KAYNAKLAR.....	96
6. EKLER.....	106

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Proteazomun yapısı [12].	3
Şekil 1.2: Proteazom Çeşitleri [22].	5
Şekil 1.3: 26S Proteazomun Yapısı [65].	6
Şekil 1.4: Ubikitin yolağı [12].	8
Şekil 1.5: TSP-1 proteini domain yapısı [77].	20
Şekil 1.6: HIF-1 α 'nın çalışma prensibi [31].	26
Şekil 1.7: Çalışma planı akış diyagramı.	29
Şekil 2.1: pGEM-T Vektör Haritası.	34
Şekil 2.2: pMetLuc Reporter Vektör Haritası.	34
Şekil 2.3: pMetLuc Kontrol Vektör.	35
Şekil 2.4: SEAP-2 Kontrol Vektör.	35
Şekil 2.5: pcDNA 3.3 TOPO-vektör.	36
Şekil 2.6: Hemositometri.	46
Şekil 3.1 :Farklı hücre hatlarında PSMD4 geninin ve H β 2 kontrol geninin ekspresyonu agaroz jel görüntüsü.	61
Şekil 3.2: PSMD4 geninin farklı hücre hatlarında mRNA ekspresyonun densitometrik analizi.	61
Şekil 3.3: Farklı hücre hatlarında protein seviyesinde PSMD4 ekspresyonu.	62
Şekil 3.4: Farklı hücre hatlarında PSMD4 protein ekspresyonun densitometrik analizi.	62
Şekil 3.5: PC-3 Hücre Hattında Hipoksik Ortamın Doğrulanması.	64
Şekil 3.6: HUVEC Hücre Hattında Hipoksik Ortamın Doğrulanması.	65
Şekil 3.7: PC-3 hücre hattında hipoksik ortamın hücre proliferasyonuna etkisi MTT Testi değerlendirilmesi.	66
Şekil 3.8: HUVEC hücre hattında hipoksik ortamın hücre proliferasyonuna etkisi MTT Testi değerlendirilmesi.	66
Şekil 3.9: PC-3 hücre hattında hipoksia ile indüklenmiş ve normal hücrelerden elde edilen RNA jel elektroforez görüntüsü.	67
Şekil 3.10: HUVEC hücre hattında hipoksia ile indüklenmiş ve normal hücrelerden elde edilen RNA jel elektroforez görüntüsü.	67
Şekil 3.11: PC-3 hücre hattında PSMD4 mRNA ekspresyonu.	68
Şekil 3.12: HUVEC hücre hattında PSMD4 mRNA ekspresyonu.	68
Şekil 3.13: PC-3 hücrelerinde hipoksik ortamda PSMD4 protein ekspresyonu.	70
Şekil 3.14: HUVEC hücrelerinde hipoksik ortamda PSMD4 protein ekspresyonu.	71
Şekil 3.15: PSMD4 farklı promotor parçalarına ait temsili şekil.	72
Şekil 3.16: Kandan izole edilen genomik DNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.	73
Şekil 3.17: PSMD4 farklı promotor primerlerin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.	75
Şekil 3.18: pGEM-T-Easy vektörüne klonlanan PSMD4 promotor parçalarının kesim sonuçları.	76
Şekil 3.19: PSMD4 682 bç promotor bölgesi ve NCBI dizi blast sonucu.	77
Şekil 3.20: PSMD4 326 bç promotor bölgesi ve NCBI dizi blast sonucu.	78

Şekil 3.21: PSMD4 150 bç promotör bölgesi ve NCBI dizi blast sonucu.....	78
Şekil 3.22: PSMD4 promotör bilgileri	79
Şekil 3.23: pMET-Luc vektörüne alt klonlama yapılan PSMD4 promotör parçalarının kontrol kesim sonuçları.	80
Şekil 3.24: 682 bç PSMD4 promotör parçasının miktar optimizasyonu.	82
Şekil 3.25: Tüm PSMD4 promotör parçalarının bazal aktiviteleri.	83
Şekil 3.26: PSMD4 promotör parçalarının HRE bağlanma bölgeleri.	84
Şekil 3.27: Tüm PSMD4 promotör parçalarının hipoksik koşullarda aktivitesi.	85
Şekil 3.28: PSMD4 klonlama PZR görüntüsü.	87
Şekil 3.29: PSMD4 kontrol kesim yapılan koloni.	88
Şekil 3.30: Klonlanan PSMD4 geni ve NCBI dizi blast sonucu.	89
Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.....	106
Şekil A.2: PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.	107

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Çalışmalarda kullanılan kimyasallar.....	30
Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazlar.....	31
Tablo 2.3: Kandan genomik DNA izolasyon çözeltileri.....	38
Tablo 2.4: Kompetan Hücre için Kullanılan Çözeltiler.....	41
Tablo 2.5: Lusiferaz Aktivite Ölçüm Çözeltileri.....	48
Tablo 2.6: SEAP Aktivite Ölçüm Çözeltileri.....	48
Tablo 2.7: Formaldehit Jel Elektroferez Çözeltileri.....	50
Tablo 2.8: PSMD4 ve H β 2 primerlerin PZR Koşulları.....	51
Tablo 2.9: PSMD4 ve H β 2 Primerlerin PZR Bileşenlerin Miktarları.....	52
Tablo 2.10: Gerçek Zamanlı PZR Döngüleri.....	53
Tablo 2.11: Gerçek zamanlı PZR Koşulları.....	53
Tablo 2.12: Ripa Tampon Çözeltilerinin İçeriği.....	54
Tablo 2.13: Western Blot Çözeltileri.....	55
Tablo 2.14: SDS PAGE Çözeltileri.....	56
Tablo 3.1: İnsan PSMD4 genine ait 380 bp'lik ürün veren primer çifti.....	59
Tablo 3.2: HIF1 α ve H β 2 primer çiftlerinin bilgileri.....	64
Tablo 3.3: Tasarlanan Primer Dizileri.....	72
Tablo 3.4: PSMD4 promotor PCR bileşenleri.....	74
Tablo 3.5: PSMD4 promotor PCR döngüsü.....	74
Tablo 3.6: PSMD4 genine ait klonlama primerleri.....	85
Tablo 3.7: Klonlama PZR Bileşenleri.....	86
Tablo 3.8: PZR Döngüsü.....	86

SEMBOL LİSTESİ

PSMD4	: 26S Proteazom non-ATPase subunit S5a
ASF	: Antisekretory Faktör
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Ethylendiamintetra Asetik Asit
FA	: Formaldehit Agaroz
FCS	: Fetal Sığır Serumu
LB	: Luria Broth
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
UV	: Ultra-viyole
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPM	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
RT-PCR	: Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
S	: Sedimentasyon sayısı
TNF-α	: Tümör nekroze edici faktör alfa
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
NfKβ	: Nükleer faktör kappa enhancer bağlayıcı protein
CoCl₂	: Kobalt Klorür

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin deneysel kısmı Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarında, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve tez danışmanım Yrd. Doç.Dr. Sümeyye A. Türkoğlu yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmalarım sırasında çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yön veren, sabırla beni dinleyip destekleriyle hep yanımda olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr Sümeyye A. TÜRKOĞLU'na,

Çalışmalarım sırasında engin bilgisiyle bana yol gösteren çalışma azmini ve akademik başarılarını örnek aldığım eşdanışmanım değerli hocam Prof.Dr Feray KÖÇKAR'a,

Tezim süresinde laboratuvar çalışmalarımnda bilgi ve birikimini benimle paylaşan, sabırla beni dinleyerek yardımcı olan, abla sevgileriyle hep yanımda olan canım hocalarım Yrd. Doç Dr Meltem ALPER, Öğr.Gör. Derya ALTAN, Dr. Esra TOKAY ve Tuğşen AYDEMİR'e,

Her anımda yanımda olan hüznüme, sevincime ortak olan, arkadaştañ çok aile olduğumuz beni asla yalnız bırakmayan canım arkadaşlarım Fatma POYRAZLI, Merve KARAMAN, Sevgi BAYSAL, Sinem GÜLTEKİN, Gamze GÜNGÖR, Muhammed DOLİYEV'e,

Hayattaki amacım doğrultusunda hep yanımda olan bana inanan, güvenen varlığıyla beni güçlendiren benimle gülüp benimle ağlayan sevgili nişanlım Fatih DAYI'ya,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen bana güvenen canım annem Gülbiye GÜLER ve canım babam Gürhan GÜLER, sevgili kardeşim Gökhan GÜLER'e

Tesekkürlerimi sunarım. İyiki varsınız....

GİZEM GÜLER

1. GİRİŞ

Hücrede bulunan birçok proteinin görevini tamamladıktan sonra yıkılması gerekmektedir. Yaşam ömrünü tamamladığı halde yıkılmayan protein, hücrede birçok hasara sebep olmaktadır. Ökaryotik hücrelerde proteini yıkan birkaç yolak bulunur. Önemli bir yıkım yolağı, zarla çevrili asidik içeriğı hidrolitik enzimlerle dolu bir organel olan lizozom tarafından gerçekleştirilen yıkımdır. Lizozomal yıkım daha çok otofaji adı verilen bir olay olan hücrenin yaşlanmış veya bozulmuş organellerine karşı ve hücre tarafından alınan hücre dışı proteinlere yönelik olarak çalışır [1].

Bir diğerk protein yıkım yolu proteazom aracılığıyla olur. Prokaryot ve ökaryot hücrelerde bulunan protein yıkımında asıl görevli molekül proteazomlar'dır. Tipik bir memeli hücresinde yaklaşık 30.000 adet bulunur. Proteazomlar yaklaşık 50 protein alt biriminden oluşan kütlesi 2-2.4 x 10⁶ Da olan çok büyük makromoleküler makinelerdir [1]. Proteazom çok alt üniteli enzim kompleksidir. Hücre döngüsünün ilerlemesinde ve apoptosis proteinlerinin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Bu nedenle kanser tedavisi için önemli bir hedef haline gelmiştir [2].

1.1 Proteazomun Keşfi

Ubikitin proteazom sisteminin keşfinden önce, hücrelerdeki protein yıkımının, içerisinde asidik ve proteaz dolu membrana bağlı lizozom organeli ile olduğu düşünölmekteydi. Hücrelerdeki eksojen ve yaşlı proteinler yada zarar görmüş proteinlerin yıkılmasında lizozom organelinin görevli olduğu biliniyordu [1]. Fakat 1977 yılında Alfred Goldberg retikülositlerde ATP bağımlı protein yıkımını çalışmış ve lizozom eksikliği olan ikinci bir hücre içi parçalanma mekanizması önermiştir. [3]. 1978 yılında farklı protein zincirlerinin birleşmesiyle oluşan proteazlar keşfedilmiştir. [4]. Daha sonraki çalışmalarda histon proteinlerdeki açıklanamayan kovalent modifikasyonlar belirlenmiştir. Bu değışim histon proteindeki lizin amino asiti ve ubikitin proteinin C-terminal'de bulunan glisin amino asitleri arasında

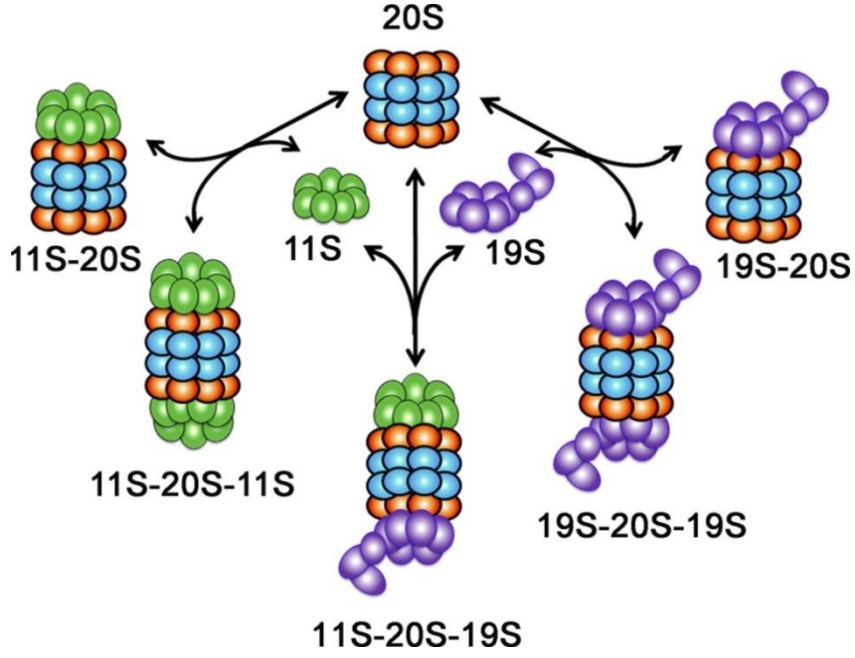
olmaktadır. Ancak fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır [5]. Sonraki çalışmalarda proteolitik yıkımla ilişkili proteinler keşfedilmiştir. Avram Hershko ve Aaron Ciechanover 1970'lerin sonu 1980'lerin başında ubiquitin proteazom sistemi keşfi çalışmalarına başlamıştır. ATP-bağımlı proteolitik kompleks 26S proteazom keşfedilmiştir [6-7]. Bu alandaki keşifleri onlara 2004 yılında kimya dalında Nobel ödülünü kazandırmıştır [8].

Memelilerde bulunan 26S proteazomun alt ünitelerinden biri olan 19S düzenleyici bölgede PSMD4 proteini yer almaktadır. Poliubikitinlenen proteinlerin yıkımından sorumludur. PSMD4 proteinlerin yıkımı dışında diğer başka hücresel proseslerde görev aldığı gösterilmiştir. Çalışmamız kapsamında bu proteinin regülasyonu araştırılmıştır.

1.2 Proteazomun Yapısı ve Organizasyonu

Proteazom, büyük protein yapılardan oluşan moleküllerdir. Bu yapılar, ökaryot canlılarda, arkealarda ve çoğu bakteri türünde yer almaktadır. Ökaryot yapıları canlılarda bu yapılar çekirdekte ve sitoplazmada bulunur. Proteazomların genel görevi, hasar görmüş veya işe yaramayan proteinleri, proteoliz adı verilen ve peptit bağlarını kırarak çalışan bir enzim aracılığıyla vücuttan atmaktır. Proteazomlar, hücrelerin bağlanamamış proteinleri atmasını ve özelleşmiş proteinlerin değişiminin kontrol edilmesini sağlayan büyük bir sistemin parçalarıdır [9].

Proteazom alt bileşenleri sıklıkla Svedberg sedimentasyonu ile adlandırılır. En özel olarak memelilerde bulunan sitozolik 26S proteazom'dur. Yaklaşık 2000 kDa'dur. 26S proteazom merkezi 20S kor partikülü ve iki adet 19S düzenleyici alt ünite içermektedir. 20S alt ünitesinin iki ucu açıktır ve yıkılmak için proteinler bu bölgeden girer. 20S'in her iki ucuna bağlı 19S düzenleyici alt üniteleri ATPase aktif bölge ve ubiquitin bağlandığı bölge içermektedir. Bu yapı proteinleri poliubikitinler ve katalitik kor 20S partikülüne iletir. Alternatif alt ünite 11S düzenleyici partikül 20S kor partiküle tıpkı 19S gibi bağlanır. 11S partikül virüs enfeksiyonu sonrasında üretilen yabancı proteinlerin yıkımında rol oynar [10].



Şekil 1.1: Proteazomun yapısı [12].

1.2.1 20S Kor Partikülü

Basit organizmalarda ve ökaryotik canlıların proteazomlarında 20S kor partikül bulunmaktadır. Ancak bazı farklılıklar bulunmaktadır. Genel olarak 20S partikülün yapısı ise silindriktir. Bu yapı 4 halkadan oluşmakta ve her halka 7 alt birimden meydana gelmektedir. Her halka α - β - α sekansı ile düzenlenmiştir. α halkalar sadece α içerir iken β halkalar sadece β -alt birimi içeren yaklaşık 700 kDa büyüklüğünde kütlelerdir [11].

Substrat erişimi iç proteolitik kısım α halkaları tarafından düzenlenirken prolitik aktivite β -alt birimlerde yer alır. Arke formunda 20S partikülünde; α halkaları bir tip α alt ünitesi içermesinin yanı sıra β - halkaları sadece bir tip β alt ünitesi bulunmaktadır [12-13].

Modern ökaryotlarda 20S kor partikülü 7 farklı α ve 7 farklı β alt ünite içermektedir. Proteolitik aktivite; sadece 3β (β_1 , β_2 , β_5) alt biriminde yer almaktadır. Ökaryotik canlılarda 20S kor partiküle farklı regülatör partiküller bağlanabilir. Ancak bu durum arkeler gibi basit canlılarda gerçekleşmemektedir [14].

1.2.2 19S Düzenleyici Partikül

19S düzenleyici bölge; yaklaşık 700 kDa büyüklüğündedir. En az bilinen 19 farklı bilinen alt ünite içermektedir. 19S partikül 20S kor partikülün alt ünitelerine bağlanmaktadır. 20S kor proteazoma bağlanan 19S aktifleşir. Ökaryotlarda 9 temel proteinden 6'sı AAA protein ailesinin ATPase alt ünitesidir. 19S düzenleyici bölgenin 6 alt ünitesi (Rpt1-Rpt6) ATPase aktivitesi gösterir. Rpt alt ünite formları hegzamerik halkadır ve proteazomun alfa halkalarına bağlanır. 19S düzenleyici bölgenin diğer alt üniteleri Rpn kapak benzeri yapıda formları vardır. Substratları tanıma ve bağlanmayı (Rpn10 ve Rpn13) sağlar. Arke gibi basit formlarda ise ATPase aktivitesini PAN (Proteazom aktive eden nükleotit) adı verilen proteazom aktifleyici nükleotitler sağlar [15]. PAN proteini 6 aynı nükleotitten oluşan yaklaşık 650 kDa büyüklüktedir. Substrat yıkımı ATP bağımsız gerçekleşmektedir [16].

1.2.3 11S Düzenleyici Partikülü

İmmün proteazom olarak adlandırılan 11S düzenleyici IFN- γ , TNF- α , yada lipopolisakkaritler tarafından indüklenmektedir. 11S kompleks 9 nm yükseklikte ve 6 nm çapındadır. 2-3 nm çapındaki merkezi kanal çok önemli proteazomal aktivitesine sahiptir 11S düzenleyici protein PA28 (Proteazom aktivatör) yada REG (Proteazom aktivatör düzenleyici) olarak adlandırılmaktadır. 11S düzenleyici protein proteazom alt üniteleriyle birlikte indüklenmektedir. Şimdiye kadar bilinen 3 farklı 11S alt ünitesi bilinmektedir. Bunlar PA28 α , PA28 β ve PA28 γ 'dır. PA28 α ve PA28 β birlikte immün dokularında sitoplazmada bulunur. PA28 γ hücrenin çekirdeğinde bulunur. Bu alt uniteler 6'lı ve 7'li farklı formlar meydana getirebilmektedir. Sadece PA28 γ alt bileşeni 7'li aynı form oluşturabilir. PA28 γ ; 20S kompleksin β 2 alt ünitesinin prolitik aktivitesini yükseltir, ancak β 1 ve β 5 alt ünitelerinin aktivitelerini %50 oranında engellemektedir [17-20].

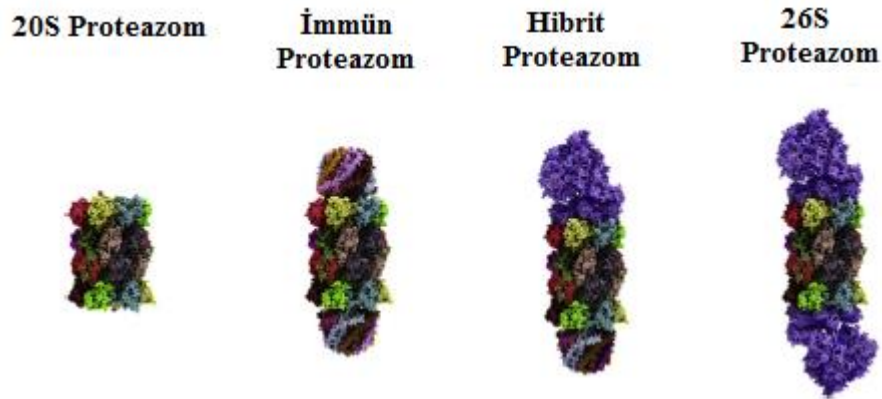
1.3 Proteazom Çeşitleri

Eski prokaryotik formlarda sadece merkezi silindirik 20S kor partikülü bulunmaktadır. Modern Ökaryotik formlar; İmmün proteazom, Hibrit proteazom ve 26S proteazom'dur [21].

İmmün proteazomda 20S kor proteazoma ek olarak 11S regülator kapaklar bağlıdır. Ana görevi hidrofobik C-termini ile kısa oligo peptidler üretimidir. CD8⁺ T hücreleri tarafından bilinmeyen antijenlerin tanınması sonrası hücreler yıkılır. Yapısal proteazom olarak görev yapan immün proteazom sadece ATP bağımsız yolla substratları yıkabilir. Yapısal 20S kor partikülü proteolitik alt üniteleri (β 1, β 2, β 5) gibi indüklenen formlar (i β 1, i β 2, i β 5) proteazomal yıkım sırasında kullanılmaktadır [22].

Hibrit proteazomda 20S kor partüküle, 19S ve 11S regülator kompleks bağlıdır. Protein yıkımı ATP bağımlı ve ATP bağımsız gerçekleşebilir. Çalışma prensibi hala açık değildir [22].

26S proteazomda ise 20S kor proteazoma bağlı 19S regülator kompleks bulunmaktadır. Yapıların düzeni 19S-20S-19S olarak sıralanmaktadır. 26S proteazom ökaryot canlılara spesifiktir [23].



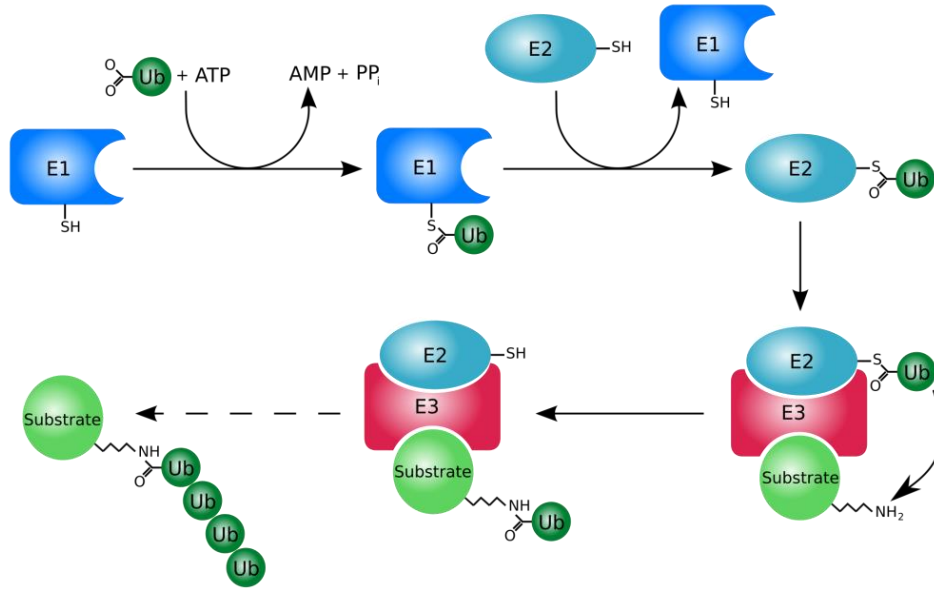
Şekil 1.2: Proteazom Çeşitleri [22].

1.5 Ubikitinasyon ve Protein Yıkımı

Ubikitin molekölü anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümüyle ilgili hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleköler homeostatik mekanizmaya katılır. Ubikitin, 76 aminoasitlik küçük bir peptid olup hedef substratlara E1 (ubikitin aktiveleştirici enzim), E2 (ubikitin konjuge edici enzimler) ve E3 (ubikitin ligaz) denen 3 enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile bağlanan ve onları proteozom adlı subseölüler organelere hedef gösteren bir moleköldür [25]

Proteazomlar görevini tamamlamış proteinleri yıkmakla görevlidir. Yıkılacak proteinlerin yıkılmayacaklardan ayırt edilmesi gerekmektedir. Bu problemi çözmek amacıyla ubikitinler yıkılacak proteinlere bağlanarak işaretlenir. 26S proteazomun 19S regölatör başlığı ubikitin işaretli proteinleri tanıyarak katlarını açar ve onları yıkım için proteazoma gönderir [1].

Ubikitinle işaretleme sürecinde ise; ubikitin aktive eden enzim (E1), ATP içeren bir reaksiyonla yıkılacak proteine ubikitin eklenmesi gerçekleştirir. Ubikitin konjugasyon enzimi olan (E2) ubikitin molekölünü sisteine aktarır. E2'ye bağlı ubikitin karboksil ucuyla hedef proteindeki lizinin yan zincirindeki amino grubuna izopeptit bağıyla ubikitin-protein ligaz (E3) enziminin katalizlediğı bir reaksiyonla bağlanır. Bunu takip eden ligaz reaksiyonları yeni ubikitini bir önceki ubikitinin lizin-48 'ine ekleyerek ubikitinlerden oluşmuş lineer polimeri yaparak hedef proteini poliubikitin ile modifiye edilmiş bir proteine çevirir [1].



Şekil 1.4: Ubikitin yolağı [12].

1.5.1 Ubikitin Bağımsız Protein Yıkımı

Birçok protein proteazomda yıkım öncesi ubikitinlenmesine rağmen, bu genel kuralda bazı istisnalar bulunmaktadır. Özellikle proteinlerin post translasyonel işlenmesinde proteazom normal rol oynamaktadır. Proteazom aktivasyonuna en büyük örnek p50'den p105 işleyerek Nf-k β (Nükleer Faktör Kappa B) yolağının aktifleştirilmesidir [26]. Bazı proteinlerin yapılandırılmamış bölgeleri nedeniyle kararsız olduğu ve bu yüzden de ubikitin olmadan yıkıldığı öne sürülmüştür [27]. Yapısal olarak, anormal yanlış katlanmış veya yüksek oranda oksidize olmuş proteinlerde, hücresel stres koşulları altında da ubikitin bağımsız ve 19S bağımsız bozunmaya maruz kalmaktadır [28].

1.5.2 Ubikitin-Proteazom Yolağının Kanserdeki Rolü

Kanser; Normal olmayan hücrelerin çoğalması ve olgunlaşmasıdır. Vücudun diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün kaybolması ile karakterize olan bir hastalıktır. Kanserde temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır [29].

Kanser hücreleri toplanarak tümörleri oluştururlar, tümörler normal dokuların içine sızabilir yada tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan yada lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser vücutun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir. Metastaz olayı anjiyogeneze bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Bir tümör hücresinin metastaz yapabilmesi için damar içerisine girebilmesi, dolaşımında yaşamını sürdürebilmesi, hedef organda damar dışına çıkabilmesi, organ stromasına yerleşebilmesi ve burada anjiyogenezi uyarabilmesi gereklidir [29-31].

Kanser gelişiminden sorumlu pekçok gen bulunmaktadır. Bu genleri kısaca gruplarsak; onkogenler, tümör supresör ve apoptosiz ilişkili genler, hücre döngüsü kontrol genleri, hücre adezyonu ve hareketinde görev alan genler, ekstraselüler matriksi bozan enzimler ve anjiogenik faktörlerdir [29].

Ubikitin proteazom yolağında görev alan; E3 ubikitin ligazların çeşitli aracı moleküllerle birlikte kanser gelişimde rolü bulunmaktadır. Aracı moleküller içerdikleri protein domainlerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu domainler HECT, RING, SCF, ECV ve Cul4-tipi domainlerdir. Bu domainlerin kanser gelişimde ilişkili olduğu tümör baskılayıcı ve onkogen ürünleri ise TbetaR1, Smad 1, Smad 2, Smad 4, Smad5, Smad 7, p53, RB, p27, EGFR, beta-catenin, Ikb, Wee 1, Period, c-Myc, c-Myb, Cyclin E, c-Jun, Notch, mTOR olarak sıralanabilir [25].

Bir proteinin ubikitin-proteazom yolağı aracılığı ile yıkılması iki aşamayla başlar: Birinci aşama, hedef substratın ubikitin zincirlerine kovalent olarak tutunmasıdır. Ubikitin ile yıkılacak proteinlerin birleşimi; hücre siklusu kontrolü, DNA tamirini, ribozom benzeri organellerin biyosentezini, MHC sınıf 1 antijen sunumu ve enflamatuvar yanıtını, hücre yüzey proteinlerinin endositozu, iyon kanallarının modülasyonunu, nöronal ağların morfojenезini, Nf-kβ'ye bağımlı sinyalleme kaskadları, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesini, uzun süreli hafıza ve biyoritmin oluşumunu, apoptoz, farklılaşma, stres yanıtını ve protein kalitesinin kontrolünü içeren birçok hücre içi işleme katılır. Ubikitin-proteazom yolağındaki ikinci aşama ise ubikitine eklenen proteinin, ubikitini serbest bırakacak şekilde yıkımıdır [25].

Ubikitin sisteminin bazı N-myc, c-fos, c-jun, Src ve EGFR gibi kanseri uyaran büyüme faktörlerinin reseptörlerini hedef aldığı hatta doğrudan tümör baskılayıcı proteinlerin çalışmasında görev almaktadır [25].

1.5.2.1 Ras Aracılığı ile Kanserleşmeye Etkisi

RAS (Regulatör GTPases) genleri insan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan genler arasındadır. RAS sinyal yolağı, Tirozin Kinaz Reseptörleri (RTK) ile ilişkilidir. RAS geni etkinleşerek transkripsiyonunu harekete geçirecek olan protein kinazları c-RAF'tan MEK'e (Mitojen aktivite eden kinaz); MEK'ten MAP/ERK'e (Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar) etkinleştirir. Ras, Raf'ı hem direkt hem de dolaylı olarak etkinleştirir. Raf'ın tersiyer yapısı şaperonlarla stabilize edilir. Bir şaperon olan Hsp 90 (ısı-şok proteini 90)'ı bağlayan Geldanamisin, onun hedef proteinin katlanmasında aracı rolünü bozmaktadır. Hücrelere Geldanamisin uygulandığında Raf- 1 proteinlerinin birikimi gözlenmiştir. Raf-1 proteinlerinde bu artış ubikitinlenmelerini ve yıkımlarını uyarmıştır [25].

1.5.2.2 TGF- β ile İlişkili Kanserleşme

TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta) hem normal hem de transforme olmuş memeli hücrelerinde çeşitli hücre sel yanıt larda rol alan bir sitokindir. Smad'lar, TGF- β ' nın biyolojik etkilerini göstermesine aracı hücre içi moleküllerdir. TGF- β reseptörü fosforlanırsa Smad 3 çekirdeğe gider ve transkripsiyonel düzenlemeye katılır. Smad 3 ile etkinleştirilen TGF- β , ubikitin-proteazom yolağı ile yıkılır. Smad'larda oluşan herhangi bir genetik defekt, ubikitin proteazom yolağı ile yıkımlarına sebep olmaktadır [25].

1.5.2.3 Nf-k β Etkinliğinin Ubikitin-Proteazom Yolağı ile Dzenlenmesi

Nf-k β (Nkleeer Faktör Kappa Beta); sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, hücre-adezyon molekülleri ve yüzey reseptörleri benzeri molekülleri kodlayan genlerin dzenlenmesinde görevli bir transkripsiyon faktörüdür. Bu yüzden bağışıklık yanıtına, enflamasyona ve apoptoza etkin olarak katılmaktadır [25].

Nf-k β iki alt birimden oluşmaktadır. Alt birimlerin etkinliği proteozom aracılığıyla dzenlenir ve çalışmak için proteolize ihtiyaç duyar. Nf-k β 'nin etkinliği, IK β ile engellenmektedir. Nf-k β ; IK β ile inaktif hale gelmektedir. Nf-k β 'nin etkinleşmesi için inhibitör k β (IK β) ubikitinlenerek yıkılmaktadır [25].

1.5.2.4 TNF- α ve Ubikitin Proteazom Yolağı Arasındaki İlişki

TNF- α (Tümör Nekroze Edici Faktör); enflamasyona, enfeksiyona ve hasara yanıt olarak üretilen ve ateşte, akut-faz tepkimelerinde, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında ve apoptozda görev alan bir sitokindir. TNF- α 'nın uyarıldığı yolda IK β 'nin fosforlanarak, IK β 'nin proteozomal yıkımıyla sonuçlanır ve Nf-k β 'nin inhibisyonu ortadan kalkar [25].

1.5.2.5 Tümör Baskılayıcı Gen Olan p53'ün Dzenlenmesinde Ubikitin Proteazom Yolağının Etkinliği

p53; DNA hasarına ve ısı-şokuna, hipoksi ve hiperoksiye, onkogenler - replikasyon-mikrotübül inhibitörleri gibi toksinlere ve diğer stres çeşitlerine yanıt olarak hücre siklusu ilerlemesini bloke etmekten, büyümeyi baskılamaktan veya apoptozu başlatmaktan sorumlu bir çekirdek proteindir. MDM2 ve HSP70 gibi proteinler aracılığıyla p53 bloke edilerek ubikitinlenerek proteozomda yıkılmaktadır [25].

1.5.2.6 İlaç Direnci ve Ubikitin Proteazom Yolağı

İnsan tümörlerinde çokça ifade edilen ve tümör direnciyle ilişkisi kurulan POH1 (Proteazom 26S subunit non-ATPase 14) adlı proteinin amino asit dizisi, 26S proteozomun S12/p40 alt birimiyle anlamlı derecede benzerdir. POH1, AP-1 transkripsiyon faktörünü up-regüle eder ve bunun sonucunda çoklu-ilaç direnci gelişir. Proteozom/Ap-1(aktivatör protein 1) aracılı direncin, akut miyeloid lösemnin bir alt türünde kötü prognoza katılabileceği gösterilmiştir [25].

1.5.3 26S Proteazomun Kanslerle İlişkisi

1.5.3.1 Hücre Döngüsü Kontrolü

Hücre siklusunda bulunan kontrol noktaları G1/S, G2/M ve M/G1 geçiş noktalarında bulunmaktadır. Döngü sırasında meydana gelen hasar bu kontrol noktalarında fark edilerek tamir edildiğinde döngünün devam edilmesi sağlanır. Ancak kanser gibi durumlarda kontrol noktaları işlevsiz kalmaktadır. Bunun sebebi ise kontrol noktalarında etkili bazı genlerin mutasyona uğramasıdır. Bu genler ise şunlardır; cdc2, cdc37, pRB, siklin A, siklin B, sekurin, Pds1p, Siklin D1 ve E'dir. Yıkımları ise 26S proteazomda gerçekleşmektedir [25].

Hücre döngüsünün ilerlemesi spesifik siklinler tarafından aktifleştirilen siklin bağımlı kinazlar (CDKs) tarafından kontrol edilir. Mitotik siklinler hücre içinde kısa yaşam süresine sahip proteinlerden biri gibi sadece birkaç dakika yaşam süresine sahiptir. CDK-siklin kompleksi oluştuktan sonra görevli siklin poliubikitinlenir ve proteazom tarafından yıkılır. Bu döngü hücre döngüsünün yapılandırılmasını sağlamaktadır. Özellikle, mitoz çıkışını düzenleyici bileşen siklin B proteazom-bağımlı ayrışmayı gerektirir [32]. Omurgalı hücrelerinde erken mitoz döngüsünde kontrol noktası "S evresi" olmadan da bu ayrışmalar gerçekleşebilir [33].

Erken hücre döngüsü kontrol noktası örneğn G₁ fazı ve S fazı arasında ki sonraki aşamaların kısıtlanması açıklaması ile bu noktada E3 ubikitin ligaz anafaz

yönetici kompleksi (APC) tarafından ubiquitinlenen siklin A'yı proteazom içerisine taşıyarak burada yıkılmasını sağlamaktadır [34].

APC (Adenomatous polyposis coli) proteini ve SCF (Skp1/Cul1/F-box) protein kompleksi siklin yıkımında ve kontrol noktalarında iki anahtar düzenleyicidir. SCF kendisi ubiquitinlenen adaptor proteindir ve APC tarafından düzenlenir. SCF aktivasyonunu ise Skp2 G1-S geçişi öncesi önler [35].

19S partikülünün bileşenleri kendi düzenleyici rollerine sahiptir. Gankyrin onkoproteindir ve 19S partikülün alt bileşenlerinden biridir. Bu protein siklin bağımlı kinaz CDK4 sıkıca bağlanır ve ubiquitin ligaz MDM2 afinitesi ile p53'ün ubiquitinlenerek tanınmasında önemli bir rol oynar. 26S proteazomun bir bileşeni p28^{Gank} (Gankyrin)'dir. Bu bir şaperon olarak görev yapar Gankyrin anti-apoptotiktir. Hepatocellüler karsinoma (karaciğer kanseri)'de görev yapan bir onkogendir. p28'nin karaciğer kanser hücresinde aşırı ifadesi Hif (Hipoksiya'ya bağlı faktör) aktivitesini arttırmaktadır [36]

1.5.3.2 Apoptoz

İç ve dış sinyaller apoptoz ya da bir diğer ismiyle programlanmış hücre ölümünün indüklenmesine neden olabilir. Hücre bileşenlerin ortaya çıkmasına sebep olan parçalanma kaspaz adı verilen özel bir proteaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Fakat proteazom apoptotik süreçte ayrıca önemli ve çeşitli roller oynamaktadır. Proteazomun bu süreçteki işlevi hem protein ubiquitinasyonundaki artış ile hem de E1, E2 ve E3 enzimleri apoptoz sırasındaki süresiyi daha iyi göstermektedir [37-39].

Apoptoz sırasında; nükleusa yerleşen proteazom apoptozun karakteristik dış membrandaki baloncuklarına transloke olduğu gözlenmiştir [40]. Proteazom inhibisyonu farklı hücre tiplerinde apoptoz indüklendiğinde farklı etkilere sahiptir. Çalışmalarda görülen proteazom birçok hücre tipinde pro-apoptotik süreci engellemesine rağmen apoptozis için gerekli değildir. Büyüyen hücre döngüsü proteinlerinin yıkımını apoptoz sırasında düzenlemektedir [41]. Bazı hücre hatlarında, özellikle hareketsiz ve farklılaşmış hücrelerden oluşan primer kültürler timositler ve nöronlar gibi, proteazom inhibitörleri ile maruz bırakıldığında

hücrelerin apoptoza geçişi engellenmektedir. Bu etki mekanizması açık değildir fakat pasif durumdaki spesifik hücreler yada pro-apoptotik kinaz JNK'nın (Jun amino-terminal kinaz) farklı aktivitesinin sonucu olabileceği düşünülmektedir. Hızlıca bölünen hücrelerde apoptozu indükleyen proteazom inhibitörlerinin bortezomid ve salinosporamide A'nın yeteneği; yeni gelişen birkaç kemoterapi de yararlanılmaktadır [42].

1.5.3.3 Hücre Stresine Cevabı

Hücresel stresin sebepleri; enfeksiyon, ısı şoku yada oksidatif stresdir. Stresin artmasına bağlı olarak yanlış katlanmış yada katlanmamış proteinler tanımlanarak proteazom yıkımında hedef haline gelmesi artmaktadır. Hsp27 ve Hsp90 şaperon proteinler süreç içinde doğrudan katılımcı olmasalarda her ikisinde ubikitin proteazom sisteminin aktivitesinin artmasında sorumludur [43]. Diğer yandan Hsp70 yanlış katlanmış proteinlerin proteazomda yıkımında CHIP (ko-şaperon) adı verilen E3 ubikitin ligaz ile birlikte proteinlerin yüzeylerine bağlanarak hidrofik yapılara maruz kalır [44].

Aynı mekanizma proteazom sistemi yoluyla oksidatif zarar görmüş proteinlerin yıkımını yönetmek içinde bulunmaktadır. Özellikle; çekirdekte bulunan proteazomlar PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) tarafından düzenlenir ve aktif olarak uygun olmayan şekilde okside olmuş histonların yıkımda sorumludurlar [45].

Okside olmuş proteinler sık sık hücrelerde geniş şekilsiz agregatlar halinde bulunur. Bu proteinler direk olarak 20S kor partikül ve 19S düzenleyici partikülde yıkılır. ATP hidrolizi ve ubikitinle işaretlenmesine gerek yoktur [46]. Fakat yüksek seviyedeki oksidatif zarar protein fragmentleri arasında kros-linking derecesine ve proteolize dirençli agregatlara bağlıdır. Birçok sayıda ve büyüklükteki yüksek okside olmuş agregatlar yaşlanmayla ilişkilidir [47].

1.5.3.4 İmmün Sistemdeki Görevi

İmmün sistem fonksiyonlarında proteazom basit rol oynar fakat kritik bir rolü vardır. MHC sınıf 1 antijenlerin işlenmesinden 26S proteazom sorumludur. MHC molekülleri, T hücrelerinin protein yapıdaki antijenleri tanınmasında rol oynar. Proteinlerin proteazom tarafından yıkım için ubiquitin takılarak hedeflenmektedir. Tümörlerde MHC sınıf 1 (Major histocompatibility kompleks sınıf 1) ile tanımlı peptid sunumunun modifiye olduğunu gözlenmiştir. Bu yüzden ubiquitin proteazom yoluyla aracılı yıkımda değişiklikler meydana gelmiştir. T hücreleri tarafından tanınabilir antijen işlenmesi ve fark edilmesinde yetersiz kalan tümör hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeyecekleri için seçici bir avantaja sahip olmaktadır [25].

Önemli doku uyumlu kompleks (MHC) peptidi antijen yüzeyinde bulunan hücrelerde görülmektedir. Bu peptitler; proteazomla yıkılan proteinleri üretir. Yapıcı olarak proteazom tarafından ifadelerine rağmen bu süreçte yer alan protein bileşenleri özelleşmiştir. Proteinlerin ekspresyonu interferon gamma tarafından indüklenmektedir. Birincil üretilen peptitler büyüklüğü optimaldir ve MHC'ye bağlanır. Bu proteinlerin ekspresyonu hastalık sırasında 11S düzenleyici partikül indüklenmesiyle yükselir ve MHC ligandların üretimini düzenlenmesinde biyolojik rolü bilinmektedir. MHC sınıf 1 güçlü ligand bağlayıcılar ligandın C-terminal ucuna bağlıdır. Peptitler hidrojen bağları ile bağlanır. MHC yüzeyindeki bu yapıya "B pocket" adı verilmektedir. Birçok MHC sınıf 1 allelleri hidrofobik C-terminal amino asitlerini tercih eder ve immunoproteazom kompleksinin C-terminali hidrofobik yapıdadır [48].

Proteazom aktivitesine iltihaplı ve otoimmün hastalıklarında rastlanmaktadır. Genel rolü ise Nf-k β aktivasyonu, anti-apoptotik ve proinflamator sitokin ekspresyonu düzenlemektir. Proteazom aktivitesi seviyesinin yükselmesi hastalık aktivitesi ile koreledir [49]. Ayrıca proteazom virionlara bağlanarak proteolizi yöneten hücre içi antikor içermektedir. Bu yolla, TRIM21 (üçlü motif ailesinin bir üyesi) immüoglobülin-G'ye bağlanarak direk proteazomlarda yıkılmasını sağlar [50].

1.6 26S Proteazom İnhibitörleri

Proteazom inhibitörleri hücre kültüründe hücre döngüsü proteinlerinin büyüme öncesinde yıkımını düzenleyip bozarak apoptozun indüklendiği durumlarda anti-tümör etkilidir [51]. Ancak tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesi seçicidir. İnsan denemelerinde ve hayvan modellerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Lactacystin doğal olarak *Streptomyces bacteria*'dan sentezlenerek üretilmiştir. Bu ilk peptitik proteazom inhibitörüdür. Biyokimya ve hücre biyoloji araştırmalarında çok sık kullanılmaktadır. Lactacystin; proteazomun alt unitesi amino terminal threonin katalitik β alt ünitelerini kovalent olarak modifiye etmektedir. Özellikle proteazomun β 5 alt ünitesinin kimotripsin benzeri aktivitesinden sorumludur [52-53].

Bortezomib; Millennium Pharmaceuticals tarafından keşfedilen bir moleküldür. Velcade adı altında pazarlanmaktadır. İlk proteazom inhibitörleri hakkında yapılan klinik araştırmalarda kemoterapi ajanı gibi kullanılmıştır [54]. Bortezomib; multiple myeloma'ya uygulanarak kullanılmaktadır [55]. Özellikle; multiple myeloma kan serumunda proteazom seviyesinin yükseldiği gözlenmektedir [56]. Hayvan çalışmalarında ise pankreas kanserinde klinik olarak önemli belirtiler göstermektedir [57,58].

Klinik öncesi ve klinik sonrası çalışmalarda bortezomib'in etkinliği diğer B hücreleriyle ilişkili kanserlere uygulandığında incelenmeye başlanmıştır [59]. Klinik sonuçlar B-hücreli akut lenfoblastik lösemnin tedavisinde kemoterapi ile proteazom inhibitörünün birlikte kullanılmasını önermektedir [60]. Proteazom inhibitörleri glukokortikoid'e dayanıklı lösemi hücrelerinin olduğu bazı tip kültürleri öldürebilmektedir [61].

Ritonavir molekülü, Norvir adı altında pazarlanmaktadır. Proteazom inhibitörü olarak geliştirilmiştir. HIV enfeksiyonu hedeflemek amacıyla kullanılmaktadır. Hayvan modeli çalışmalarında ritonavir; beyin tümörü hücrelerinin büyümesinde inhibitör etkisi bulunmaktadır [62].

Proteazom inhibitörleri ayrıca hayvan modellerinde, otoimmün hastalıkların tedavisinde umut verici olduğu gösterilmiştir [63].

1.7 26S Proteasome Non-ATPase Regulatory Subunit4 (PSMD4)

PSMD4 geni insan genomunda kromozom 1'in q kolunun 21.3 bölgesinde yer almaktadır. Bu gen 26S proteazomun alt ünitesi olan 19S düzenleyici partikülde bulunan proteini kodlamaktadır. Poliubikitinlenen proteinlerin yıkımından sorumludur [64].

Literatürde birçok adları bulunmaktadır. Bunlar; 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit4 (PSMD4), Angiocidin (Angiosidin), RPN10 homolog, Antisecretory factor 1, S5a/antisekretory faktör 1, Multubikitin chain binding protein, 26s proteasome regulatory subunit 5'dir [64].

PSMD4 geninin kodladığı 3 protein bulunmaktadır. Bu proteinler S5a, ASF ve Angiosidin'dir. Data analizi yapıldığında S5a ve ASF proteinlerinin amino asit dizilimleri aynıdır. Ancak angiosidin proteini bu iki proteinden karboksil ucunda bulunan fazla 3 amino asit ile farklılık göstermektedir. Amino asit dizilimdeki bu farklılık genel yapısında değişikliğe sebep olmamaktadır. Ancak S5a ve ASF proteinlerinin amino asit dizilimleri tamamen aynı iken işlevleri birbirinden oldukça farklıdır. Angiosidin ve S5a arasındaki farklılığa rağmen genel işlevleri konusunda benzerliklere rastlanmıştır [65].

1.7.1 S5a Proteini

S5a; 26s proteazom enzim kompleksinin internal poliübikitin tanıma alt birimidir. Proteazom enzim kompleksini bağlar. Hedef proteinlerin yıkımı için sinyal yollar. Poliübikitinlenmiş proteinlerin yıkımından sorumludur [66].

S5a'nın genel görevi ubikitinlenmiş proteinlerin yıkımından sorumlu olmasına rağmen son zamanlarda yapılan çalışmalarda kanserleşme sürecinde etkili olduğu görülmüştür. Özellikle angiosidin ve S5a'nın benzer amino asit dizilimi,

angiosidin'in S5a'ya benzer poliubikitinleşme süresindeki işlevi sebebiyle araştırmacıları S5a ve kanser arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönlendirmiştir [67].

2014 yılında Wang ve ekibi tarafından yapılan çalışmada hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri adı verilen DR6'lar S5a'nın ubikitin etkileşim motifi olan UIM'ler ile etkileşime geçmektedir. Serbest halde kalan S5a seviyesine bağlı olarak hücrelerin farklılaşması artıp azalmaktadır. S5a proteindeki artış Nf-k β yolağını aktifleştirmiştir [67].

Apoptoz çok hücreli organizmalardan meydana gelen programlanmış hücre ölümünün bir sürecidir. Apoptotik hücre fagositik hücreler tarafından özel olarak tanınır, yutulur ve apoptotik hücre bozulur. Akut myeloma kanser tipinde yapılan çalışmalarda angiosidin ve S5a'nın bu hücrelerin fagositik hücreler gibi farklılaşmasına sebep olduğu gözlenmiştir [68].

c-myb'nin THP-1 farklılaşması sırasında önemli rol oynadığı gözlenmiştir. C-myb; PMA ile muameleden sonra, THP-1 farklılaşmasını aracılık eden bir anahtar bir moleküldür. Birçok downstream moleküllerin ekspresyonunu düzenleyerek THP-1 farklılaşmasını yönetir [69]. Daha önceki araştırmalarda c-myb'nin hücrelerin stabilitesini koruduğu gözlenmiştir. Onun regülasyonunun düşmesi bazı hücrelerin farklılaşmasına sebep olduğu görülmüştür [70]. Yüksek ekspresyonu ise monosit farklılaşmasını bloke eder. Nf-k β yolağı aktive edildiğinde WT1 ekspresyonu artmaktadır. WT1; c-myb'nin promotorüne bağlanmaktadır [71]. T ve B hücre hattında c-myb ekspresyonu durduğu gözlenmiştir. Hücrelere S5a muamelesinden sonra, WT1 THP-1 hücrelerinin farklılaşmasını teşvik ettiğini kanıtlamıştır. Ayrıca, c-myb transkripsiyonunu bastırıldığı gösterilmiştir [72].

P53; E3 ligaz proteini Mdm2 (Fare çift dakika 2 homolog) ile ubikitinlenerek 26S proteazomda yıkılmakta olduğu bilinmektedir. 2013 yılında Sparks ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada p53'un yıkımına ubikitin reseptör S5a etkilidir. S5a aktivitesi siRNA ile susturulduğunda p53 proteini birikimi görülmüştür. Ancak Mdm2 yıkımı yolağında S5a proteinin görev almadığı görülmüştür [73].

Lewitzki ve arkadaşları 2006 yılında yaptığı çalışmada; S5a'nın geni olan PSMD4'ün (26S proteasom subunit S5A) (-1200/+348) promotor bölgesini

klonlamışlardır. Promotora bağlanan transkripsiyon faktörlerini incelemişler ve WNT yolağında görevli Tcf/Lef1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasının oldukça dikkat çekici olduğu görülmüştür. Promotore bağlanan diğer faktörlerin ise; p53 ve Hif1 α (-71/-51) olduğunu protein çalışmaları ile göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada; β -catenin/Lef1 yolağında PSMD4'ün yeni bir gen olabileceği hipotezi ortaya konulmuştur [74].

Src (Proto onkogen tirozin protein) familyasına ait kinazlar, hücre farklılaşmasında çok sayıda hücrenel süreçlere katılır. STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla Src; antiapoptotik Bcl-XL proteininin ekspresyonuna neden olur. Src uyarılması fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) / Akt modülü devreye girer. Antiapoptotik sinyalde bu durum anahtar rol oynar. 2006 yılında yapılan çalışma; Src tarafından düzenlenen yeni antiapoptotik hedef genleri tanımlamak için araştırmalar yapılmıştır. Src kinaz inhibitör PPI duyarlı koloniler taranarak Src inhibitörüne karşı en güçlü koloni seçilmiştir. Bu kolonin S5a'nın apoptotik aktivitesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki; S5a geninin antiapoptotik aktivitesine Src ve diğer antiapoptotik proteinler etkili olmaktadır. Bu sonuç bize; pozitif Src'nin transkripsiyonel seviyede S5a'yı düzenlediği göstermektedir. PP1 (Src inhibitörü: 4-amino-5-(4-metilfenil)-7-(t-bütül) pırazol[3,4-d] pirimidin) tarafından indüklenen apoptozisde S5a seviyesindeki azalma proteazomal degradasyonun inhibisyonunun sonucudur. Protein birikiminde apoptozis sürecini kolaylaştırmaktadır [74].

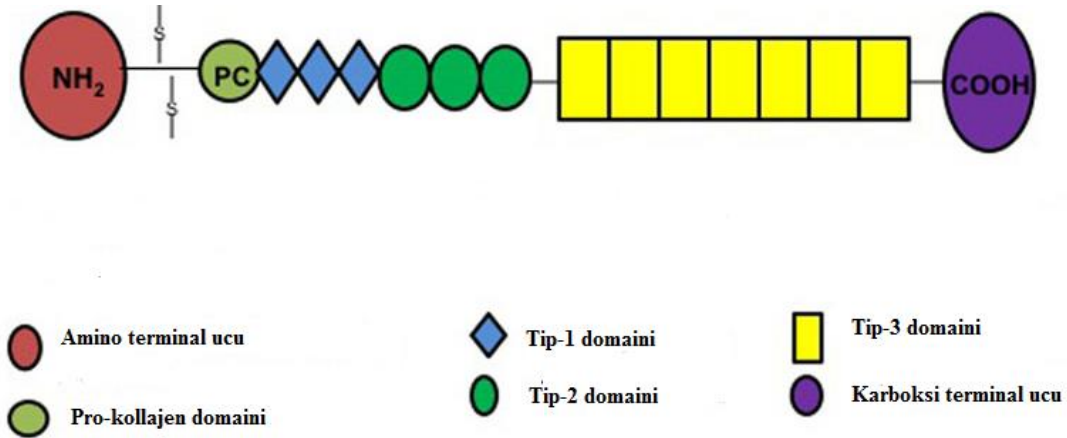
1.7.2 ASF (Anti-Sekretory Faktör) Protein

ASF 41 kDa büyüklüğünde ve plazmaya bağlanan bir proteindir. ASF memelilerin dokularında sentezlenmektedir. Sitoplazma ve çekirdek içinde 26S proteazomu bağlantılı veya serbest bulunabileceği tespit edilmiştir [76].

Antisekretory faktör (ASF) memelilerde plazma ve diğer akıcı dokulardan salgılanan bir proteindir. Kanıtlanmış salgı kesici ve anti-enflamatuar aktivitesi bulunmaktadır. İmmünohistolojik dağılımı bağışıklık sisteminde rol oynadığını düşündürmektedir. Sıçanlarda kolera toksin kaynaklıdır. Bağırsak sıvı salgılanmasını inhibe etmektedir [76].

1.7.3 Angiosidin

Thrombospondin-1 (TSP-1) bir glikoproteindir. TSP-1; 5 üyeli thrombospin ailesinin üyesidir. Amino terminal ucunda heparin bağlayıcı domain, prokollagen domaini, tekrarlı tip1 domaini ve globular karboksi terminal domainleri bulunmaktadır. İçerdiği farklı domainler sayesinde birçok farklı görevleri bulunmaktadır. Başlıca işlevi tümör büyüme mekanizmasındaki görevidir. Tümörlü hücrenin metastas ve ilerleme mekanizmasından sorumlu olduğu bilinmektedir [77].



Şekil 1.5: TSP-1 proteini domain yapısı [77].

Hangi TSP-1 domainin tümörlü hücrenin metastası sırasında hücre ile etkileşimde olduğu merak edilmiştir. Bunun üzerine yapılan çalışmada; TSP-1'in tekrarlanan bölgesi tip-1'de ki mevcut CSVTCG bölgesine bağlanan peptidler ile beraber trombosit toplanmasını ve tümör hücre metastası sırasında TSP-1'in yapışma etkileşimlerinde aracılık ettiği sonucuna varılmıştır [78]. Bu bilginin üzerine 1993 yılında Tuszynski ve arkadaşları tarafından; akciğer kanserinden TSP-1 proteinin tekrarlanan domainine bağlanan CSVTCG peptiti sefroz kromatografisi ile izole edilmiştir [79].

2004 yılında Tuszynski ve ekibi PC-3 (prostat kanseri) cDNA kütüphanesi kullanılarak CSVTCG peptidini klonlamışlardır. Rekombinant bu proteine 'ANGİOSİDİN' adı verilmiştir. Protein 41 kilodaltondur. Hem salgılanan hemde hücre içi bir proteindir. Hücre içi olması onun TSP-1 proteini ile ilişkilmesini sağlamaktadır [80].

1.7.3.1 Angiosidin ve Kanser

Angiosidin'in TSP-1'e bağlandığı in vivo şartlarda kanıtlanmıştır. TSP-1 ile beraber tümör büyümesi, anjiogenez, tümör invazyonunu durdurmada rol oynamaktadır. İronik olarak, angiosidin doğal olarak tümörler tarafından üretilen anjiogenez inhibitörüdür. Tümörler kendi büyümelerini baskılar ve anjiogenezis aracılığıyla anjiogenezin endojen inhibitörüdür. [80]

Yapılan çalışmalarda angiosidin'in endotel hücrelerinde apoptozu indükleyerek tümör büyümesini ve anjiogenezini engellediği görülmüştür. Rekombinant angiosidin'in yapılan data analizi sonucu S5a'ya benzerliği; poliubikitin bağımlı bir protein olan S5a gibi angiosidin'de poliubikitin bağlanma aktivitesinden dolayı anti-endotel yeteneği olabileceği düşünülmüştür. Bunun üzerine 2005 yılında Tuszynski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; HUVE hücreleri kullanılarak angiosidin'in tahmini poliubikitin bağlama bölgelerinin S5a ile benzerlik gösterdiğini analiz etmek amacıyla mutasyonlar oluşturulmuştur. Poliubikitin bağlanma bölgesinde mutasyon yapılan angiosidin'in kısmen apoptotik yeteneğini kaybettiği görülmüştür. Angiosidin HUVE hücrelerinde apoptozu indüklerken proteazomun ubikitin ilişkili sistemi ile ters çalışmaktadır [65].

2006 yılında Tuszynski ve ekibi tarafından HUVEC hücrelerinde siRNA kullanılarak endojen angiosidin ekspresyonu durdurulmuştur. Angiosidin susturulunca MMP-2 ekspresyonunun düştüğü gözlenmiştir. Angiosidin susturulup ekspresyonu düşünce hücreler daha yavaş büyüyüp, saldırgan olmuşlardır. Hücrelerde siRNA ile susturulduğunda poliubikitinasyon seviyesi ise yükselmiştir. Endotel hücrelerde angiosidin; invazyon, adezyon ve anjiogenezde görev alır. Bu olayda poliubikitinasyona bağımlı proteinin parçalanarak MMP-2 ekspresyonunun etkilendiği görülmüştür.[81]

2006 yılında Tuszynski ve ekibi angiosidin'in antitümör ve anti-anjiogenik aktivitesindeki mekanizmasında integrinler ve angiosidin proteini arasındaki ilişki üzerine bir çalışma yapmıştır. İntegrin katılımlı tümör hücre migrasyonu ve metastası çok geniş araştırılmış ve tartışılmıştır. Özellikle $\alpha 2\beta 1$ integrin birçok tümör hücrelerinde bulunur. Ancak; melanoma, rhabdomysarcoma, hepatocellular karsinoma, ovaryum epitelyum karsinoma, meme kanseri ve prostat karsinoma

normal bir doku ile karşılaştırıldığında, integrin ekspresyon seviyesinin tümör dokusunda genellikle daha düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ise; angiosidin'in tanımlanan 20 amino asitlik bölgesi $\alpha 2\beta 1$ integrine bağlanır ve bu kompleks angiosidin'in anti-anjiogenik ve antitümör aktivitesini taklit eder. Bu sonuçlara göre angiosidin tümör büyümesini regüle ettiği ve $\alpha 2\beta 1$ antagonisti olduğu görülmüştür [82].

Karaciğer kanseri hastaları üzerinde 2006 yılında klinik bir çalışma yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerin serumlarında angiosidin seviyesi incelenmiştir. Eliza testi ile değerlendirilen sonuçlarda; hasta bireylerde angiosidin miktarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Angiosidin'in yeni bir tümör marker olabileceği vurgulanmıştır [83].

2007 yılında Albo ve arkadaşları kolon kanseri üzerinde angiosidinin inhibitör peptitleri ile araştırma yapmışlardır. Tümör büyümesi ve anjiogenezde önemli aracı hedef angiosidin'in iki inhibitör peptiti geliştirilmiştir. Bu çalışmada; insan kolon kanseri örneklerinde angiosidin ekspresyonu incelenmiştir ve angiosidin engelleyici peptitlerin kemoterapik etkinliği araştırılmıştır. Primer tümörlerde %89 ve % 91 pozitif lenf nodlarında angiosidin ekspresyonu görülmektedir. Normal kolon örneklerin % 94'ünde negatiftir. Normal lenf nodularinde ise negatiftir yada örneklerin % 79'unda zayıf bir şekilde pozitiftir. Geliştirilen angiosidinin iki inhibitör peptidi tedavi gruplarındaki hayvanların kontrol hayvanları ile kıyaslandığında sağlık ve iç hastalık durumunda bir gelişme göstermektedir. Peptit büyüklüğü artırılarak primer tümörlere uygulandığında ise tümör hacminin oldukça küçüldüğü görülmüştür. Angiosidinin ekspresyonu primer tümör peptitlerinin uygulandığı farelerde tümör yükü kıyaslandığında benzer sonuçlar gözlenmiştir [84].

2008 yılında Dimitrov ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; angiosidinin antitümör aktivitesi farklı bir yönden incelenmiştir. Angiosidin birçok domaini bulunan anjiogenez ve tümör büyümesinde önemli bir inhibitör olan bir proteindir. Birçok domainin olması onun anti-anjiyogenik aktivitesi ve hücre matriks ilişkisi gibi birçok mekanizmada etkili olmasına sebeptir. Bu çalışmada ise diğer aktivitesi olan antitümör yeteneği üzerinde çalışılmıştır. Angiosidinlerin proinflamator sitokinlerin salınmasını sağlayarak monositleri aktifleştirdiği ve onların makrofaj

benzeri hücreler gibi farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir. THP-1 hücreleri angiosidin ile indüklendiğinde hücrelerin adherent ve fagositik olduğu gösterilmiştir. Makrofaj markerlarının salınımını ve MMP-9 salınımı hızlandırmıştır [85].

Angiosidin uygulanan ve uygulama yapılmayan THP-1 hücrelerinde mikroarray analizi yapıldığında p105/p50, p100/p52 ve relB'nin Nf-k β yolağı bileşenlerinin up-regüle olduğu görülmüştür. Mikroarray datalarında angiosidinin ik β , p50 ve p65'i fosforillediği ve çekirdekte p50 ve p65 translokasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Angiosidin'in; Nf-k β , MAPK ve P13K yolaklarında up-stream mediatörleri aktive ettiği görülmüştür. Nf-k β ve MAPK aktivasyonu küçük inhibitörler ile engellendiğinde THP-1 hücrelerinde angiosidin aracılı sitokin salımı önlenmektedir. Fakat hücrelerin yapışkan fenotipi engellenmemektedir. P13K engellendiğinde sitokin salınımı ve yapışkan fenotipte engellenmektedir. Çalışmada angiosidinin sitokin salınımıyla monositleri aktifleştirdiği ve onları en az iki yolda makrofaj benzeri fenotipe farklılaştırdığı sonucuna varılmıştır [85].

2008 yılında Tuszynski ve arkadaşları; angiosidin'in öncül inflamator sitokin üretimini ve sklerozisde antijen oluşumunu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Daha önceki çalışmalarda angiosidin anjiogenez ve *in-vivo* tümör büyümesinde önemli bir inhibitör olduğu tanımlanmıştır. Kanserdeki rolüne ek olarak, son çalışmalar angiosidinin bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada; angiosidin ekspresyonunu ve çeşitli skleroz hastalarındaki fonksiyonu tanımlanmaktadır. MS (Multiple sklerosis) hastalarının beyin lezyonlarında angiosidin ve interlökin 7'nin overekspre olduğu gösterilmiştir [85].

Angiosidin monositler, periferel kan T hücreleri ve birincil astrositlere uygulandığında çeşitli sitokinler ve kemokinler IL-6, IL-7, GM-CSF ve MCP-1 salınımını indüklenmektedir. Hücre kültüründe rekombinat angiosidin; monositlerin makrofaj benzeri hücrelere farklılaşmasını yönetebilmektedir. Ayrıca; bu hücreler de MHC sınıf 1 ve sınıf 2 gen ekspresyonuna indüklemektedir. CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerini aktive etmektedir. Bunlarla birlikte angiosidin; mononükleer fagositik migrasyonu ve otolog mononükleer fagositler tarafından hücrelere verilen spesifik T antijenin hücrelerdeki myelin basit protein peptitlerin IL-2 yanıtının artmasını indüklemektedir. Ayrıca angiosidin ile uyarılan mononükleer fagositlerde T hücreleri

ve birincil astrositlerin STAT3 ekspresyonu incelenmiştir. Hücre popülasyonunda STAT3 ekspresyonunun angiosidini belirgin olarak uyardığı belirlenmiştir [86].

2009 yılında Albo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sarkoma hücrelerinde angiosidinin rolü araştırılmıştır. Angiosidin ekspresyonunun bu hücrelerde epitelyum hücrelerine benzer seviyede olduğu gözlenmiştir. Ayrıca MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun angiosidin ekspresyonuna bağlı artış ve azalış gösterdiği incelenmiştir [87].

2009 yılında ise Tuszynski ve ekibi angiosidin'in tTagase-2 (doku transglutaminas)'a epitelyum hücrelerinde bağlandığı gösteren çalışmalar yapmışlardır. İntegrin $\alpha 2\beta 1$ ve THP-1'e bağlanarak angiosidin'in antitümör ve tümör yayılmasını engelleme yeteneğinin tTagase bağlanarakta gerçekleştirdiği deneyler ile kanıtlanmıştır [88].

2011 yılında Tuszynski ve ekibi tarafından meme kanseri hücrelerine angiosidin uygulanarak ekspresyonu ve hücrelere sebep olduğu değişimler gözlenmiştir. EGFR ve Nf-k β yolaklarını aktive ettiği görülmüştür. Ayrıca; bu yolakları up-regüle eden sorumlu genlerinde angiosidin varlığında regülasyonu arttığı incelenmiştir [89].

2012 yılında ise Koch ve arkadaşları; serviks kanseri hücrelerine angiosidin uygulandığında GINS1, PAK2, DTL, AURKA, PRKDC, NEK2 ve CEP55 genlerinin ekspresyonunun arttığını mikroarray çalışmalarında gözlemişlerdir [90].

2013 yılında Sun X. ve arkadaşları angiosidin artışının HepG2 hücre proliferasyonuna etkisini merak etmişlerdir. Çalışmada iki tip karaciğer kanser hücre tipi kullanılmıştır. Bunlar; HepG2 ve SMMC-7221'dir. Çalışmada kullanılan iki tip karaciğer kanseri hücresinde yüksek seviyede angiosidin gözlenmiştir. Angiosidin proteini üretimi HepG2 hücrelerinde siRNA'lar tarafından belirgin şekilde azaltılmıştır. siRNA-angiosidin HepG2 hücrelerine transfekte edildiği zaman, bu hücrelerin kontrol hücrelerine kıyasla çok yavaş proliferasyon aktivitesi göstermiştir. Karaciğer hücrelerinde angiosidin susturulduğunda proliferasyon aktivitesi azaltılmaktadır. Diğer karaciğer kanseri hücre hattında da aynı sonuçlar gözlenmiştir [91].

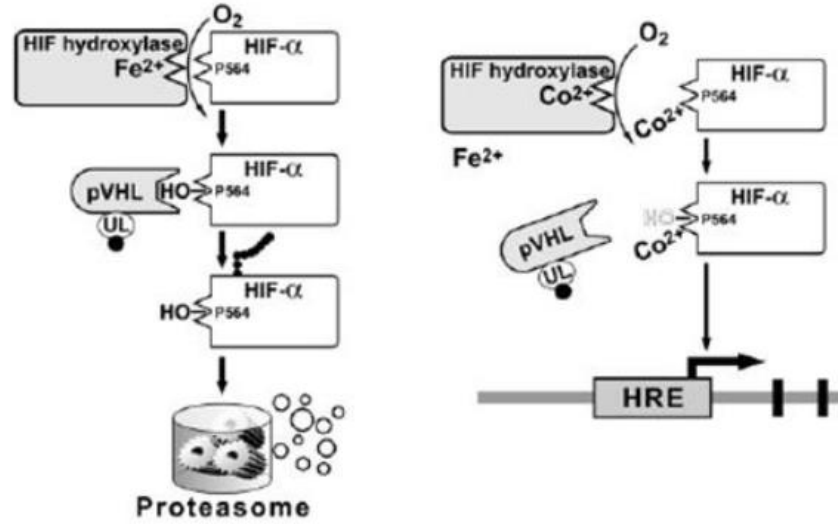
1.8 Hipoksi

Hipoksi; O₂ oranının azalmasıdır. Hipoksiyaya cevap olarak hücreler bu duruma adapte olabilmek için anjiyogenez, eritrosit üretimi, hücre hayatta kalması ve metabolizmayı kapsayan genlerin transkripsiyon seviyelerini değiştirirler. Bu koşullarda HIF-1 ve HIF-2 aktive olur.[92]

HIF-1 α (hipoksi-indüklü faktör 1 alfa) bir basit helix yuvarlak PAS (Per/Arnt/Sim) transkripsiyon faktördür. Hipoksik koşullar altında partner faktör ile dimerize olmaktadır. Temel-helix-loop-helix/PAS protein Arnt, hedef genlerin hipoksi-duyarlı elemanları tanımak içindir. HIF-1 iki alt üiteden oluşmaktadır; HIF-1 α ve HIF-1 β . HIF-1 α , O₂le regüle olan domain içermektedir. Normal koşullarda HIF-1 α alt ünitesi prolin hidroksilazlar tarafından hidroksillenmektedir. O₂ bağımlı degradasyon domaininde korunmuş 2 prolin residüsü bulunmaktadır. Nükleusta HIF-1 β ile dimerleşir ve spesifik HREs (Hipoksi Response Elements) bağlanır. Yaklaşık olarak tüm genlerin %2.6'sı HIF-1 aktivasyonu ile regüle olduğu bilinmektedir [92-94].

1.8.1 Kimyasal Hipoksi

Prolin hidroksilazlar oksijenin yeterli olduğu durumlarda HIF-1 α 'e bağlanarak aktivitesini durdurur. Görevini yapamayan HIF proteini proteazomlarda yıkılır [84]. Ancak O₂ yetersizliğinin olduğu durumlarda prolin hidroksilazlar HIF-1 α 'ya bağlanamaz. CoCl₂'de kimyasal yolla O₂ yetersiz bir ortam sağlar. Prolin hidroksilazlar HIF-1 α 'ya bağlanmaz ve protein aktif hale geçer. Oksijen yetersizliği seviyesine ulaşarak, hipoksi ile regüle olan genlerin transkripsiyonlarını etkiler [95-96].



Şekil 1.6: HIF-1 α 'nın çalışma prensibi [31].

1.8.2 Hipoksi ve Proteasom İlişkisi

HIF-1 α çok kısa hayat döngüsüne sahip bir proteindir. İşlevini gerçekleştirdikten sonra eski haline dönmesi birkaç dakika aralığındadır [97]. HIF-1 α fonksiyonu ve protein seviyesi hipoksik ortamda artmaktadır [98-100]. Ancak 26S proteazom inhibitörlerinin HIF-1 α protein seviyesine etkisi bilinmemektedir. Geniş spesifitedeki inhibitör, LLnL ve yüksek spesifitedeki lactasistin metaboliti, klasto-lactasistin β -lakton, normal koşullar altında HIF-1 α birikimine sebep olmaktadır. Bu gözlemler ile anlaşılmaktadır ki; benzer proteazom inhibitörleri normoksik hücrelerde HIF-1azArnt kompleksinin DNA bağlama aktivitesini indüklemektedir. DNA bağlanma aktivitesinin yükseltilmiş seviyesi özellikle HIF-1 α protein seviyesinin yükselmesine sebep olur. Çünkü Arnt seviyesinde proteazom inhibitörleri varlığında bir değişiklik gözlenmemiştir. HIF-1azArnt kompleksinin DNA bağlanma aktivitesine rağmen proteazom inhibisyonu koşulları altından indüklenme görülmektedir [101]. Bu tepki, hipoksi yanıt elementi bağımlı bildirici gen ifadesi harekete ile ilişkili değildir. HIF-1 α fonksiyonel olmayan formun birikmiş olduğu düşünülmektedir. HIF-1 α 'nın yıkımı poliubikitinasyon ile mümkündür. Yapılan çalışmalarda proteazomu engelleyici yapıların varlığında yıkım durmaktadır. Ayrıca; HIF-1 α 'nın normoksik koşullarda multiubikitinlenmesinin büyük önemi vardır. Çünkü 26S proteazomda hedeflenen bütün proteinlerin ubikitinlenmediği

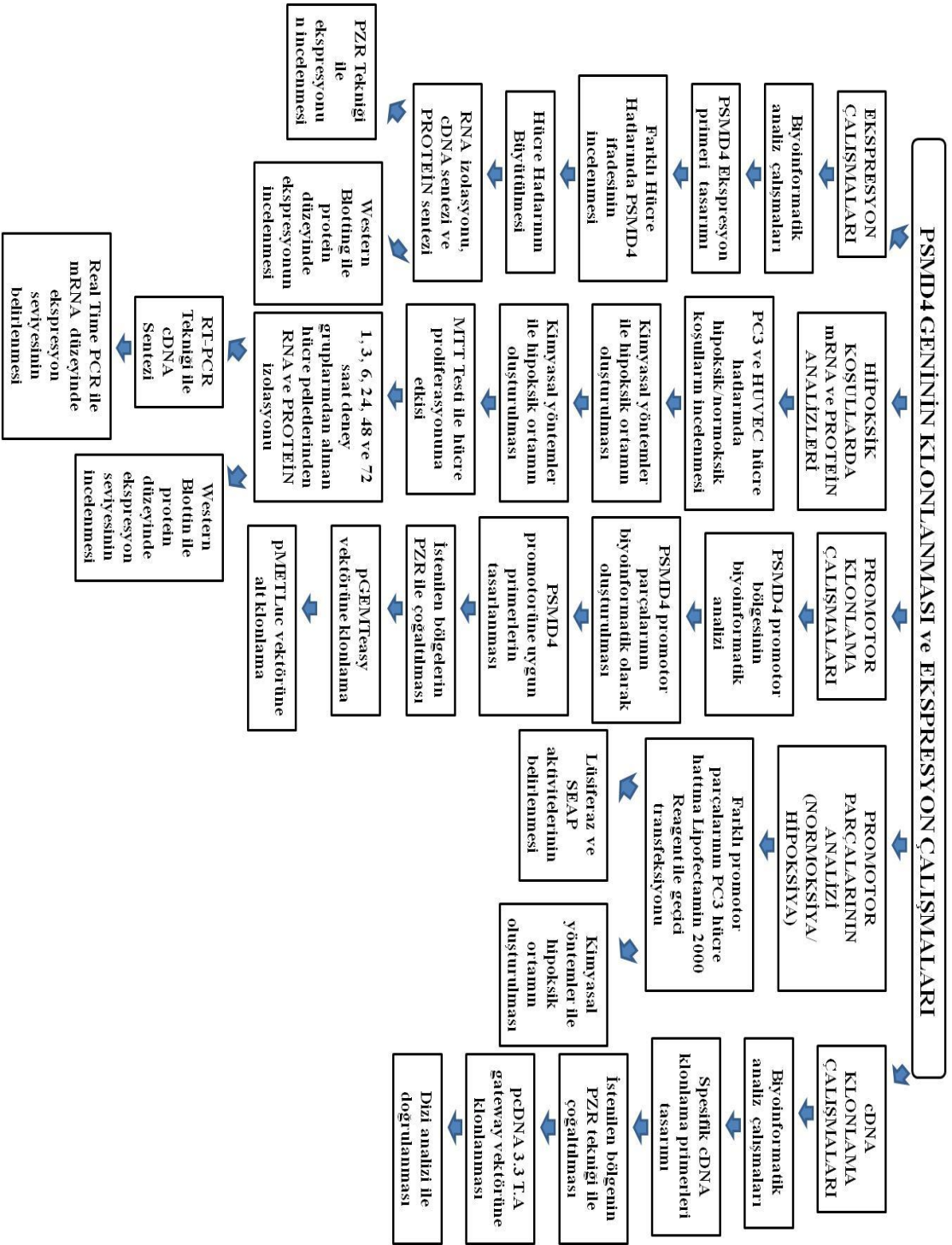
gösterilmiştir. Proteazom ubiquitin başka bozunma sinyalleri tanıyarak kısa ömürlü proteinlerin seçici olarak çıkarılmasına daha genel bir fonksiyona sahip olabilir [102]. İlginçtir ki proteazom inhibitörleri ile eş zamanlı olarak hipoksiyayı taklit eden bir madde hücrelere maruz bırakıldığında ubiquitin bağlı HIF-1 α 'nın belirgin biçimde azaltılmadığı görülmüştür. HIF-1 α seviyesi normoksik koşullara karşı hipoksik ortamlarda proteazom inhibitörü varlığında seviyesi artmaktadır. Proteazom yolağında HIF-1 α protein seviyesinin düzenlenmesi PEST sekans motif kapsayan C-terminal yapısındaki protein tarafından düzenlenmektedir [103]. İlginçtir ki; HIF-1 α 'nın aynı bölgesi; HIF-1 α N-terminal transaktivasyon domaininde barınmaktadır ve bu bölge HIF-1 α fonksiyonun regülasyonunda rol oynamaktadır [104-105]. Bu nedenle, HIF-1 α 'nın C terminalinin fonksiyonel yapısındaki 401 ve 603 amino asitler arasında oksijen bağımlı yıkımla tanımlı domain bulunmaktadır [106].

1.9 Çalışma Amacımız

Literatür çalışmalarımız sırasında 26S proteazomun hücredeki ubiquitin proteazom yolağı işbirliği ile hücrede çeşitli mekanizmalarda görev aldığı incelenmiştir. 26S proteazomda görevli olan PSMD4 geninin ürettiği proteinler olan S5a ve Angiosidin proteinlerin kanserle ilişkisi hakkında birçok çalışmalar yapılmıştır. Ancak PSMD4 geninin regülasyonu hakkında çalışmalar çok azdır. Bu konudaki tek bilgi 2007 yılında Levitzki ve ekibinin yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada PSMD4 promotorun (-1200/+348) bölgesi klonlanılmış ve bu bölgenin anti-apoptotik aktivitesi araştırılmıştır. Bazı transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye bağlanmaları incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada HIF-1 α transkripsiyon faktörünün PSMD4 promotorüne bağlandığı sadece biyoinformatik olarak gösterilmiştir.

Bu çalışma kapsamında literatürde regülasyonu konusunda sınırlı bilgiler bulunan PSMD4 promotorünün hipoksik ve normoksik koşullarda transkripsiyonel seviyesine, PSMD4 geninin mRNA ve protein seviyesindeki değişikliği araştırılmıştır. Öncelikli olarak PSMD4 geninin farklı kanser hücre hatlarındaki ekspresyon profili incelenmiştir. Daha sonra seçilen iki modelde hipoksik çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmaya ait ayrıntılı basamakları şu şekilde sıralayabiliriz;

- i. Farklı hücre hatlarında PSMD4 geninin mRNA ve protein ifadesi araştırılmıştır. (Farklı kanser hücre hatlarındaki ekspresyon seviyesini incelemek amacıyla)
- ii. Yüksek ekspresyon gösterdiği iki farklı hücre hattında Normoksik ve Hipoksik ortamda PSMD4 geninin mRNA ve protein ekspresyonu incelenmiştir. (Hipoksik koşullardaki değişim seviyesini gösterebilmek amacıyla)
- iii. PSMD4 geninin promotor bölgesi klonlanmış ve farklı delesyon mutantları oluşturulmuştur. (PSMD4 geninin bazal transkripsiyonel aktivitesini ve aktiviteden sorumlu asıl bölgeyi görebilmek amacıyla)
- iv. Klonlanan PSMD4 promotor parçaları geçici transfeksiyon yöntemiyle hücrelere verilerek normal koşullarda ve hipoksik koşullarda aktivitesi ilk kez tarafımızca incelenmiştir. (PSMD4 geninin transkripsiyonel seviyede hipoksik koşullara olan cevabını görebilmek amacıyla)
- v. PSMD4 genini ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. (Daha sonraki çalışmalarımızda planladığımız kalıcı transfeksiyon deneylerinde kullanabilmek amacıyla)



Şekil 1.7:Çalışma planı akış diyagramı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar moleküler biyoloji için uygun saflıkta ve sterilliktedir. Moleküler biyoloji materyalleri, lüsiferaz sisteminde kullanılan kimyasallar , RT- PZR çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve enzimler Biochrom, Sigma, Merck, Fermentas, Thermo Scientific, Promega firmalarından temin edilmiştir.

Tablo 2.1: Çalışmalarda kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Üretici
DMEM	Sigma
FCS	Sigma
EDTA	Riedel
CoCl₂	Sigma
Amonyum Asetat	Merck
Proteinaz K	Fermentas
Tris Base	Sigma
NaCl	Sigma
SDS	Sigma
Beta-merkaptotanol	Sigma
TEMED	Sigma
MgCl₂	Fermentas
Gliserol	Merck
DMSO	Merck

Tablo 2.1: (Devamı).

Ampicilin	Sigma
Kanamisin	Invitrogen
LB-Broth	Sigma
LB-Agar	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
Borik asit	Merck
Ethanol	Sigma
Lüsiferaz	Clontech
Seap	Clontech
MTT	Clontech
Agaroz	Prona
Lipofectamin 2000 Reagent	İnvitrogen
Monoklonal Antikor(PSMD4 genine spesifik)	Santa Cruz
β-aktin Antikor	Sigma
Goat anti-mouse IgG-HRP	Sigma

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Tablo 2.2: Çalışmada kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Model
CO2 'li inkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
İnverted Mikroskop	Nikon
-80 °C ultralow freezer	Sanyo, Japonya
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Etüv	WTB, Germany, Nüve, Türkiye

Tablo 2.2: (Devamı).

Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
PH Metre	WTW, Almanya
Sıcak su banyosu	Consort, İngiltere
Isı kontrollü çalkalamalı inkübatör	GFL, Almanya
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazî	Sartorius
96 kuyulu plaka okuyucu	Bio-Tek
96 kuyulu plaka okuyucu spektrofotometre	
Otomatik pipetler	Finnpipette
Luminometre	Thermo
DNA elektroforezi	Minicell Primo
UV Gel Görüntüleme	Quantum-Capt
PZR	BioLab
Mikro santrifüj	Thermo
Qubit	Invitrogen
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa)
Santrifüj	Sigma laborzentrifugen, Germany

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Soyu

Çalışma sırasında transformasyon için *E.coli* XL1-blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK-mK+)) ve *E.coli* DH5α (SupE44Δ lacU169 (Φ80 LacZ ΔM15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 r1 A1) bakteri soyları kullanıldı.

2.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Bu çalışmada kullanılan İnsan karaciğer karsinomu (Hep-3B) hücre hattı Cardiff Üniversitesinden Dr. Ramji'den sağlandı. İnsan prostat karsinom hücreleri (DU-145, PC-3) ve İnsan meme karsinom hücreleri (MCF7) Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünden Dr. Kemal Sami Korkmaz'dan sağlandı. İnsan kemik karsinom hücre hatları (MG-63 ve Saos-2) Cardiff Üniversitesi'nden Dr. Kennet'den sağlandı. İnsan kolon karsinom (HT-29) hücre hattı Ankara Şap Enstitüsü'nde, Hücre Bankası sorumluluğunda olan ve Avrupa Kültür Koleksiyonları Organizasyonu üyesi olan Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (HÜKÜK) sağlandı. İnsan pankreas hücre hattı (PANC) Adnan Mendres Üniversitesi Doç.Dr Kemal Ergin'den sağlandı.

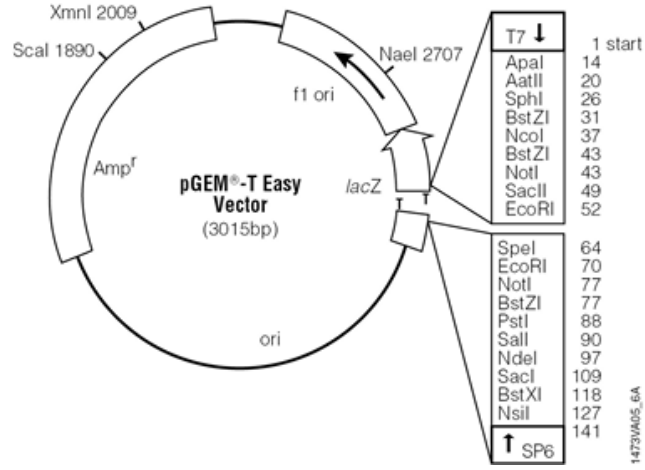
2.1.5 Çalışmada Kullanılan Vektörler

Klonlama çalışmalarında pGEM-T Easy vektörü ve pMET-Luc Reporter vektörü kullanılmıştır. Bu sebepten çoğaltılan PZR ürünleri ilk olarak T.A klonlama amacıyla pGEM-T Easy vektörüne klonlanmıştır.

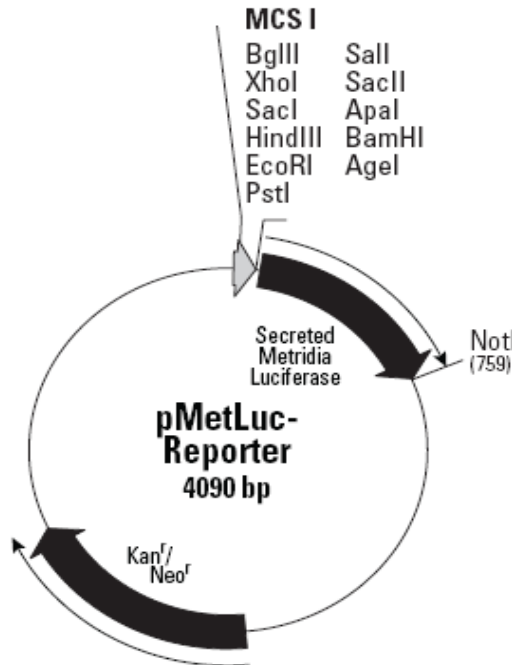
pMET-Luc Reporter vektörü promoter içermez ancak lusiferaz geni bulunmaktadır. İçerdiği bu gen sayesinde bu vektöre klonlanan gen ile beraber hücreye verildiğinde lusiferaz geni ile aktivitesi belirlenmektedir.

pMET-Luc kontrol vektörü ve SEAP kontrol vektörleri transfeksiyon çalışmasının başarısını kontrol etmek için kullanılmaktadır.

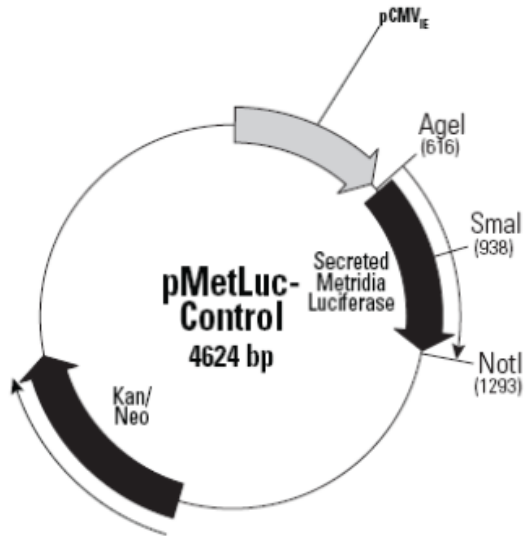
pcDNA 3.3 TOPO ekspresyon vektörü PSMD4 geninin klonlanması amacıyla kullanılmıştır. Bu vektöre klonlama sonrasında plazmit hücrelere kalıcı transfeksiyon yapılarak incelemeler yapılması amaçlanmıştır.



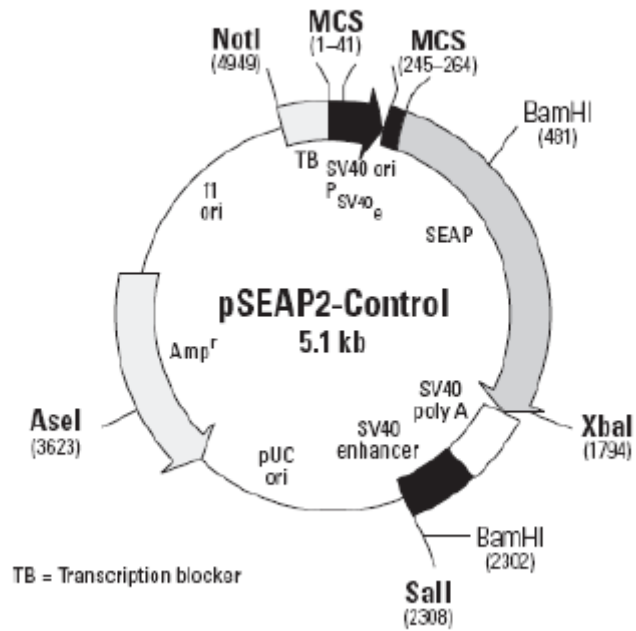
Şekil 2.1:pGEM-T Vektör Haritası.



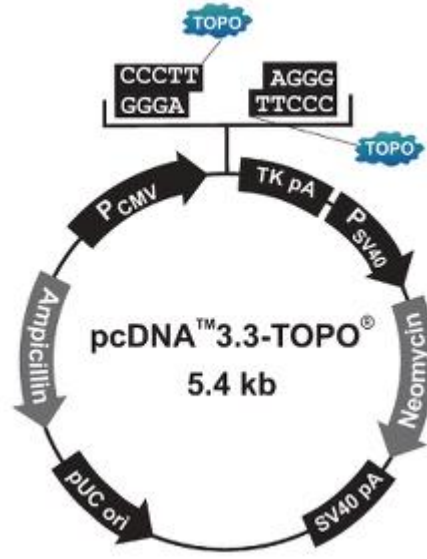
Şekil 2.2:pMetLuc Reporter Vektör Haritası.



Şekil 2.3:pMetLuc Kontrol Vektör.



Şekil 2.4:SEAP-2 Kontrol Vektör.



Şekil 2.5:pcDNA 3.3 TOPO-vektör.

2.2 Metod

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın, Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Isıya dayanıklı bütün cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121°C’de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

Doku Kültürü Laboratuvarı her hafta periyodik olarak virkon içeren sıvılarla temizlendi. Çalışmaya başlanmadan önce en az yarım saat UV lamba açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı

2.2.2 Klonlama

2.2.2.1 Primer Tasarımı

Primer tasarımı için www.ncbi.nlm.nih.gov, www.idtdna.com adreslerinden yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına, % G-C oranına ve saç tokası yapısı oluşturmamasına dikkat edildi. Primerler gen bankasında bulunan DNA sekansı ile BLAST yapılarak insan PSMD4 genine benzerliği kontrol edildi.

2.2.2.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için EDTA'lı tüpte bulunan kandan 500 µL alınarak ependorflara konuldu. Üzerine 1ml distile su ilave edildi. Ependorflar 5 dakika alt üst edilerek çalkalanır. Ardından 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. İşlem sonrasında üst kısım atılarak yine 1ml distile su ilave edildi ve 5 dakika alt üst edildi. Santrifüj işlemi tekrarlandı. Üst kısım atıldı. Pellet üzerine tablo 2.3'de belirtilen nüklei lizis tamponundan 250 µL, %10 luk SDS'ten 20 µL ve 20 µL proteinaz K ilave edilerek alt üst edilerek çalkalandı. Daha sonra 72°C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi, süre sonunda 175 µL doymuş amonyum asetat eklenerek çalkalandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj sonunda üst kısım temiz bir eppendorfa alınarak üzerine 2 katı oranında absolu etanol eklendi. Eppendorf alt üst edilerek DNA'nın belirmesi gözlendi ve 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA çökmesi sağlandı. Üst kısım uzaklaştırıldı ve çökelti üzerine 250 µL %75 etanol ilave edilerek tekrar 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve üst kısım atılarak DNA havada kurutuldu. Son olarak 250 µL distile suda DNA çözülerek -20 dondurucuda saklandı.

Tablo 2.3: Kandan genomik DNA izolasyon çözeltileri.

Solüsyon	İçeriği
Proteinaz K	Proteinaz-K son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde hazırlandı (1 ml dH ₂ O'da 0,01 g). -20°C'de saklandı.
Sature Amonyum Asetat (NH₄Ac)	74g NH ₄ Ac, dH ₂ O ile 100ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda yaklaşık 40°C'de çözüldü. Filtrasyon ile steril edildi. +4 °C'de saklandı.
Nüklei Lizis Tamponu	10 mM Tris Base, 400mM NaCl, 2mM Na ₂ EDTA. pH 8,2 distile H ₂ O ile istenen miktara tamamlandı. +4°C'de saklandı.

2.2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR reaksiyonları 50 µL hacimde yapıldı. Kalıp olarak yaklaşık 200 ng DNA, her bir primer son konsantrasyonu 100ng/µl, 1X Tampon (Fermentas) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, %1 (v/v) Triton X-100), 200 mM her bir dNTP ve 2,5 Unite Taq DNA polimeraz (Fermentas) kullanıldı. MgCl₂ konsantrasyonu (1 mM, 2 mM ve 4 mM) ise her bir PZR reaksiyonu için optimize edildi. PZR programı, döngü sayısı primerlere ve kullanılan kalıp dna'ya bağlı olarak değişiklik göstermiştir. PZR sonuçları agaroz jelde görüntüledi ve istenilen bantlar jelden geri kazanıldı.

2.2.2.4 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

DNA elektroforezi için yatay jeller kullanıldı. 90 volt elektrik akımından 45 dakika örnekler yürütüldü. Elektforez tamponu olarak 0,5 X TBE tercih edildi. Agaroz jelle son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edildi. DNA'yı görüntülemek amacıyla örneklere brom fenol mavi boyası eklendi. Klonlama çalışmalarında kullanılan agaroz jelin son konsantrasyonu % 0,8 ve %2'dir.

Ekspresyon profili görüntülemek amacıyla kullanılan agaroz jellerin son konsantrasyonu ise %1'dir. Elektroforezde ayrılan DNA parçalarının büyüklüğünün belirlenmesi için 1 kb DNA ladder ve 100 kb DNA ladder ile karşılaştırıldı. Elektroforez sonuçları görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 2-4: Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri.

Solüsyon	İçeriği
5X TBE (pH:8,00)	54g Tris Baz, 27,5g Borik Asit tartılır. 20 ml 0,5M EDTA pH 8,00 eklendi ve dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.
0,5X TBE	5X TBE stok tampondan 100ml alınarak üzeri dH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.

2.2.2.5 Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu

İstenilen DNA bantları UV transilluminator üzerinde agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific) kullanılarak DNA elüe edildi. Jelden kazanılan DNA'nın küçük bir kısmı tekrar jelde yürütülerek kontrol edildi. DNA miktarı ve temizliğinin kontrolü için 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansları alındı.

2.2.2.6 DNA Miktar Tayini

İzole edilen plazmitlerin miktarları ve saflıkları 260nm ve 280 nm'de absorbanslarının ölçümü ile hesaplandı. Bu amaçla kuvarz küvetlere kör değer için 200 µL dH₂O, DNA ölçümleri için 195 µL dH₂O ve ilgili örnekten 5 µL konuldu.

Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

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

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

2.2.2.7 PZR Ürünlerinin T:A Klonlanması

Taq polimeraz kullanılarak elde edilen PZR ürünleri pGEM-T vektörüne protokolda belirtildiği şekliyle T:A klonlaması yapıldı (Promega). Buna göre 20 µL toplam hacim olacak şekilde, 2 µL pGEM-T vektör, 6 µL insert DNA (jelden kazanılan PZR ürünü), 10 µL T4 ligaz tamponu ve 2 µL T4 DNA ligaz +4°C’de bir gece inkübe edildi. Ligasyon sonuçları *E.coli* XL1blue ve DH5α kompetent hücrelerine transforme edildi. Transformantların seçimi mavi-beyaz koloni yöntemine göre yapıldı. Bunun için ampisillin içeren LB agar besiyerlerine 100 µL IPTG (100 mM stok) ve 20 µL X-Gal (stok 50 mg/ml) yayıldı.

2.2.3 Transformasyon

2.2.3.1 Kompetent Hücre Hazırlanması

Kompetant hale getirilecek *E.coli* hücreleri LB agar içeren petrilere tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. Petrilere 37°C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün 15 ml LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapıldı ve 37°C’de çalkalamalı etüvde bir gece inkübe edildi. 250 ml steril erlene 100 ml LB besiyeri konularak ve bu besiyerine önkültürden 5 ml inoküle edildi. 37°C’de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı ve belirli zaman aralıklarında absorbans alınarak OD₆₀₀’nin 0,5 ile 0,6 arasında olması beklendi. OD miktarı istenilen seviyeye geldiğinde kültür buza alındı. Bakteri süspansiyonu 3000 rpm de 5 dakika 4°C’de santrifüj yapıldı. Süpernatant pipetle alınarak başlangıç hacminin yarısı 0,1 M CaCl₂ solusyonundan eklenerek, nazikçe pipetaj yapılarak pelletin çözünmesi sağlandı, 25 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Tekrar 3000 rpmde 4°C’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak başlangıç hacminin 1/10’u 0,1 M CaCl₂ ile tekrar pellet çözüldü. 1-4 saat arasında buz üzerinde bekletildi. Daha sonra eşit hacimde %40 steril gliserol ilave edilerek karıştırıldı. Buz üzerinde bekletilen eppendorflara 100 µL ya da 200 µL olacak şekilde alikot yapıldı ve etiketlenerek -80°C dondurucuda saklandı.

Tablo 2.4: Kompetan Hücre için Kullanılan Çözeltiler.

Kimyasal madde	Son Konsantrasyon
1 M CaCl₂	100 mM
%99 Gliserol	%40

2.2.3.2 Kompetant Hücrenin Etkinliğinin Hesaplanması

Transformasyon etkinliği bilinen 0,1 ng halkasal plazmit hazırlanan kompetant hücrelere kontrol transformasyonu yapıldı. Ayrıca 0,1 ng plazmit 10 ve 100 kat sulandırılarak hazırlanan diğer kompetant hücrelere transformasyon yapılır. 100 µL kompetant hücreye 900 µL LB-Broth eklenir. 100 µL transformasyon ürünü antibiyotik içeren petrilere yayılır. Petrilere 37°C inkübatörde bir gece bırakıldı. Sonrasında petrilere oluşan koloniler sayıldı. Aşağıdaki formüle göre kompetant hücre etkinliği hesaplandı.

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

2.2.3.3 Vektörün Kompetent Hücreye Transformasyonu

Transformasyon için, 200 µL kompetent hücreye 5 µL plazmit ilave edilerek buz üzerinde 40 dakika bekletildi. Süre sonunda 42°C’de 90 saniye ısı şoku uygulandı. Transformasyon ürünü tekrar buza konularak 90 saniye bekletildi. Süre sonunda 800 µL LB ilave edilerek 37°C’de çalkalamalı etüvde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerden 200 µL ampisilin içeren LB agar besiyerine yayıldı. Ayrıca hücreler endorflara alınarak 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Pellet 200 µL LB’de çözüldü, ampisilin içeren LB agar besiyerine yayıldı. Santrifüjlü ve Santrifüjsüz transformasyon ürünlerinin yayıldığı LB agar besiyerleri 37°C ‘de bir gece inkübe edildi.

2.2.4 Plazmit DNA İzolasyonu

2.2.4.1 Küçük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Miniprep DNA izolasyonu için Miniprep DNA isolation kit (Thermo Scientific) kullanıldı. Kit protokolüne göre, son konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 15 ml LB besiyerine transformasyon gerçekleşmiş olan tek koloni ekim yapıldı ve bir gece 37°C çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Kültür 3000 rpm 10 dakika santrifüj yapıldı ve bakteri pelletine protokole uygun şekilde yapılan işlemlerden sonra DNA elüe edildi.

2.2.4.2 Büyük Ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu

Büyük miktarda ve transfekte edilebilecek saflıkta plazmit DNA izolasyonu için Maxi Prep Kit (Thermo Scientific) kullanıldı. Kit protokolüne göre, uygun konsantrasyonda seçici antibiyotik içeren 10 ml LB besiyeri içerisine tek koloni ekim yapıldı. 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 dilue edildi. Yüksek kopyalı plazmitler için 100 ml medyum, düşük kopyalı olanlar için 250 ml medyum kullanıldı. 37°C de 12-16 saat 250 rpm'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi beklendi. Bakterilerin yeterli OD seviyesine ulaştıktan sonra 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapılarak protokolün diğer basamakları uygun şekilde gerçekleştirildi. Sonuçta yüksek saflıkta ve yoğunlukta DNA elde edildi.

2.2.5 DNA'nın Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi

Kullanılmak istenilen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile önerilen tamponlar kullanılarak 50 µL toplam hacimde 37°C'de en az 2 saat inkübe edilerek kesim yapıldı. Eğer kesim stratejisinde iki farklı enzim kullanılacak ise 'www.thermoscientificbio.com' adresini kullanarak enzimlerin aynı anda

çalışabileceği ortak tamponlar kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek değerlendirildi.

2.2.6 Dizi Analizi

Kontrol kesimle rekombinant olduğu fikrine emin olduğumuz plazmit en az 30 ng/μl olacak şekilde hazırlandı. Klonlamak istenilen genin ilgili primerleri ile beraber ODTU-TEKNOKENT /REFGEN 'e dizileme için yollandı.

Dizileme sonuçları NCBI databankta bulunan nükleotitleri ile kontrol edilerek analiz sonuçlandı.

2.2.7 pMet-Luc Vektörüne Alt Klonlama

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan genin plazmit izolasyonu ürünü uygun enzimler ile kesildi. Agaroz jel elektroforezine kesimler yüklendi. istenilen bölgede ki klonlama ürünü jelden geri kazanıldı. Klonlama ürünü kesmek için kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ile boş pMet-Luc vektörde kesilerek lineer hale getirildi.

2μL T4 DNA Ligaz, 6 μL T4 DNA Ligaz Buffer , 2 μL lineer hale getirilmiş pMet-Luc vektörü ve 10 μL insert +4°C'de ligasyona bırakıldı. Bölüm 2.2.3.3'de belirtildiği şekilde transformasyon yapıldı

2.2.8 Hücre Kültürü Teknikleri

2.2.8.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

2.2.8.1.1 FCS Hazırlanması

FCS (Fetal Calf Serum) -20°C 'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum ilk kullanımdan önce $+4^{\circ}\text{C}$ bir gece buzlarının çözünmesi sağlandı. Daha sonra 37°C 'de 15 dakika ve 56°C 'de 35 dakika ısı ile inaktive edildi ve tekrar -20°C de saklandı.

2.2.8.1.2 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü medyumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) içine FCS son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm bileşenler 0,22 μm steril filtreden süzülerek steril edildi.

2.2.8.2 Çalışmada Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmada kullanılan hücre hatları HUVEC (Human Vein Endothelial Cell- İnsan Göbek Kordonu Epitel Hücresi), HT-29 (Human Colon Carcinoma- İnsan Kolon Kanseri), Hep-3B (Human Hepatocellular Carcinoma- İnsan Karaciğer Kanseri), PANC (Human Pancreatic Carcinoma- İnsan Pankreas Kanseri), PC-3 (Human Prostate Cancer cell line- İnsan prostat kanseri hücre hattı), DU-145 (Human Prostate Cancer cell line- İnsan prostat kanseri hücre hattı), MCF7 (Human Breast cancer line- İnsan meme kanseri hücre hattı), HeLa (Human cervical cancer- İnsan serviks kanseri), MG-63 ve Saos-2 (Human Osteosarkoma cell line- İnsan osteosarkom hücre hattı) hücreleri kullanılmıştır.

2.2.8.3 Hücre Soyunun Başlatılması, Büyütülmesi ve Dondurulması

Uzun dönemde -80°C 'de saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için -80°C 'den çıkarılan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alındı ve hızlıca çözümleri sağlandı. Çözünen hücreler 5ml %10'luk FCS içeren medyuma alındı, alt üst edildi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, oluşan pellet medyum ile çözüldü ve flasklara ekim yapıldı. Flasklar etiketlendi ve 37°C , %5 CO_2 içeren inkübatöre konuldu.

Hücreler buldukları yüzeyi kaplayınca içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca 5 ml medyum eklendi. Falkonlara alınarak 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 2 ml medyum ile çözüldü. Hücreler 15 ml medyumda 75 cm^2 flasklarda, içerisinde % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 1 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

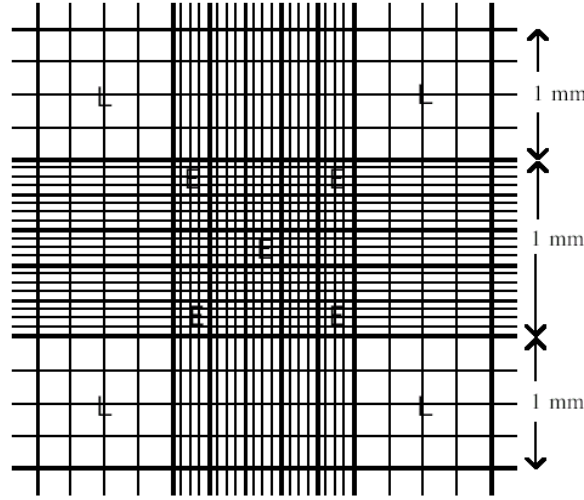
Kullanılmayacak hücreler dondurmak için medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 3 ml Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve falkona alındı. 1000 rpm 'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 1 ml % 10 DMSO içeren FCS ile dikkatlice çözüldü, cryovial tüplerine konuldu ve etiketlenerek 80°C 'deki dolaba konuldu.

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

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm^2 alan, 0,1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre (Şekil 2.6) lamı kullanıldı. Flasklardan kaldırılan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 10 ml %10 FCS içeren medyumda çözümlenerek. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 μL hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı hücreler boyanmamıştır. Boyanmayan hücreler sayılmıştır.

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

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



Şekil 2.6: Hemositometri.

2.2.8.5 MTT Testi

96 kuyulu plakalara her biri kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde hücreler paylaştırıldı. 20 μ L MTT solusyonu herbir kuyuya uygulanmış ve hücrelerin MTT'yi metabolize etmeleri için 37⁰C'de 4 saat beklenmiştir. Medyum uzaklaştırılmıştır. 0,004M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan Formazan kristalleri MTT solusyonu ile pipetaj yardımıyla çözüldü ve hücrelerin 550 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınmıştır.

2.2.9 Transfeksiyon Çalışmaları

2.2.9.1 Deney Düzenin Kurulması

Hücreler 2 adet 12 kuyulu plakalara transfeksiyondan 24 saat önce hücreler kuyu başına 250.000 olacak şekilde yayıldı. Hücrelere transfeksiyon işlemi uygulandı. Plakalardan birini transfeksiyon uygulamasından 2 saat sonra her kuyuya

son konstrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. 24, 48 ve 72 saat sonra medyumlar alındı. Alınan örnekler -20°C medyumlar saklandı.

CoCl₂ HIF-1 α 'ya normal oksijen koşullarında inhibe eden prolin hidroksilazlara bağlanarak onların aktivitesini durdurur. Böylece HIF-1 α hidroksillenmez ve aktif hale geçer. Aktif hale geçen HIF-1 α oksijen yetersizliğindeki seviyesine ulaşır ve hipoksi ile regüle olan diğer genlerin transkripsiyonlarını etkiler.

2.2.9.2 Lipofectamine 2000 Reagent Kullanılarak Geçici Transfeksiyon

12 kuyulu plakalara transfeksiyondan 24 saat önce hücreler 250.000 hücre/kuyu olacak şekilde yayıldı. Transfekte edilecek DNA kuyu başına 1 μ g olacak şekilde hazırlandı. Lipofectamin transfeksiyon ajanı özgü optimum medyum her kuyu başına 75 μ L olacak şekilde hesaplandı ve DNA ile bir karışım hazırlandı. Başka bir ependorfta optimum medyum 75 μ L/kuyu ve 2,5 μ L/kuyu içeren karışım hazırlandı. Bu iki karışım daha sonra bir araya getirilerek 5 dakika oda sıcaklığından inkübasyona bırakıldı. Bu karışım her kuyuya 125 μ L olacak şekilde damla damla eklendi.

2.2.9.3 Lusiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi

12 kuyulu plakalara transfekte edilen promoter parçalarının bulunduğu medyumlardan 24, 48 ve 72 saat sonunda hücre medyumları alındı. Sonuçların okunması için; 384 kuyulu plakalara 9 μ L hücre kültürü medyumları eklendi. 10X Lusiferaz substrat solusyonu hazırlandı. Kullanılmak üzere Reaksiyon tamponu ile 1X'e sulandırıldı. Bir örnek için taze hazırlanmış 1XSubstrat/Reaksiyon tamponundan 1 μ L kullanıldı. Sonuçlar luminometrede ölçüldü.

Tablo 2.5: Lusiferaz Aktivite Ölçüm Çözeltileri.

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

2.2.9.4 SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Ölçümü

12 kuyulu plakalara yapılan transfeksiyon sonrasında 24, 48 ve 72 saatlik sonuçları için alınan 25 µL hücre kültürü medyumu 96 kuyulu plakalara eklendi. 5X dilüsyon tamponu 1X'e ddH₂O dilüe edildi. 75 µL 1 X Dilüsyon tampon örnekler eklendi ve plaka alimünyum folya ile sarılarak 65°C'de 30 dakika bekletildi. 2-3 dakika buzda bekletildi ve daha sonra oda sıcaklığına getirildi. Oda sıcaklığına getirilmiş olan SEAP substrat çözeltisinden 40 µL eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İşlem sonunda sonuçlar luminometrede ölçüldü.

Tablo 2.6: SEAP Aktivite Ölçüm Çözeltileri.

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

2.2.10 RNA ile İlgili Teknikler

2.2.10.1 Deney Düzenin Kurulması

25 cm² flasklara hücreler 2.000.000 olacak şekilde yayıldı. Hipoksik ortam oluşturmak istediğimiz flasklara son konsantrasyon 150 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı. Hücreler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenilerek oluşturulan pelletler RNA izolasyonu için -80°C kaldırıldı.

2.2.10.2 Hücre Pelleterinden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için pellet halinde -80°C dondurucuda saklanan örnekler buz üzerinde çözüldü. Thermo Scientific RNA izolasyonu kiti kullanılarak pelletlerden izolasyon yapıldı. Elde edilen RNA'lar -80°C dondurucuda uzun dönemde saklandı.

2.2.10.3 RNA Jel Elektroforezi

Elektroforez tankı ve aparatları jel dökülmeden önce %0,5'lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC'li sudan geçirildi. Daha sonra etonal ile yıkandıktan sonra peçete üzerinde kurumaya bırakıldı. 0,5g agaroz, 5 ml 10XFA jel tampon ve 50ml DEPC'li su ile karıştırıldı. Bu karışım mikrodalgada kaynatıldı ve buharlaşma bitene kadar soğumaya bırakıldı. 900 µL formaldehit ve 1 µL etidyum bromür eklenerek kasete döküldü. Jel donduktan sonra kaset 1XFA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. 5 µL RNA örneği ve 3 µL 2X yükleme boyası 65°C'de 3-5 dakika bekletildi ve buzda soğutulduktan sonra kuyulara yüklendi.

Tablo 2.7: Formaldehit Jel Elektroforez Çözeltileri.

Solüsyon	İçeriği
10XFA Jel Tamponu	41,9g MOPS (asitsiz), 6,8 g Na-asetat.3H ₂ O, 20 ml 0,5M EDTA pH 7,00 ve 1 litreye tamamlandı.
FA Jel Yürütme Tamponu	100 ml 10XFA Jel tamponu, 20 ml %37'lik (12,3M) formaldehit, 880 ml DEPC'li su.

2.2.10.4 RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA'ların miktarları ve saflıklarının tayini için 260 nm ve 280 nm'de absorbansları alındı. Bu amaçla kuvartz küvetlere kör değer için 200 µL dH₂O, RNA ölçümleri için 195 µL dH₂O ve 5 µL ilgili RNA konuldu. Elde edilen absorbans değerleri ve saflıklarının değerlendirilmesi için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$\text{RNA miktarı} = A_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$\text{Saflık} = A_{260}/A_{280}$$

2.2.10.5 Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonları (RT-PZR)

RT-PZR iki ayrı basamakta kullanıldı. Birinci basamakta Reverse-Transkriptaz (RT) kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirildi, ikinci basamakta ise gene spesifik primerler ile ilk basamakta elde edilen cDNA kullanılarak ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) gerçekleştirildi.

2.2.10.5.1 cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'ların miktarları 2.2.8.3'de belirtildiği üzere hesaplandı. 1000 ng RNA olacak şekilde alınması gereken miktar belirlendi. 1µL Oligo dT eklenerek ddH₂O ile 12,5 µL tamamlanılarak. 65°C'de 5 dakika PZR cihazında inkübe edildi. Her bir örnek için 4 µL Buffer RT, 2 µL dNTP, 1 µL Revers Transkriptaz ve 0,5 µL Ribolock İnhibitörden oluşan karışım hazırlandı. Bu karışımdan her bir tüpe 7,5 µL paylaştırıldı. Örnekler 42°C 1 saat ve 72°C 10 dakika PZR cihazında inkübe edildi.

2.2.10.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İnsan 26S Proteasom subunit S5A (PSMD4) ve Human globulin 2 primerlerinin optimize edilen PZR koşulları aşağıdaki gibidir.

Tablo 2.8: PSMD4 ve Hβ2 primerlerin PZR Koşulları.

1	94°C	5 dakika	1 döngü
2	94°C	45 saniye	Her bir primer için döngü sayısı 30 , 25 olarak değişmektedir.
	56°C	45 saniye	
	72°C	20 dakika	
3	72°C	10 dakika	1 döngü

Tablo 2.9: PSMD4 ve H β 2 Primerlerin PZR Bileşenlerin Miktarları.

Bileşenler (Son Konstrasyon)	PSMD4	Hβ2	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
cDNA	1 μ L	1 μ L	1 μ L	---
10X Taq Buffer	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
MgCl ₂ (2 mM)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
dNTP (0,2 mM)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Forward primer (1 ng)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Reverse Primer (1 ng)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Taq polimeraz (Fermentas)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
dH ₂ O	36,5 μ L	36,5 μ L	36,5 μ L	37,5 μ L
Son hacim	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L

2.2.10.6 Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PZR)

Her deney seti için 3 tekrarlı olarak aşağıda Bioneer gerçek zamanlı PZR kiti kullanılarak belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PZR yapıldı. 96 kuyulu plakalara belirtilen solusyonlar belirtilen miktarda konuldu. Kuyularda hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Plaka film ile kapatılarak Rosche Real Time PZR cihazına konuldu. Elde edilen Ct değerleri öncelikli olarak 3 tekrarlı çalışıldığı için her deney grubu için elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır, ardından tek bir kontrol olması hedeflendiği için her zaman dilimine ait kontrol gruplarının ortalaması alınmıştır. Daha sonra kontrol genimiz olan Human- β -mikroglobülin 2 geninin Ct değerleri ile bulunan Ct değerinin formülü aşağıdaki gibidir;

$$Ct_{H-\beta-2} - Ct_{PSMD4} = \Delta Ct$$

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

Tablo 2.10: Gerçek Zamanlı PZR Döngüleri.

BİLEŞENLER	MİKTAR
cDNA	1 µL
Primer-Forward	0,5 µL
Primer-Reverse	0,5 µL
dH ₂ O	3 µL
Master Mix	5 µL
Son Hacim	10 µL

Tablo 2.11: Gerçek zamanlı PZR Koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü
94°C	3 dk	1
94°C	45 sn	35
56°C	45 sn	
72°C	45 sn	
72°C	5 dk	1
Erime Eğrisi Analizi		1

2.2.11 Protein Teknikleri

2.2.11.1 Deney Düzenin Kurulması

6 çukurlu platelere kuyu başına 500.000 hücre olacak şekilde hücreler yayıldı. Hipoksik ortam oluşturulmak istenen kuyulara son konstrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulandı. Uygulama yapılmayan ve CoCl₂ uygulanan kuyulardan hücreler 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonra tripsin kullanılarak kaldırıldı. 1000 rpm'de 5 dakika çöktürülerek pelletler -80°C kaldırıldı.

2.2.11.2 RIPA Tamponu Kullanılarak Protein Ekstraktarın Hazırlanması

Tablo 2.12: Ripa Tampon Çözeltisinin İçeriği.

Bileşenler (Son Konstrasyon)	Alınacak miktar
10 mM TrisCl (pH:8)	500 µL
%1 Triton X100	500 µL
% 0,1 SDS	10 ml
% 0,1 Sodyum deoxycholate	0,05 gr
1 mM EDTA	100 µL
1 mM EGTA	500 µL
140 mM NaCl	7 ml
Proteaz İnhibitörü	2 tablet

Pellet halinde -80°C dondurucuda saklanan deney örnekleri buz üzerine alınarak erimesi sağlanır. Herbir örnek için 100 µL Ripa Buffer eklenir. 45 dakika boyunca 10 dakika süre arayla pipetaj yapılır. +4°C soğutmalı santrifüjde 12000 g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant soğutulmuş ependorfa alınır. Örnekler -80°C dondurucuda saklandı.

2.2.11.3 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının hesaplanması için Qubit (Invitrogen) kullanıldı. Örnek başına 199 µL Qubit Reagent Protein Buffer ve 1 µL boyasından eklenerek bir karışım oluşturuldu. Bu karışımdan 199 µL ve 1 µL protein örneğin konularak 10 saniye vorteks yapılır. 15 dakika oda sıcaklığında beklenerek cihazda ölçüm alınır.

Protein Miktarı = Cihazda okunan değer X 200 (Seyreltme Katsayısı)

2.2.11.4 SDS PAGE

Tablo 2.13: Western Blot Çözeltileri.

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

Tablo 2.14: SDS PAGE Çözeltileri.

Jel İçeriği	%10 Ayırma Jeli	%5 Yığma Jeli
Üst Jel Tamponu	---	2.5 ml
Alt Jel Buffer	2.5 ml	---
Akrilamid:Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH₂O	5 ml	6.25 ml
%10 (w/v) APS	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Elektroforez aparatları ve cam levhalar su , % 70 etanol ve %90 izopropanol ile temizlendi. İlk olarak ayırma jeli tabloda belirtilen şekilde hazırlandı, üst kısımda 3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Hava kabarcığı oluşması halinde %90 izopropanol eklenerek giderildi. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ddH₂O ile yüzey yıkandı. Kurutma kağıdı ile yüzey kurutuldu. Ardından Yığma jeli döküldü. Kuyu oluşumu için tarak yerleştirildi. Yığma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarıldı ve kuyucuklardaki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için yine ince şeritler halinde kesilmiş kurutma kağıdı kullanıldı. Daha sonra hazırlanan jeller tank içine yerleştirildi.

Miktarları hesaplanan proteinlerin 22,5 µL (50 µg) hacimde alındı. Protein örneği başına 900 µL 4X Sample Laemli Buffer'a 100 µL β-merkaptto etanol eklenerek bir karışım hazırlandı. Bu karışımdan 7,5 µL alınarak proteinlere eklenerek son hacim 30 µL olacak şekilde tamamlandı. Örnekler 95°C 5 dakika denatüre edilerek proteinler hazırlandı. İlk kuyuya 5 µL Prestained Protein Ladder yüklenerek proteinleri yüklemeye geçildi.

Jelin yürütülmesi için, 0.1 (w/v) SDS içeren 1X Running Buffer ile tank doldurularak (orta kısım ve alt kısım) 80 volta yaklaşık 90 dakika yürütüldü.

2.2.11.5 SDS Jelinin Blotlanması

Proteinlerin elektroforetik transferi için Biorad sistemi kullanıldı. Proteinlerin transferi için PVDF membranlar kullanıldı. Transfer buffer yukarıda belirtildiği şekilde hazırlandı. -20°C hazırlanan buffer bir süre soğumaya bırakıldı. Camların arasındaki jel soğuk transfer buffer içine bırakıldı. Transfer sistemi aparatları, süngerlerde aynı transfer buffer içine bırakıldı. Kurutma kağıtları ve PVDF membran jel boyutlarında kesilerek hazırlandı. Kurutma kağıtlarında soğuk transfer bufferda ıslatıldı. PVDF membran ise soğuk metanolde 1 dakika tutulduktan sonra transfer buffera alınarak transfer sistemi için hazırlandı. cam levhalar arasındaki jel çıkartıldı, yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra sandwinç hazırlandı. Bunun için transfer kasedi arasına sünger, kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma kağıdı, sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer buffer ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 15 volt akımda 12-18 saat transfer yapıldı.

2.2.11.6 Proteinlerin Belirlenmesi

Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 mL bloklama çözeltisinde (%5 (w/v) yağsız süt tozu ve %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı. Membran primer antikor ile 1-1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikor ile bir saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve görüntülemeye geçildi.

2.2.11.7 Sonuçların Filme Aktarılması

Membranlar 2 dakika ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B zeltelerinden ayrı ayrı 2 ml alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı. Membran film üzerinde 10sn, 15 sn, 30 sn ve 60 sn aralıklarla bastırıldı. Film yıkama makinesine verilerek sonuçlar görünür hale getirildi.

2.2.12 İstatiksel Analiz

Real Time PZR'da kontrol ve deneysel gruplar cT değerlerine göre standart sapmalarıyla Livak Metodu ile değerlendirildi. Western Blotting sonuçları ise İmaj-j'de bantların sayısal değerleri belirlendi. Microsoft Excelde sonuçlar değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1 Farklı Hücre Hatlarında PSMD4 Ekspresyonunun mRNA ve Protein Düzeyinde Belirlenmesi

PSMD4 geninin ifade olduğu hücre hatları konusundaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Farklı hücre hatlarındaki ekspresyon analizi için; HUVEC, Hep-3B, PC-3, DU-145, PANC, MG-63, MCF7, HT-29, Saos-2, HeLa hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücreler Bölüm 2.2.8.3'de belirtilen şekilde büyütülerek Bölüm 2.2.10.2'de belirtilen şekilde total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Ekspresyon çalışmalarında kullanılmak için PSMD4 ekspresyon primer çifti Bölüm 2.2.2.1'de belirtilen şekilde tasarlanmıştır. Gen bankasında NM_002810.2 nolu PSMD4 dizisi incelenerek iki farklı ekzonu içine alacak şekilde ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. Bu iki primer çifti 380 baz çiftlik (bç) ürün vermektedir.

Tablo 3.1: İnsan PSMD4 genine ait 380 bç'lik ürün veren primer çifti.

Primer	% G-C	TM	Primer dizisi
PSMD4 İleri Primer	% 48	56°C	5'-GAA GGT GGC AAG ATG GTG TTG GAA A-3'
PSMD4 Geri Primer	% 53.8	56°C	5'-TCC TTC TCA TTG TCC TCC ACT GGG CT-3'
Hβ2 İleri Primer	% 55	52°C	5'-TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC- 3'
Hβ2-Geri Primer	% 47.6	52°C	5'-CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC-3'

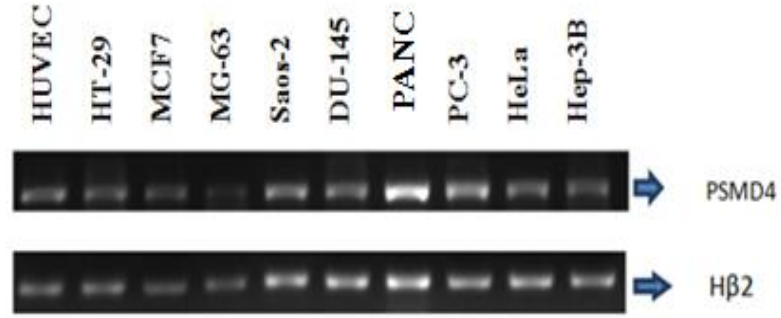
PSMD4 geninin farklı hücre hatlarında protein ekspresyonu gösteren çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla PC-3, HUVEC, HT-29, Hep-3B ve Saos-2 hücreleri Bölüm 2.2.8.3'da belirtilen şekilde büyütüldü. Hücreler flask yüzeyini tamamen doldurduğunda T.E (tripsin-edta) ile pelletler kaldırıldı. Pelletlerden Bölüm 2.2.11.2

'da ifade edilen şekilde Ripa Tamponu kullanılarak protein elde edildi. Qubit cihazıyla absorbansları ölçüldü. Bölüm 2.2.11.4'de belirtilen şekilde Western Blotting yapıldı. PSMD4 antikor ve β -aktin antikorlamaları yapıldı.

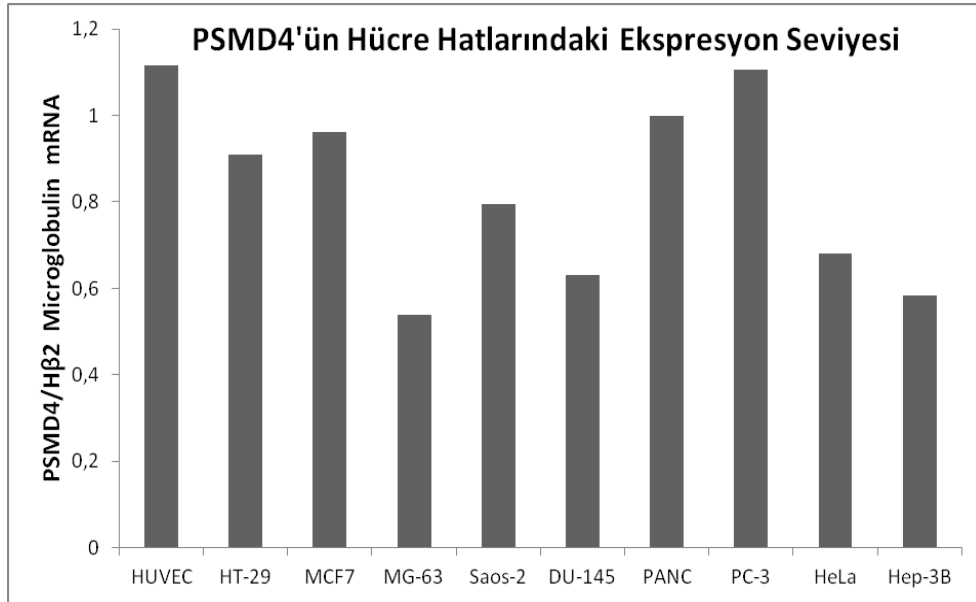
3.1.1 Farklı Hücre Hatlarında mRNA Seviyesinde PSMD4 Ekspresyon Profili

Çalışılan hücre hatları hücre kültüründe istenilen olgunlaşma geldiğinde hücre pelletleri toplandı. Bölüm 2.2.10.2'de anlatıldığı şekilde RNA izolasyonu yapıldı. Ardından cDNA sentezi için Bölüm 2.2.10.5'de bulunan basamaklar uygulandı.

PSMD4 380 bp'lik ürün veren ileri ve geri primerleri ile hazırlanan cDNA'lar Tablo 2.9'da bulunan PZR bileşenleri gösteren miktarlarda ve Tablo 2.8'de ki koşullarda PZR yapıldı. PZR ürünleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme cihazında bantlar fotograflandı (Şekil 3.1). Sonuçlar İmaj-e programı ile densitometrik olarak analiz edildi. Bantlara ait densitometrik analiz Tablo 3.2'da gösterilmiştir.



Şekil 3.1 :Farklı hücre hatlarında PSMD4 geninin ve Hβ2 kontrol geninin ekspresyonu agaroz jel görüntüsü.



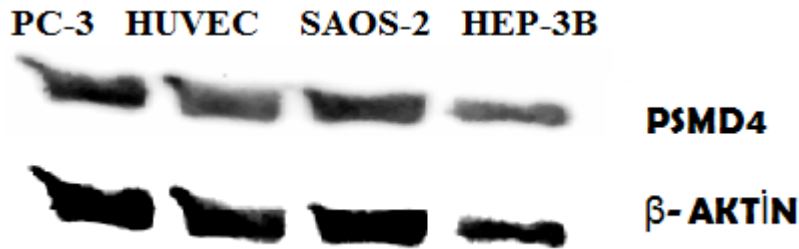
Şekil 3.2:PSMD4 geninin farklı hücre hatlarında mRNA ekspresyonunun densitometrik analizi.

Şekil 3.2’de görüldüğü gibi mRNA seviyesinde tüm hücre hatlarında genimiz ekspre olmaktadır. PC-3 hücre hattında PSMD4 ifadesi diğer hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. Literatürde PC-3 hücre hattında PSMD4 geni ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple sonraki analizler için model olarak bu hücre hattı seçilmiştir. HUVEC’de ekspresyonun PC-3 kadar yüksek olması ve normal bir hücre hattı olması sebebiyle çalışmaya dahil edilmiştir.

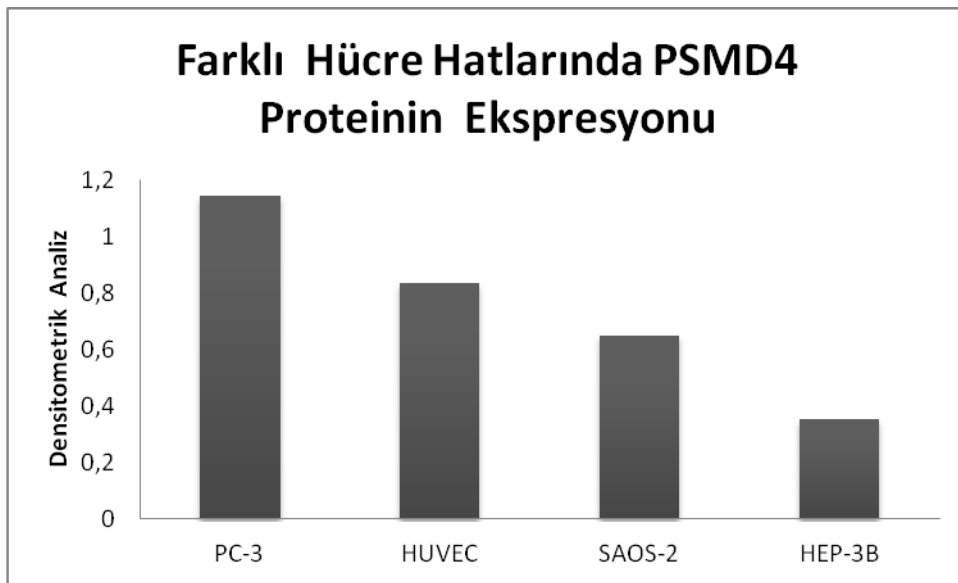
3.1.2 Farklı Hücre Hatlarında Protein Seviyesinde PSMD4 Ekspresyon Profili

Çalışılan hücre hatları hücre kültüründe istenilen olgunlaşma geldiğinde hücre pelletleri toplandı. Pelletler Bölüm 2.2.11.2’de belirtilen içerikte hazırlanan ripa tamponu kullanılarak çözüldü ve proteinler hazırlandı. Hazırlanan proteinlerin miktarları Qubit (Florimetrik miktar tayini) cihazında ölçülerek hesaplandı.

İzole edilen protein ekstraktları SDS PAGE’e 50 µg olacak şekilde yüklenmiştir. 1 gece +4°C’de transfere bırakılmıştır. Membran PSMD4 antikoru (1:1000), sekonder antikor (1:5000) uygulanmıştır. Sonuçlar Bölüm 2.2.11.7’de belirtilen şekilde proteinler filme aktarılmıştır. (Şekil 3.3). Aynı membranda β-aktin antikoru (1:10.000) ve sekonder antikor (1:5000) uygulanarak proteinler işaretlenmiştir. Aynı membranda işaretlenen PSMD4 ve β-aktin proteinlerine ait bantlar densitometrik olarak analiz edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3:Farklı hücre hatlarında protein seviyesinde PSMD4 ekspresyonu.



Şekil 3.4:Farklı hücre hatlarında PSMD4 protein ekspresyonunun densitometrik analizi.

PSMD4 geninin farklı hücre hatlarındaki protein ekspresyonunun densitometrik analiz sonucu Şekil 3.4’de belirtilmiştir. Protein ekspresyonunda mRNA ekspresyonuna benzerlik gösterdiği görülmüştür. PC-3 ve HUVEC hücre hatlarında PSMD4 protein ve mRNA ekspresyonu diğer hücre hatlarına göre yüksek bulunmuştur.

3.2 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Geninin mRNA ve Protein Seviyesinin Belirlenmesi

3.2.1 Hipoksik Koşulların Oluşturulması

Hipoksi oksijensiz miktarının azaldığı ortamdır. Yapılan literatür çalışmalarında PSMD4 geninin hipoksik ortamda regülasyonu ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır. Tüm hücre hatlarında en fazla ifade olan PC-3 ve HUVEC hücreleri seçilmiştir. Bu hücre hatlarında kimyasal yollar ile hipoksik ortam oluşturulmuştur. PSMD4 geninin hipoksik ortamdaki regülasyonunda incelenmiştir.

Çalışmamızda hipoksik ortam oluşturmak için kimyasal yollar tercih edilmiştir. Kimyasal hipoksi ajanı olarak CoCl_2 kullanılmıştır. Çalışılan PC-3 ve HUVEC hücreleri Bölüm 2.2.8.3’de ifade edildiği şekilde büyütülmüştür. Hücreler yeterli olgunluğa ulaştığından Bölüm 2.2.10.1 ve Bölüm 2.2.11.1’de belirtilen şekilde ayrılan hücrelere son konstrasyon 150 μM olacak şekilde CoCl_2 uygulanmıştır.

3.2.1.1 Hipoksik Koşulların Doğrulanması

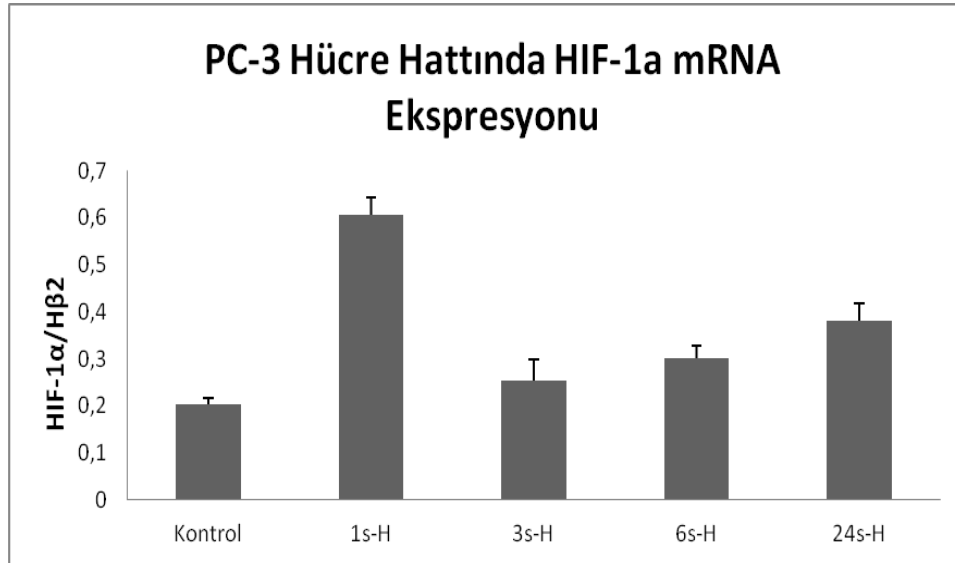
Çalışmamızda PC-3 ve HUVEC hücreleri 25cm²’lik flasklarda 2 milyon hücre olacak şekilde yayıldı. 24 saat sonrasında hipoksik model oluşturmak için 150 μM son konstrasyonda CoCl_2 eklenerek hücreler hipoksik ortam için uyarıldı. Normal koşullar için hücrelere hiçbir şey eklenmemiştir. 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonrasında hücreler tripsin ile kaldırılarak pelletlerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra RNA’lardan cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezlemek için Bölüm 2.2.10.5’de

belirtilen koşullar kullanılmıştır. HIF1- α ve H β 2 kontrol primerleri kullanılarak Bölüm 2.2.10.6'da belirtilen şekilde Gerçek zamanlı PZR yapılarak hipoksik ortamın oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir.

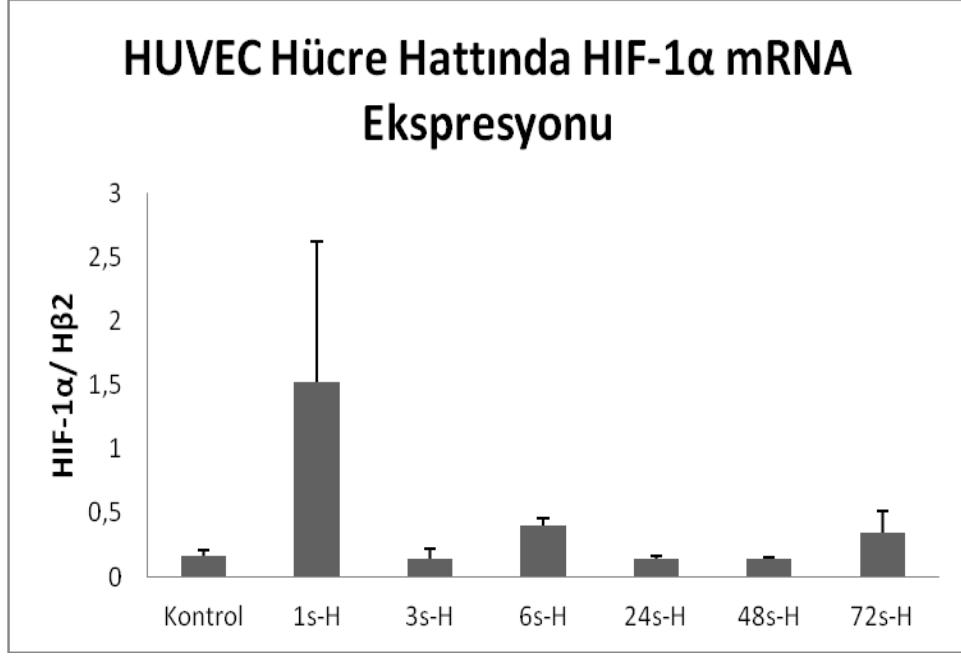
Tablo 3.2:HIF1 α ve H β 2 primer çiftlerinin bilgileri.

Primer	% G-C	TM	Primer dizisi
HIF1 α İleri Primer	% 55	56°C	5'-CCACCTATGACCTGCTTGGT-3'
HIF1 α Geri Primer	% 55	56°C	5'-TGTCCTGTGGTGACTTGTCC-3'
H β 2 İleri Primer	% 55	52°C	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
H β 2-Geri Primer	% 55	52°C	5'-CATGTCTCGATCCCACTTAAC-3'

Elde edilen cT değerleri Livak metoduna göre değerlendirilmiş ve grafiklendirilmiştir (Şekil 3.5-Şekil 3.6).



Şekil 3.5: PC-3 Hücre Hattında Hipoksik Ortamın Doğrulanması.

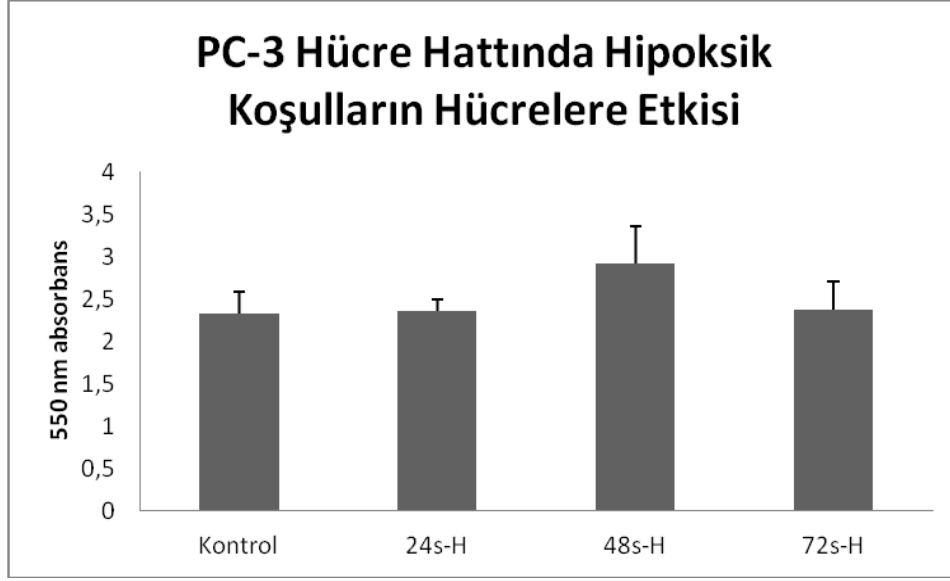


Şekil 3.6: HUVEC Hücre Hattında Hipoksik Ortamın Doğrulanması.

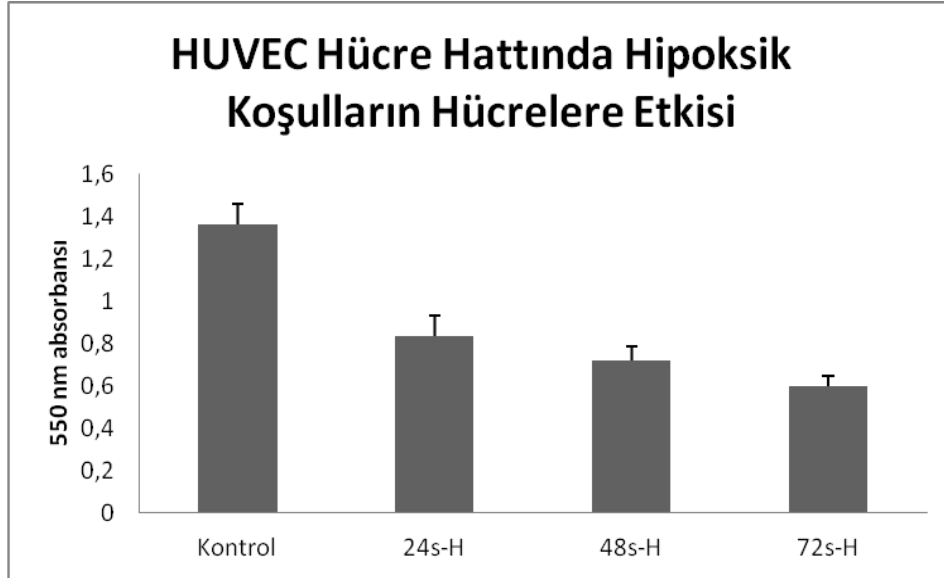
3.2.2 Hipoksik Koşulların Hücre Proliferasyonuna Etkisinin MTT ile Analizi

Kullandığımız hücre hatlarımız olan PC-3 ve HUVEC hücrelerinde hipoksik ortamda PSMD4 regülasyonuna bakmayı amaçlanmıştır. Ancak hipoksik koşulların bu hücre hatlarının proliferasyonuna olan etkisi merak edilmiştir. Bu amaçla 96 kuyulu plakalara her kuyuya 50.000 olacak şekilde hücreler yayılmıştır. 24 saat sonrasında hücrelerin bir kısmına kimyasal hipoksi oluşturmak için son konstrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulanmıştır. Kalan hücrelere ise hiçbirşey uygulanmayarak normal koşullarda kalması sağlanmıştır.

1, 3, 6 ve 24 saat sonrasında bütün hücrelere Bölüm 2.2.8.5’de anlatıldığı gibi MTT testi uygulanmıştır. Sonuçlar excelde değerlendirilmiştir (Şekil 3.7-3.8)



Şekil 3.7:PC-3 hücre hattında hipoksik ortamın hücre proliferasyonuna etkisi MTT Testi değerlendirilmesi.



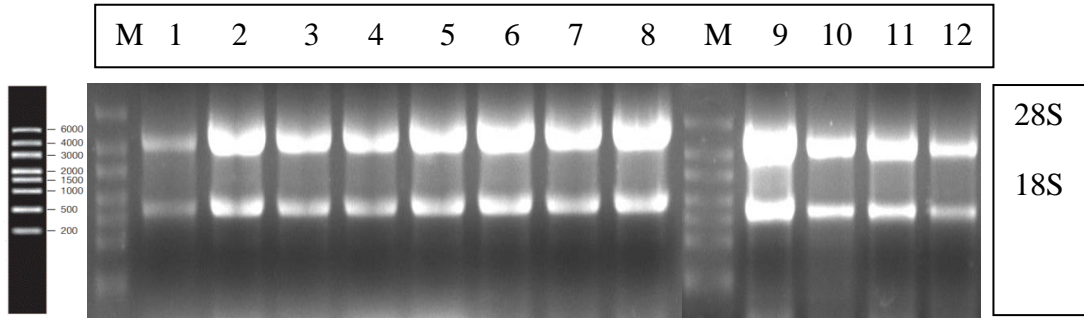
Şekil 3.8: HUVEC hücre hattında hipoksik ortamın hücre proliferasyonuna etkisi MTT Testi değerlendirilmesi.

PC-3 hücre hattında oluşturulan kimyasal hipoksiya hücre proliferasyonuna etki etmemektedir, ancak HUVEC hücre hattında oluşturulan kimyasal hipoksiya hücre proliferasyonuna azaltıcı etkisi bulunmaktadır.

3.2.3 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Geninin mRNA Seviyesinin Belirlenmesi

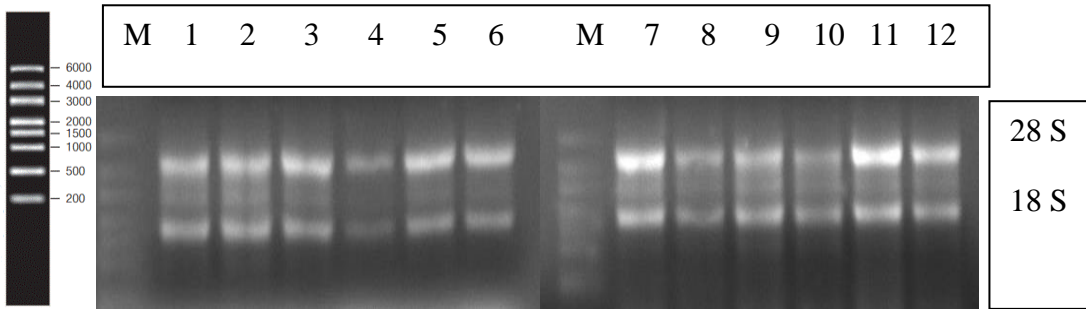
İnsan PSMD4 geninin hipoksik koşullardaki mRNA seviyesindeki ekspresyonuna bakılmak için iki ayrı hücre hattı seçilmiştir. Bu hücre hattı PC-3 ve HUVEC'dir. Bu hücreler Bölüm 2.2.8.3'de anlatıldığı şekilde büyütülmüştür. Yeterli olgunluğa ulaştığında Bölüm 2.2.10.1'de anlatıldığı gibi hücreler 25 cm² flasklara yayılmıştır. Hipoksik ortam oluşturulmak istenilen flasklara son konstrasyonu 150 µM olacak şekilde CoCl₂ uygulanmıştır. Hücreler 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonra tripsin ile pellet halinde kaldırılmıştır.

Pelletlerden Bölüm 2.2.10.2'de belirtildiği şekilde RNA izolasyonu yapılmıştır ve RNA jel elektroforezinde Bölüm 2.2.10.3'de anlatıldığı gibi yürütülmüştür. Sonuçlar UV görüntüleme de fotoğraflanmıştır (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10)



Şekil 3.9:PC-3 hücre hattında hipoksia ile indüklenmiş ve normal hücrelerden elde edilen RNA jel elektroforez görüntüsü.

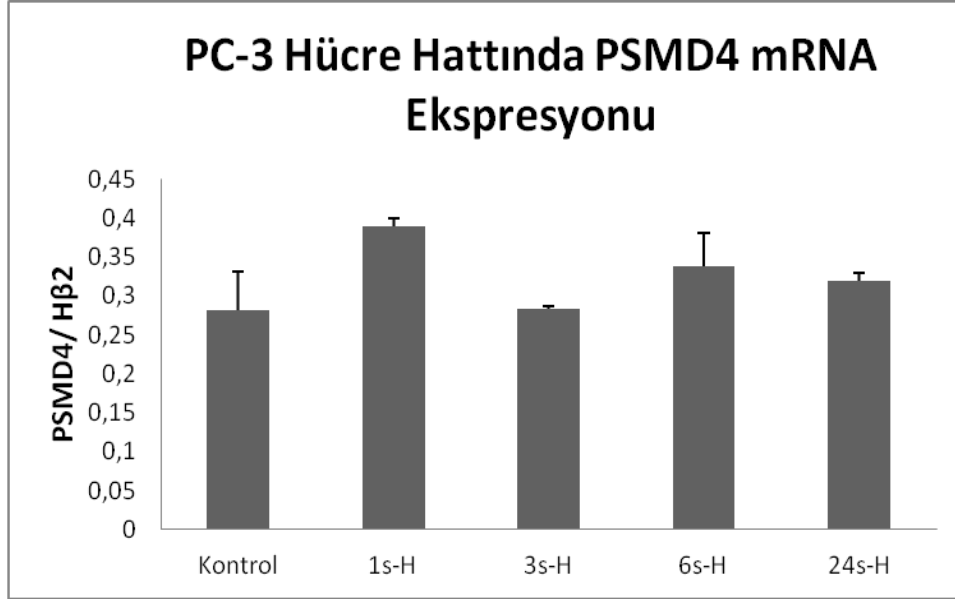
(M:RNA büyüklük belirteci, 1-12 farklı RNA örnekleri)



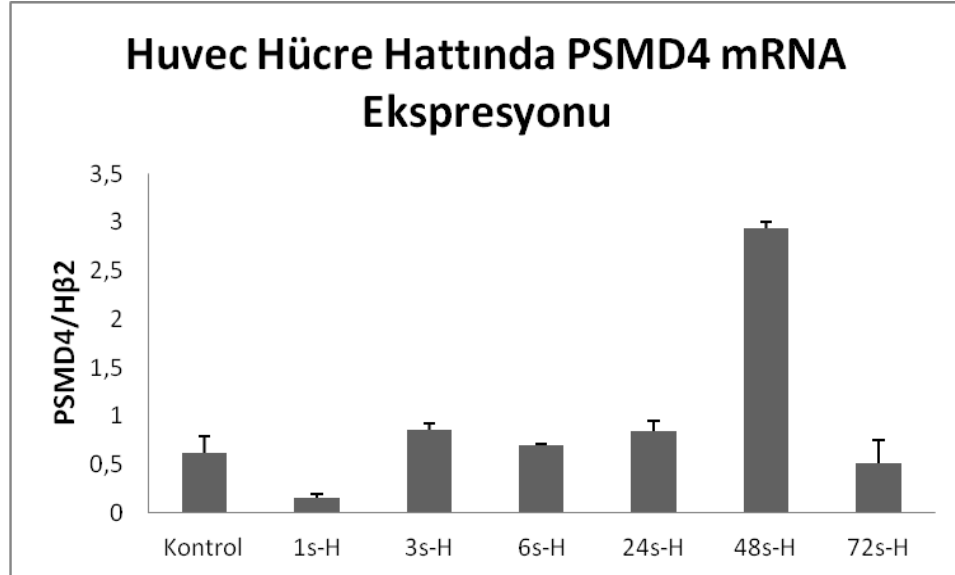
Şekil 3.10:HUVEC hücre hattında hipoksia ile indüklenmiş ve normal hücrelerden elde edilen RNA jel elektroforez görüntüsü.

(M:RNA büyüklük belirteci, 1-12 farklı RNA örnekleri)

İzole edilen bu RNA'lerden Bölüm 2.2.10.4'de belirtilen şekilde miktarı spektrofotometride ölçülmüştür. 1000 ng RNA kullanılarak Bölüm 2.2.10.5.'de anlatılan şekilde cDNA sentezlenmiştir. Bu cDNA'lar kullanılarak insan PSMD4 380 bç ekspresyon primerler ile Bölüm 2.2.10.6'da belirtilen şekilde gerçek zamanlı PZR yapılmıştır. Sonuçların cT değerleri Livak metotuna göre excelde değerlendirilmiştir (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12)



Şekil 3.11: PC-3 hücre hattında PSMD4 mRNA ekspresyonu.



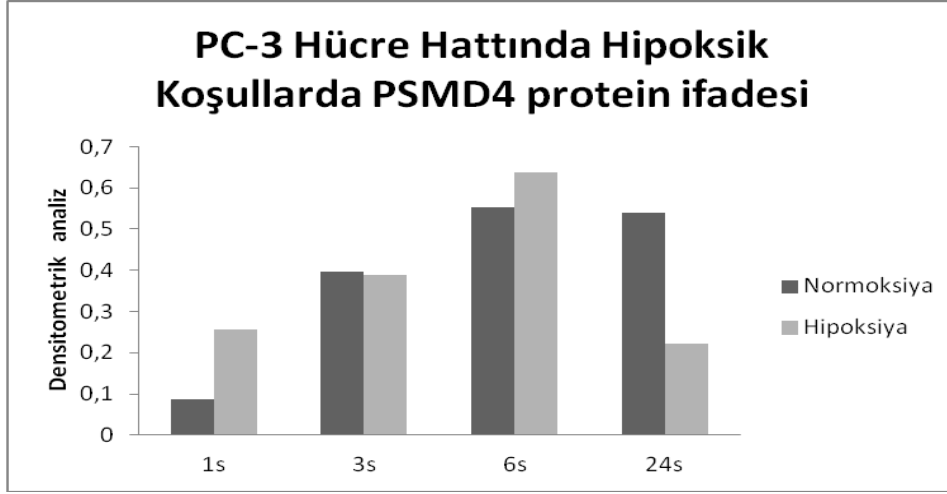
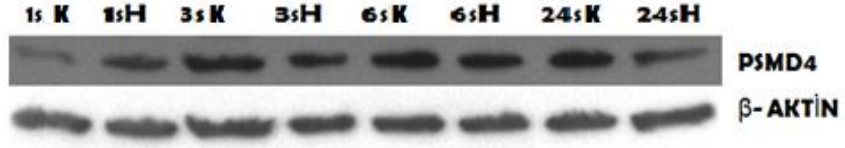
Şekil 3.12: HUVEC hücre hattında PSMD4 mRNA ekspresyonu.

3.2.4 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Protein Seviyesinin Belirlenmesi

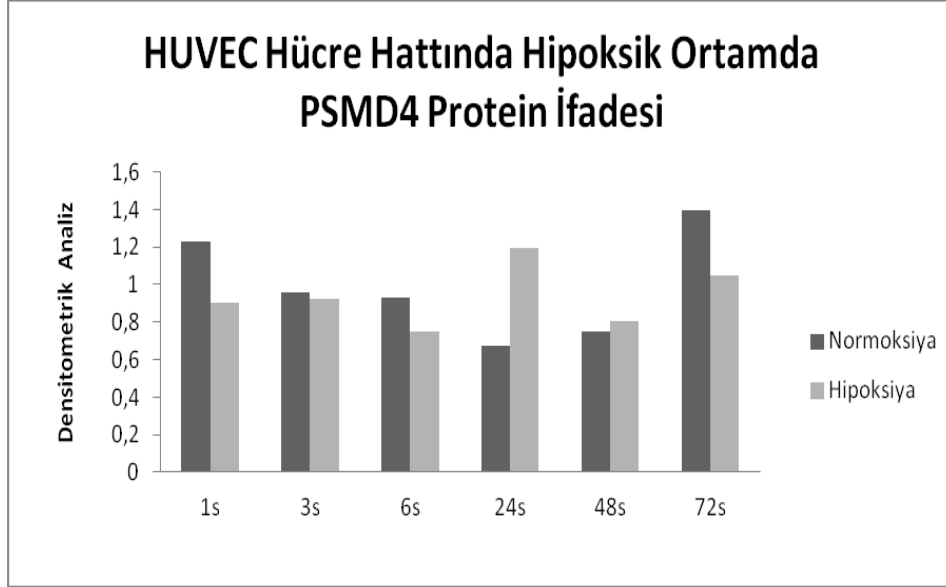
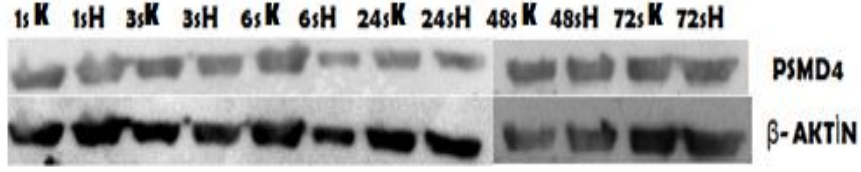
İnsan PSMD4 geninin hipoksik koşullardaki protein seviyesindeki farklılığı incelemek için PC-3 ve HUVEC hücreleri Bölüm 2.2.8.3’de anlatıldığı şekilde büyütülmüştür. Yeterli olgunluğa ulaştığında Bölüm 2.2.11.1’de anlatıldığı gibi hücreler 6 kuyulu plakalara yayılmıştır. Hipoksik ortam oluşturulmak istenilen kuyulara son konstrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulanmıştır. Hücreler 1, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat sonra tripsin ile pellet halinde kaldırılmıştır.

Pelletler; Bölüm 2.2.11.2 belirtildiği şekilde hazırlanan ripa tampo ile çözülerek hazırlanmıştır. Protein miktarları Qubit cihazında Bölüm 2.2.11.3’de ifade edildiği şekilde ölçülerek hesaplanmış ve 50 μ g olacak şekilde SDS jele yüklenmiştir.

Western blotting çalışması için Bölüm 2.2.11.4’de anlatılan gerekli solusyonlar hazırlanmıştır. Jeller Bölüm 2.2.11.5’de belirtilen şekilde bir gece +4°C’de transfere bırakılmıştır. Bir gece sonrasında transfer işlemi tamamlanmasıyla membrana geçen proteinler ilk olarak PSMD4 antikoru (1:1000) uygulanmış sonrasında bu antikora uygun ikincil antikor (1:5000) uygulanarak proteinlere ait ışımalar filme aktarılmıştır. Membranlar kontrol amacıyla β -aktin antikoru (1:10.000) uygulanmış sonrasında bu antikora uygun sekonder antikor (1:5000) uygulanarak proteinlere ait ışımalar filme aktarılmıştır. Protein bantları İmaj-J program kullanılarak densitometrik olarak ölçülmüş ve ardından excelde değerler beta aktin değerleri ile normalize edilerek grafiklendirilmiştir (Şekil 3-13 ve Şekil 3-14).



Şekil 3.13: PC-3 hücrelerinde hipoksik ortamda PSMD4 protein ekspresyonu.

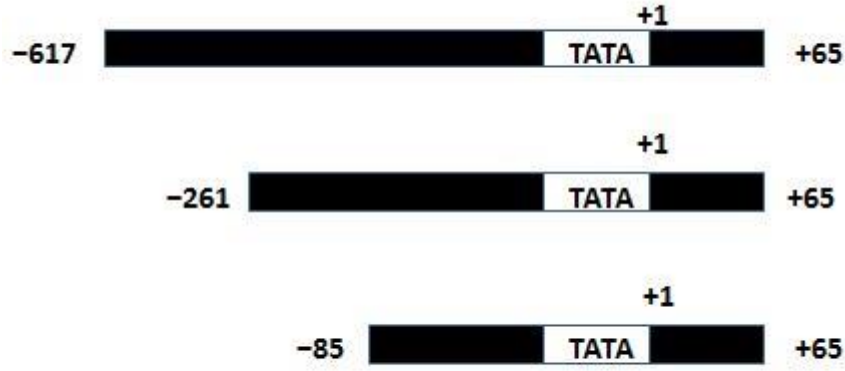


Şekil 3.14: HUVEC hücrelerinde hipoksik ortamda PSMD4 protein ekspresyonu.

3.3 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Klonlaması

3.3.1 PSMD4 Geninin Promotoruna Spesifik Primerlerin Tasarımı

Primer tasarımına başlamadan önce ilk olarak gene ait nükleotit dizi gen bankasından bulunmuştur. Genomdaki PSMD4 geninin NG_029700.1 nolu nükleotit dizisinde promotor bölgesi analiz edilmiştir. Bu promotor bölgesinde transkripsiyon başlangıç bölgesini içine alacak şekilde farklı baz çiftlik bölgeleri için ileri ve geri primerleri tasarlanmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: PSMD4 farklı promotor parçalarına ait temsili şekil.

Herbir bölge için ayrı ayrı tasarlanan ileri ve geri primerin Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve % G-C oranına dikkat edilmiştir. Primerler NCBI data bankta bulunan DNA sekansı ile insan PSMD4 genine benzerliği kontrol edilmiştir.

Tablo 3.3: Tasarlanan Primer Dizileri.

Primer Adı	Tm Sıcaklığı	% G-C	Baz dizisi
682 bç-İleri	72°C	% 44.0	5'-CTCGAG TAGAAAGTCATTAGCGATC-3'
326bç-İleri	72°C	% 48.0	5'-CTCGAG GGAATCGACACAGCAACT-3'
150 bç-İleri	76°C	% 52.0	5'-CTCGAG TACAACTCCCAGAACGCAA-3'
Geri Primer	76°C	% 52.0	5'- TTCGAA CATCTTGCCACCTTC CTCC-3'

3.3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

PSMD4 Promotor bölgelerini klonlamak amacıyla Bölüm 2.2.2.2 'de belirtildiği şekilde kandan genomik DNA izole edilmiştir. Genomik DNA % 0,8'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.16).



Şekil 3.16: Kandan izole edilen genomik DNA agaroz jel elektroforez görüntüsü.

(1-2: 1 ve 2 nolu genomik DNA örnekleri).

3.3.3 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının PCR ile Çoğaltılması

Farklı büyüklükteki PSMD4 promotor parçalarını elde etmek amacıyla tasarlanan her bir primer için ilk olarak T_m ve $MgCl_2$ optimizasyonu yapılmıştır. PCR Bölüm 2.2.2.3’de belirtildiği şekilde kurulmuştur. Sadece $MgCl_2$ miktarında değişimler yapılmıştır.

PSMD4 682 bp ileri ve geri primer için T_m değeri $57^\circ C$ ve $MgCl_2$ değeri 4mM; PSMD4 326 bp ileri ve geri primerler için T_m değeri $56^\circ C$ ve $MgCl_2$ değeri 2mM; PSMD4 150 bp ileri ve geri primerler için T_m değeri $57^\circ C$ ve $MgCl_2$ değeri 2mM olarak karar verilmiştir.

Her bir primer için karar verilen $MgCl_2$ miktarında, Tablo 3.4’deki PCR bileşenler ile birlikte Tablo 3.5’de belirtilen PCR döngüsünde amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.

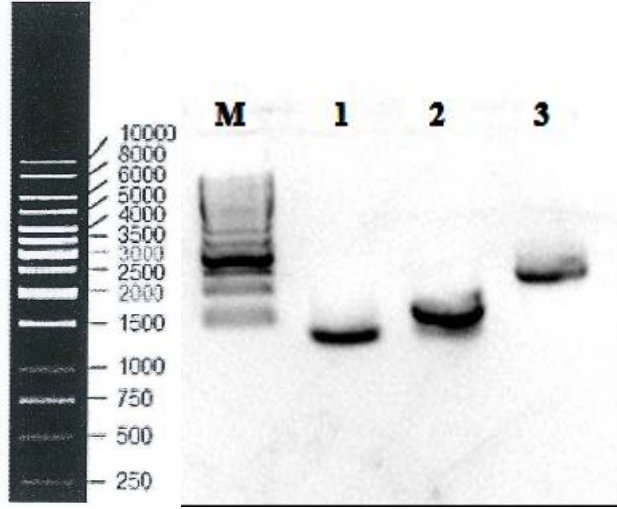
Tablo 3.4: PSMD4 promotor PCR bileşenleri.

PCR Bileşenleri	Örnek	Pozitif Kontrol (Hβ2)	Negatif Kontrol
gDNA	10 µL	5 µL	-----
MgCl ₂ (1mM, 2mM, 4mM)	4 µL, 8µL	4 µL	4 µL
Tag Buffer +MgCl ₂	5 µL	5 µL	5 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL
İleri primer (100ng/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Geri primer (100ng/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
dH ₂ O	27 µL-23 µL	32 µL	37 µL
Taq DNA Polimeraz	1 µL	1 µL	1 µL
Toplam Hacim	50 µL	50 µL	50 µL

Tablo 3.5: PSMD4 promotor PCR döngüsü.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94°C	5 dakika
2	35	94°C	45 saniye
		56°C-57°C	30 saniye
		72°C	45 saniye
3	1	72°C	10 dakika

PCR ürünleri % 1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. UV görüntüleme sisteminde görüntülendi. Her bir parça için tek bir bant Şekil 3.17'de belirtildiği gibi elde edildi.



Şekil 3.17: PSMD4 farklı promotor primerlerin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

M: 1kb (SM0311) marker, 1: PSMD4 150 bç promotor PCR ürünü; 2: PSMD4 326 bç promotor PCR ürünü; 3: PSMD4 682 bç promotor PCR ürünü.

3.3.4 Farklı Büyüklükteki İnsan PSMD4 Promotor PCR Ürünlerinin pGEM-T-Easy Vektörüne Klonlanması

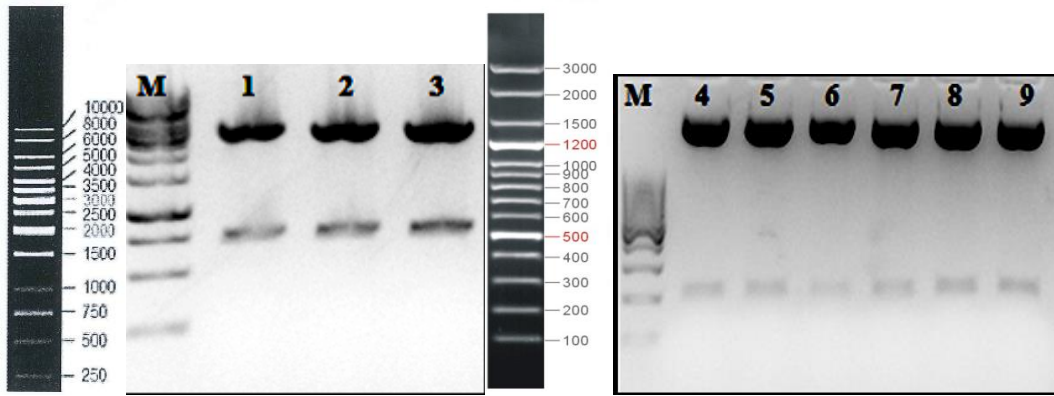
PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp UV görüntüleme sisteminde kontrol edildikten sonra Bölüm 2.2.2.5’de belirtildiği gibi jelden geri kazanılmıştır. Daha sonra kazanılan örneklerin bir kısmı tekrar jelde yürütülmüştür. Bunun sonunda agaroz jelden kazanma işleminin başarılı gerçekleştirildiğine emin olunmuştur.

Klonlamaya hazır hale gelen promotor PCR ürünleri Bölüm 2.2.2.7’de belirtilen miktarlarda pGEM-T-Easy vektörü ile +4°C’de ligasyona bir gece bırakıldı.

Ligasyon ürünleri daha önceden Bölüm 2.2.3.1 ve Bölüm 2.2.3.2 belirtilen şekilde hazırlanan, etkinliği hesaplanan *E.coli XL-1* ve *DH5α* kompetant hücrelere transforme edildi. Ampisilin antibiyotiği içeren LB-Agarlı petrilere mavi beyaz koloni seçilimi yapılması amacıyla X-gal ve IPTG yayıldı. Bu petrilere transformasyon ürünleri yayılarak 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Oluşan beyaz koloniler rekombinant yani PSMD4 promotorünü içeren plazmiti bulunduran kolonilerdir.

Her bir PSMD4 promotor parçası için beyaz kolonilerden 2 tane seçilerek LB sıvı besi kültürüne tek koloni ekim yapıldı. Hücreler bir gece boyunca 37°C çoğaltılarak ertesi gün Thermo Scientific Plazmit mini prep kiti kullanılarak izolasyon yapıldı.

Plazmit izolasyonu ürünleri Sac2 ve Pst1 enzimleri ile kesilerek kontrol kesim yapıldı. Bu enzimler PSMD4 promotor parçalarının hiçbirini kesmemektedir. Vektörün polilinker bölgesinden kestiği için kesim sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülediğinde sadece PSMD4 promoter parçalarını görmek amaçlanmıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: pGEM-T-Easy vektörüne klonlanan PSMD4 promotor parçalarının kesim sonuçları.

(M: 1 kb Marker SM0311, 1: PSMD4 682 bç promotor parçası-1.koloni, 2: PSMD4 682 bç promotor parçası-2.koloni, 3:PSMD4 682 bç promotor parçası-3.koloni, M: 100 bç Marker, 4: PSMD4 326 bç promotor parçası-1.koloni, 5: PSMD4 326 bç promotor parçası-2.koloni, 6: PSMD4 326 bç promotor parçası-3.koloni, 7: PSMD4 150 bç promotor parçası-1.koloni, 8: PSMD4 150 bç promotor parçası -2.koloni, 9: PSMD4 150 bç promotor parçası-3.koloni.

Her üç PSMD4 promotor parçası için seçilen kolonilerin kontrol kesimi sonucu tüm kolonilerin rekombinat olduğu görülmüştür. 682 bç, 326 bç ve 150 bç PSMD4 promotor parçası için 1.koloniler seçilerek REFGEN Biyoteknolojiye dizi analizine gönderilmiştir. Elde edilen dizi analiz sonuçları biyoinformatik olarak NCBI'da analiz edilmiş ve insan PSMD4 promotor dizisi ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.19, 3.20, 3.21). Dizi analizi sonucu ve gen bankasında bulunan dizi arasındaki uyum oldukça yüksektir. Bu nedenle seçilen 1.kolonilerle klonlama çalışmalarına devam edilmiştir.

```

PSMD4 1   GTAGAAAGTCATTAGCGATCCCGACACTTTTTTTTTCTTTTTTTGAGACGGAGTCTCAC 60
          |||
NCBI Dizi GTAGAAAGTCATTAGCGATCCCGACACTTTTTTTTTCTTTTTTTGAGACGGAGTCTCAC

PSMD4 61   TCTGTCCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAATCTCTGCCTCCC 120
          |||
NCBI Dizi TCTGTCCCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAATCTCTGCCTCCC

PSMD4 121  GGGTTCAAGTAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCGGGGATTACAGGCGTGCGCCA 180
          |||
NCBI Dizi GGGTTCAAGTAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCGGGGATTACAGGCGTGCGCCA

PSMD4 181  CCATGCCCGGCTAATTTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGTTTCACCATGCTGGCCAGG 240
          |||
NCBI Dizi CCATGCCCGGCTAATTTTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGTTTCACCATGCTGGCCAGG

PSMD4 241  CTGGTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGCTA 300
          |||
NCBI Dizi CTGGTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCGCCCGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGCTA

PSMD4 301  ACAGGCGTGAGCCACCGCGCTCGGCCGATCCCGACACTTTTTTAAAATGCCGAAGCCGGA 360
          |||
NCBI Dizi ACAGGCGTGAGCCACCGCGCTCGGCCGATCCCGACACTTTTTTAAAATGCCGAAGCCGGA

PSMD4 361  ATCGACACAGCACTTTCAAAGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGCCAGCGGGAAA 420
          |||
NCBI Dizi ATCGACACAGCACTTTCAAAGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGCCAGCGGGAAA

PSMD4 421  CCCCAACTGAGAACTGCAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTGTGTTAC 480
          |||
NCBI Dizi CCCCAACTGAGAACTGCAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTGTGTTAC

PSMD4 481  CGCGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTTGGCGGCACCTACAAC 540
          |||
NCBI Dizi CGCGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTTGGCGGCACCTACAAC

PSMD4 541  CCCAGAACGCAACGTGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAAGCCGAGGTCTGTGATT 599
          |||
NCBI Dizi CCCAGAACGCAACGTGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAAGCCGAGGTCTGTGATT

PSMD4 600  GGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGT 628
          |||
NCBI Dizi GGTGAAGAGCGACGGGCCAATTGGAGGAGT

```

Şekil 3.19: PSMD4 682 beç promotor bölgesi ve NCBI dizi blast sonucu.

```

PSMD4 2   AGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGGAAACCCCAACTGAGAAGTCAA 54
          |||
NCBI Dizi AGGTTCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGGAAACCCCAACTGAGAAGTCAA

PSMD4 55   TGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTTGTGTTACCGCGATTCCCTTCAACTAC 111
          |||
NCBI Dizi TGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTTGTGTTACCGCGATTCCCTTCAACTAC

PSMD4 112  CCTCAAGACGCCTACAAATTGTTTGGCGGCACCTACAACCTCCAGAACGCAACGTGGGG 171
          |||
NCBI Dizi CCTCAAGACGCCTACAAATTGTTTGGCGGCACCTACAACCTCCAGAACGCAACGTGGGG

PSMD4 172  GACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATTGGTGAAGAGCGACGGGCCA 231
          |||
NCBI Dizi GACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATTGGTGAAGAGCGACGGGCCA

PSMD4 232  ATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAA 291
          |||
NCBI Dizi ATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAA

PSMD4 292  GATG 295
          |||
NCBI Dizi GATG

```

Şekil 3.20: PSMD4 326 bç promotor bölgesi ve NCBI dizi blast sonucu.

```

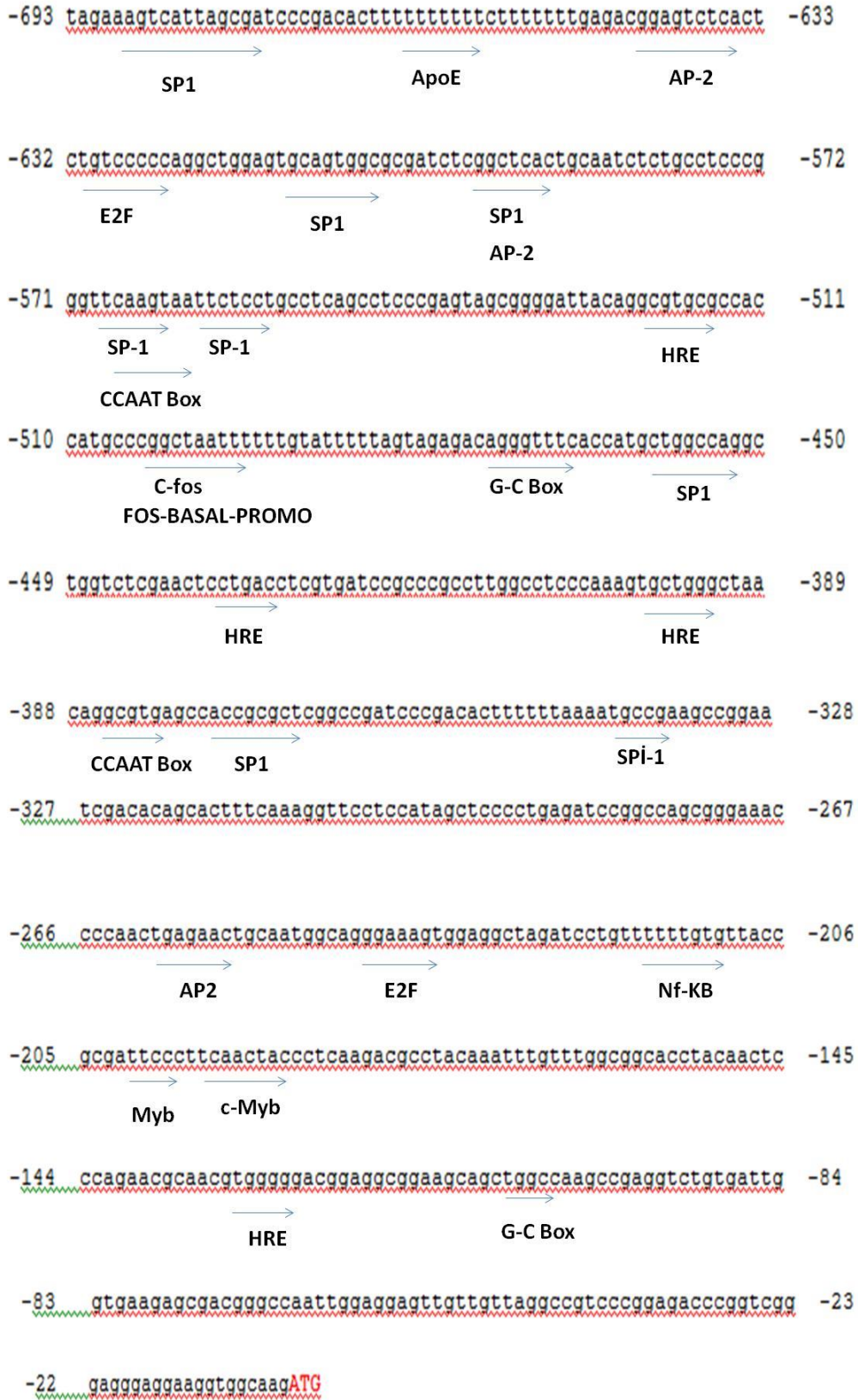
PSMD4 3   TGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATTGGTGAAGAGCGACG 61
          |||
NCBI Dizi TGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATTGGTGAAGAGCGACG

PSMD4 62   GGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCGGGAGGGAGGAAGGT 121
          |||
NCBI Dizi GGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCGGGAGGGAGGAAGGT

PSMD4 122  GGCAAGATG 130
          |||
NCBI Dizi GGCAAGATG

```

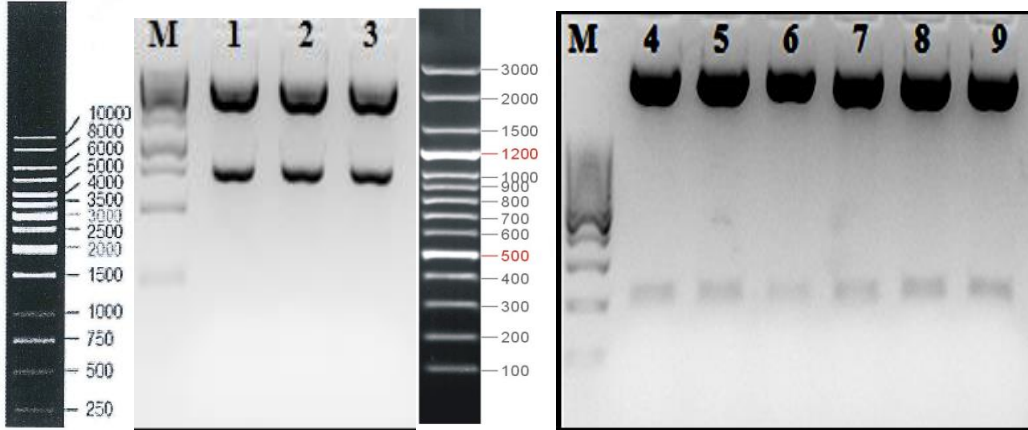
Şekil 3.21: PSMD4 150 bç promotor bölgesi ve NCBI dizi blast sonucu.



Şekil 3.22: PSMD4 promotor bilgileri

3.3.5 Farklı Büyüklükteki İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Haberci Lusiferaz Vektörüne Klonlanması

pGEM-T-Easy vektörüne klonlanan insan PSMD4 promoter parçalarının fonksiyonel aktivitesinin belirleneceği pMet-Luc lusiferaz reporter vektörüne alt klonlama yapıldı. Bu amaçla Şekil 3.18’de görülen kesim sonucu oluşan bantlar jelden geri kazanıldı. Daha sonra pMet-Luc vektöründe aynı şekilde Sac2 ve Pst1 enzimleri ile kesildi. Geri kazanılan promotor parçaları ve pMET-Luc vektörü bir gece +4°C ligasyona bırakıldı. Her PSMD4 parçalarını içeren ligasyon ürünlerinin her biri bir *E.coli DH5α* hücrelerine transforme edildi. pMET-Luc vektörü kanamisin antibiyotiğine dirençli olduğu için transformasyon ürünü kanamisin içeren petrilere yayıldı. Bu petrilere bir gece 37°C’lik etüvde bekletildi. Her bir PSMD4 parçasını içeren yeni 3 koloni sıvı besiyerine edildi. Bir gece büyümeye bırakıldı. Ertesi gün bu kültürlerden Thermo Scientific kiti kullanılarak küçük ölçekli plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmitler Sac2-Pst1 enzimleri ile kesilerek % 1’lik agaroz jele yüklendi. Jel UV görüntülediğinde 682 bç, 326 bç, 150 bç PSMD4 promoter parçalarını görüntülendi (Şekil 3.23)



Şekil 3.23:pMET-Luc vektörüne alt klonlama yapılan PSMD4 promotor parçalarının kontrol kesim sonuçları.

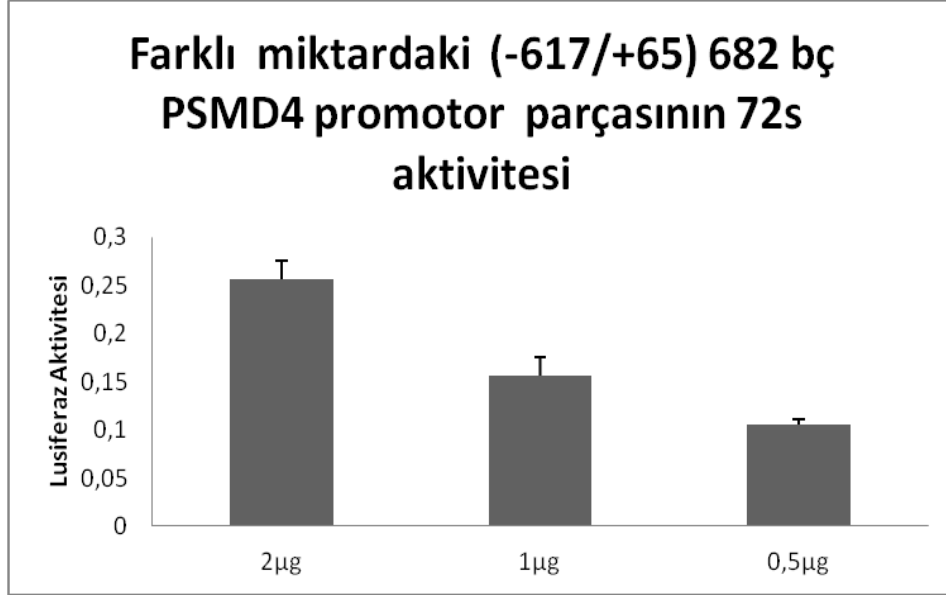
(M: 1 kb Marker SM0311, 1: PSMD4 682 bç promotor parçası-1.koloni, 2: PSMD4 682 bç promotor parçası-2.koloni, 3:PSMD4 682 bç promotor parçası-3.koloni, M: 100 bç Marker, 4: PSMD4 326 bç promotor parçası-1.koloni, 5: PSMD4 326 bç promotor parçası-2.koloni, 6: PSMD4 326 bç promotor parçası-3.koloni, 7: PSMD4 150 bç promotor parçası-1.koloni, 8: PSMD4 150 bç promotor parçası -2.koloni, 9: PSMD4 150 bç promotor parçası-3.koloni.

Klonlanan PSMD4 promotor parçalarını içeren plazmitleri büyük ölçekli elde etmek amacıyla Thermo Scientific büyük ölçekli plazmit izolasyonu kiti kullanarak Bölüm 2.2.4.2' de belirtilen şekilde izolasyon yapıldı.

3.4 İnsan PSMD4 Promoter Parçalarının Miktar Optimizasyonu ve Bazal Aktivitesinin Belirlenmesi

PC-3 hücreleri -80°C dondurucudan alındı. Bölüm 2.2.7.3' de belirtilen şekilde hücre soyları başlatıldı. Bölüm 2.2.8.3'de açıklandığı gibi hücreler büyütülerek açıklanan sürelerde pasajlandı.

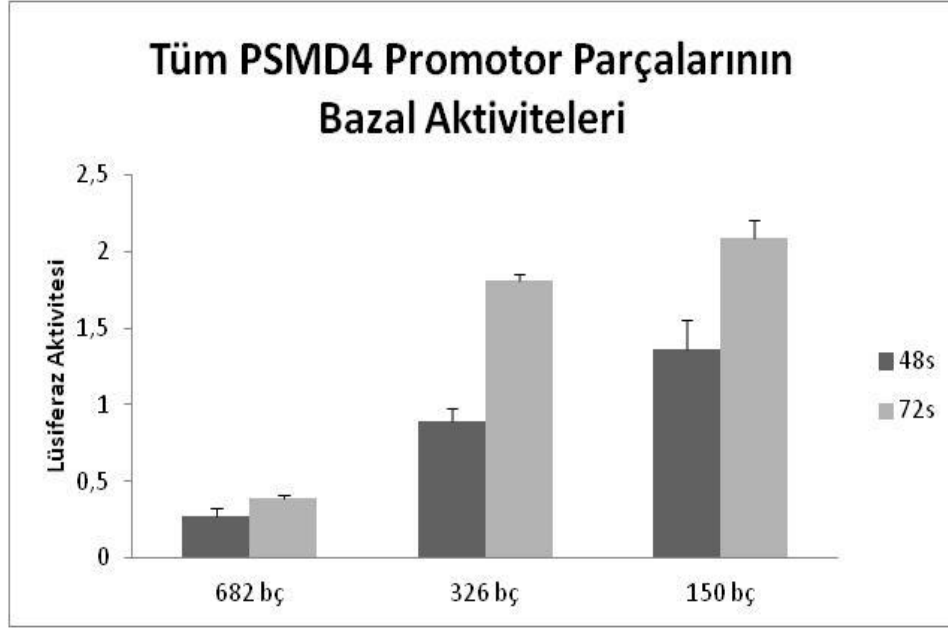
Klonlanan insan PSMD4 promotor parçalarının fonksiyonel analizini belirlemek amacıyla geçici transfeksiyonları yapıldı. Bu amaçla Lipofectamin 2000 Reagent kullanıldı. Bunun için ilk olarak sonraki çalışmalar kullanılacak promotor parçalarının optimum konsantrasyonlarını belirlemek için miktar optimizasyonu yapıldı. Bu nedenle hücreler Bölüm 2.2.8.4 ve Bölüm 2.2.9.1'de belirtildiği şekilde sayılarak 12 kuyulu plakalara yerleştirilmiştir. Klonlanan 682 bç PSMD4 promotor parçası 0,5 µg, 1 µg ve 2 µg olacak şekilde hücrelere Bölüm 2.2.9.2'de ifade edildiği gibi verildi. Sonuçlar; Şekil 3.24'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 682 bç her konsantrasyonda ölçülebilir bir lusiferaz aktivitesi göstermiştir. En düşük konsantrasyon olan 0,5 µg promotor parçası miktarının yeterli olduğu tespit edildi ve sonraki çalışmalarda bu konsantrasyonda promotor parçaları hücrelere transfekte edildi.



Şekil 3.24: 682 bç PSMD4 promotor parçasının miktar optimizasyonu.

3.4.1 İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Transfeksiyon çalışmaları için kullanılan PC-3 hücre hattı Bölüm 2.2.8.3’de anlatıldığı şekilde büyütülmüştür. Hücreler istenilen olgunluğa ulaştığında Bölüm 2.2.9.1’de ifade edildiği şekilde hücreler yayılmış ve 24 saat sonrasında 0,5 µg miktarında 682 bç, 326 bç ve 150 bç PSMD4 promotoru lipofectamin ajan yardımıyla Bölüm 2.2.9.2’de anlatıldığı şekilde geçici transfeksiyon yapılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonra alınan medyumlardan lusiferaz ve SEAP ölçümü Bölüm 2.2.9.3 ve Bölüm 2.2.9.4’de ifade edilen şekilde yapılmıştır. Sonuçlar excelde değerlendirilerek Şekil 3.25’de gösterilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi bütün promotor parçaları 72 saatte zamana bağlı olarak lusiferaz aktivitelerini arttırmıştır. En büyük promotor parçası olan 682 bç (-617/+65) en düşük promotor aktivitesine sahiptir. 326 bç (-261/+65) ve 150 bç (-85/+65) promotor parçalarının lusiferaz aktiviteleri oldukça yüksektir. En büyük promotor parçasında bir silencer olabileceği ve bu bölge çıkarıldıktan sonra promotor parçalarının daha yüksek aktivite gösterdiği düşünülmektedir.



Şekil 3.25: Tüm PSMD4 promotor parçalarının bazal aktiviteleri.

3.4.2 Hipoksik Koşullarda İnsan PSMD4 Promotor Parçalarının Transkripsiyonel Aktivitelerinin Belirlenmesi

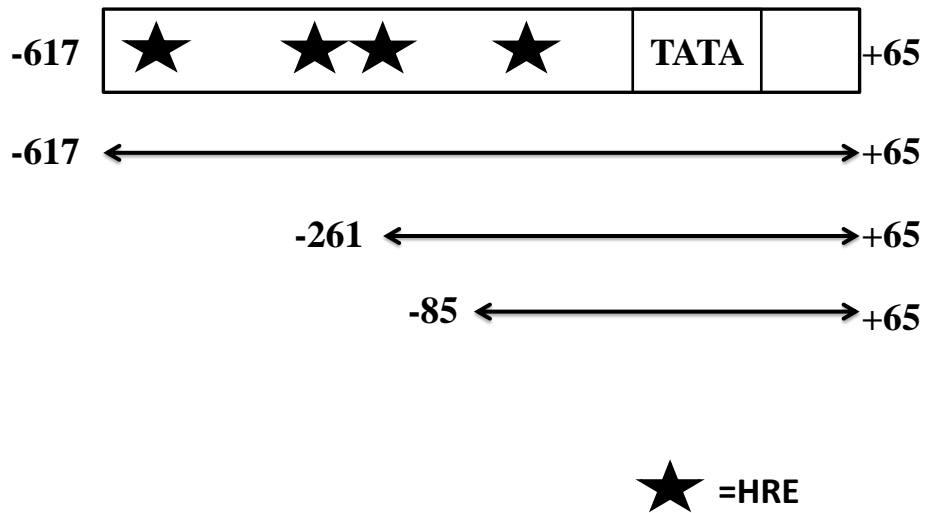
Çalışmamızda insan PSMD4 geninin transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde regülasyonu araştırılmak amaçlanmıştır. Normal koşullara ek olarak hipoksik ortamda da PSMD4 geninin regülasyonu hakkında bilgi bulunmamaktadır. 2006 yılında Levitzki ve ekip arkadaşlarının yaptığı çalışmada HIF-1 α transkripsiyon faktörünün bağlandığı gösterilmiştir [74]. Ancak hipoksik ortamdaki PSMD4 geninin regülasyonu hakkında bir çalışma bu grup tarafından yapılmamıştır. Klonladığımız insan PSMD4 genine ait promotor parçalarının aktivitesi hem normal hem de CoCl₂ ile indüklenen hipoksik koşullarda değerlendirilmiştir.

Transfeksiyon çalışmaları için kullanılan PC-3 hücre hattı Bölüm 2.2.8.3’de anlatıldığı şekilde büyütülmüştür. Hücreler istenilen olgunluğa ulaştığında Bölüm 2.2.9.1’de ifade edildiği şekilde hücreler yayılmış ve 24 saat sonrasında 0,5 μ g miktarında 682 bç, 326 bç ve 150 bç PSMD4 promotoru lipofectamin ajan yardımıyla Bölüm 2.2.9.2’de anlatıldığı şekilde geçici transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon işleminden 4 saat sonra hipoksik ortam oluşturulmak istenilen kuyulara son kontrasyon 150 μ M CoCl₂ uygulanmıştır.

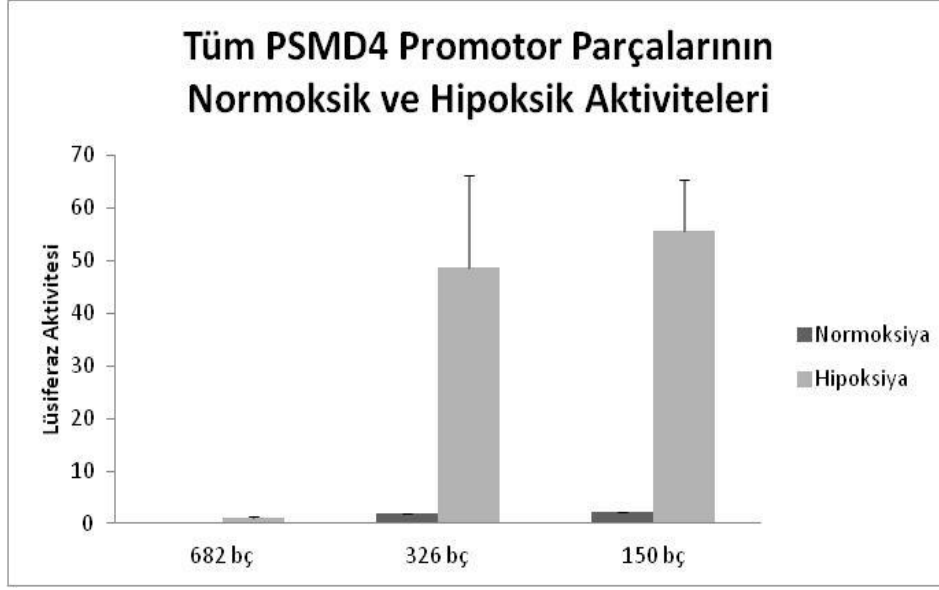
24, 48 ve 72 saat sonra alınan medyumlardan lusiferaz ve SEAP ölçümü Bölüm 2.2.9.3 ve Bölüm 2.2.9.4’de ifade edilen şekilde yapılmıştır. Sonuçlar excelde değerlendirilerek Şekil 3.27’da gösterilmiştir.

Şekil 3.25’de PSMD4 promotor parçalarının olası HRE bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. MATSINSPECTOR transkripsiyon faktör analiz programında inceleme yapılmıştır. En büyük PSMD4 promotor parçası 682 bç (-617/+65)’da 4 adet HRE bölgesi bulunmaktadır. 326 bç (-261/+65) PSMD4 promotor konstrağı ve 150 bç (-85/+65) PSMD4 promotor konstrağının bir adet HRE bölgesi bulunmaktadır.

Promotor parçalarını yukarıda belirtilen şekilde Lipofectamin 2000 Reagent kullanılarak transfeksiyon edildi. Birer kuyuya $CoCl_2$ kullanılarak kimyasal hipoksiya oluşturuldu. 24,48 ve 72 saat sonar alınan transfeksiyon medyumlarından lusiferaz ve SEAP ölçümü yapıldı. Sonuçlar excelde değerlendirildi. Değerlendirme sonucu tüm promotor parçalarının hipoksik ortamdan etkilendiği görülmüştür. Ancak 150 bç (-85/+65) PSMD4 promotor parçası en fazla hipoksik ortamdan etkilenmektedir.



Şekil 3.26:PSMD4 promotor parçalarının HRE bağlanma bölgeleri.



Şekil 3.27:Tüm PSMD4 promotor parçalarının hipoksik koşullarda aktivitesi.

3.5 PSMD4 Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

3.5.1 PSMD4 Genine Spesifik Klonlama Primerlerin Tasarımı

Çalışmamıza başlamadan önce NCBI data banktan PSMD4 genine ait NM_002810.2 kodlu mRNA dizisinde tüm bölgeyi içeren ileri ve geri primerler dizayn edilmiştir. Bu primerlerin Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve % G-C miktarının yüksek olmaması amaçlanmıştır. Primerlerin databank ile benzerliği NCBI Blast yapılarak kontrol edilmiştir.

Tablo 3.6: PSMD4 genine ait klonlama primerleri.

	Primer dizisi	% G-C	Tm Sıcaklığı
İleri Primer	5'CACCATGGTGTGGAAAGCACTATGGT3'	48.1	78°C
Geri Primer	5'CTTCTTGTCTTCCTCCTTCTTGTCCTTC-3'	46.4	82°C

3.5.2 PSMD4 Geninin Klonlanması

Tüm hücre hatlarında PSMD4 mRNA ekspresyonuna baktığımızda PC-3 ve HUVEC hücre hatlarında genimizin ekspresyonunu en yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sebepten PC-3 ve HUVEC hücreleri, Bölüm 2.2.7.4’de anlatıldığı gibi büyütüldü. Hücre pelletlerinden Bölüm 2.2.10.2 ve Bölüm 2.2.10.5. ‘de ifade edildiği gibi RNA izolasyonu yapıldı ardından cDNA sentezlendi.

PC-3 ve HUVEC cDNA’ları kullanılarak PSMD4 geni klonlama primerleri ile PZR yapıldı.

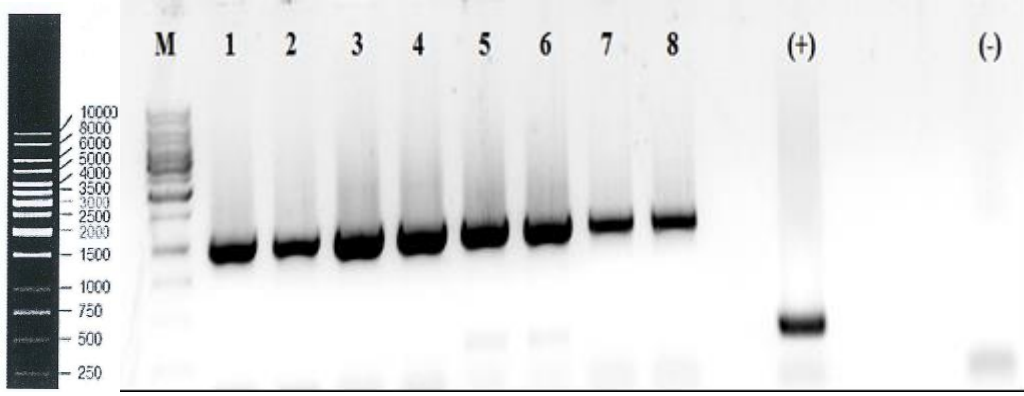
Tablo 3.7: Klonlama PZR Bileşenleri.

	Örnek	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
DNA	10 µL	1 µL	-
MgCl ₂	4 µL	4 µL	4 µL
Tag Buffer (KCl ₂)	5 µL	5 µL	5 µL
dNTP	1 µL	1 µL	1 µL
Primer-İleri	1 µL	1 µL	1 µL
Primer-Geri	1 µL	1 µL	1 µL
dH ₂ O	27 µL	36 µL	37 µL
Taq Polimeraz	1 µL	1 µL	1 µL

Tablo 3.8: PZR Döngüsü.

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	94°C	5 dakika
2	35	94°C	45 saniye
		56°C	30 saniye
		72°C	45 saniye
3	1	72°C	10 dakika

Belirtilen koşullarda kurulan PZR ürünleri % 0,8’lik hazırlanan agaroz jele yüklenmiştir. Sonuçlar UV görüntüleme ile incelenerek Şekil 3.28’de gösterildiği gibi fotograflanmıştır.

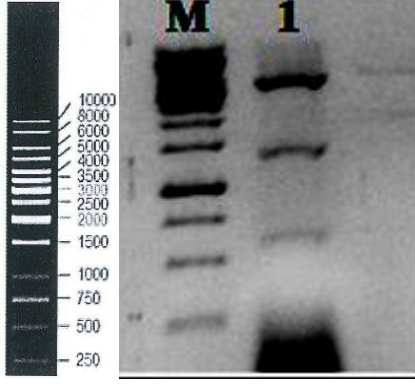


Şekil 3.28:PSMD4 klonlama PZR görüntüsü.

(M: SM0311-1 kb Marker, 1-8 numaralı : PZR ürünleri, (+): Pozitif kontrol, (-): Negatif kontrol).

Bölüm 2.2.2.5 'de belirtilen şekilde PZR ürünleri jelden geri kazanıldı. pcDNA 3.3 TOPO gateway ekspresyon vektörüyle geri kazanılan ürünler vektörün kitinde belirtilen geri kazanılan üründen 4 µL, tuz solusyonundan 1 µL ve vektörden 1µL konularak oda sıcaklığında 5 dakika ligasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürünü kompetan hücrelere Bölüm 2.2.3'de ifade edildiği şekilde transforme edilmiştir. Kolonilerden seçim yapılarak sıvı besiyeri LB-Broth'a ekildi. Bölüm 2.2.4.1'da belirtilen şekilde küçük ölçekli plazmit izolasyonu yapılmıştır.

Plazmit izolasyonu ürünler; Xba1 ve BamH1 enzimleri ile kesilerek klonlamanın başarılı ve klonlanan gen ürünü vektöre doğru yönde mi yerleştiği kontrol edildi Bölüm 2.2.5.'de ifade edildiği şekilde kontrol kesim yapılmıştır. Xba1 enzimi vektörü 724bç'lik bölgeden kesiyor ancak PSMD4 genini kesmiyordur. BamH1 enzimi ise genin 1037 bç'lik bölgesinden kesmektedir. BamH1 enzimi vektörü kesmiyor. Bu kesim sonrası 1057 bç ve 2500 bç parçaların çıkması beklenmekteydi. Kesim ürünleri agaroz jele yüklenerek sonuçlar görüntülendi.



Şekil 3.29:PSMD4 kontrol kesim yapılan koloni.

(M: SM0311, 1kb Marker, 1: PSMD4 klonlama koloni).

Kontrol kesim ile rekombinant olduğuna emin olduğumuz bu koloni REFGEN-TEKNOKENT'e dizilimeye gönderilmiştir. Dizilime sonrasında elde edilen nükleotitler NCBI Blast yapılarak analiz tamamlanmıştır.

```

PSMD4 1   TGCGCATCATTGCCTTTGTGGGAAGCCCAGTGGAGGACAATGAGAAGGATCTGGTGA AAC 59
          |||
NCBI 233  TGCGCATCATTGCCTTTGTGGGAAGCCCAGTGGAGGACAATGAGAAGGATCTGGTGA AAC 292

PSMD4 60  TGGCTAAACGCCTCAAGAAGGAGAAAAGTAAATGTTGACATTATCAATTTGGGGAAGAGG 118
          |||
NCBI 293  TGGCTAAACGCCTCAAGAAGGAGAAAAGTAAATGTTGACATTATCAATTTGGGGAAGAGG 352

PSMD4 119 AGGTGAACACAGAAAAGCTGACAGCCTTTGTAACACGTTGAATGGCAAAGATGGAACCG 178
          |||
NCBI 353  AGGTGAACACAGAAAAGCTGACAGCCTTTGTAACACGTTGAATGGCAAAGATGGAACCG 412

PSMD4 179 GTTCTCATCTGGTGACAGTGCCTCCTGGGCCAGTTTGGCTGATGCTCTCATCAGTTCTC 238
          |||
NCBI 413  GTTCTCATCTGGTGACAGTGCCTCCTGGGCCAGTTTGGCTGATGCTCTCATCAGTTCTC 472

PSMD4 239 CGATTTTGGCTGGTGAAGGTGGTGCCATGCTGGGCTTGGTGCCAGTGACTTTGAATTTG 298
          |||
NCBI 473  CGATTTTGGCTGGTGAAGGTGGTGCCATGCTGGGCTTGGTGCCAGTGACTTTGAATTTG 532

PSMD4 299 GAGTAGATCCCAGTGCTGATCCTGAGCTGGCCTTGGCCCTTCGTGTAICTATGGAAGAGC 358
          |||
NCBI 533  GAGTAGATCCCAGTGCTGATCCTGAGCTGGCCTTGGCCCTTCGTGTAICTATGGAAGAGC 592

PSMD4 359 AGCGGCAGCGGCAGGAGGAGGAGGCCCGCGGGCAGCTGCAGCTTCTGCTGCTGAGGCCG 418
          |||
NCBI 593  AGCGGCAGCGGCAGGAGGAGGAGGCCCGCGGGCAGCTGCAGCTTCTGCTGCTGAGGCCG 652

PSMD4 419 GGATTGCTACTACTGGGACTGAAGACTCAGACGATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCC 478
          |||
NCBI 653  GGATTGCTACTACTGGGACTGAAGACTCAGACGATGCCCTGCTGAAGATGACCATCAGCC 712

PSMD4 479 AGCAAGAGTTTGGCCGCACTGGGCTTCCTGACCTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGA 538
          |||
NCBI 713  AGCAAGAGTTTGGCCGCACTGGGCTTCCTGACCTAAGCAGTATGACTGAGGAAGAGCAGA 772

PSMD4 539 TTGCTTATGCCATGCAGATGTCCCTGCAGGGAGCAGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAG 598
          |||
NCBI 773  TTGCTTATGCCATGCAGATGTCCCTGCAGGGAGCAGAGTTTGGCCAGGCGGAATCAGCAG 832

```

Şekil 3.30:Klonlanan PSMD4 geni ve NCBI dizi blast sonucu.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşam ömrünü tamamlayan protein yıkılması gerekmektedir. Yıkılmayan protein hücrede birçok hasara sebep olmaktadır. Ökaryotik hücrelerde bu proteinlerin yıkımıyla görevli yolaklarda lizozom ve proteazom yer almaktadır [1].

Prokaryot ve ökaryot hücrelerde proteazom bulunmaktadır ve protein yıkımında asıl görevli moleküldür. Proteazom çok alt üniteli enzim kompleksidir. Hücre döngüsünün ilerlemesinde ve apoptosis proteinlerinin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Bu nedenle kanser tedavisi için önemli bir hedef haline gelmiştir [2].

Birçok proteazom çeşitleri bulunmaktadır. En özel olarak memelilerde bulunan sitozolik 26S proteazom'dur. Yaklaşık 2000 kDa'dur. 26S proteazom merkezi 20S kor partikülü ve iki adet 19S düzenleyici alt ünite içermektedir [10]. Yıkılacak proteinlerin yıkılmayacaklardan ayırt edilmesi gerekmektedir. Bu problemi çözmek amacıyla ubikitinler yıkılacak proteinlere bağlanarak işaretlenir. 26S proteazomun 19S regülatör başlığı ubikitin işaretli proteinleri tanıyarak katlarını açar ve onları yıkım için proteazoma gönderir [1].

Proteazomal degradasyonda bir diğer unsur proteinlerin içerdiği aminoasit dizileridir. Bazı aminoasit dizileri proteinleri degradasyona daha açık hale getirir ve proteinin yarı ömrünü belirler. Bunlardan ilki 'PEST' dizileridir. PEST dizi Prolin, Glutamik asit, Serin ve Theronin bakımından zengin bir peptit zinciridir. Bu dizi hücre içinde kısa yarı ömrüne sahip proteinler ile ilişkilidir. PEST dizilerinde ki amino asitler genelde pozitif yüklüdür. PEST dizilerinin protein yıkımı için bir sinyal peptit olduğu düşünülmektedir [107-108]. Protein yıkımındaki bir diğer unsur 1986 yılında Alexander Varshavsky ve arkadaşları tarafından keşfedilen 'N end rule' kuralıdır. Bu kural ubikitinlenme ile ilişkilidir. Kural bir proteinin N-terminal amino ucundan tamamen yıkımına kadar geçen süre bu proteinin yarı ömrünü ifade eder. Ancak ökaryot ve prokaryot organizmalarda amino asitlerin yıkım süresi değişmektedir. N-terminal'de bulunan amino asit modifikasyonu ve değişkenlikler bu farklılığa neden olabilmektedir. Ancak proteinlerin, yarılanma ömrü tahmini

olarak bu kuraldan çıkarılabilir [109]. *S.cerevisiae*'de N-terminalde ki amino asitlerin bozulma yarı ömrü Metiyonin, Glisin, Alanin, Serin, Treonin, Valin, Prolin için 20 saat; İzolösin, Glütamik asit için 30 dakika; Tirozin, Glütamin için 10 dakika; Lösin, Fenilalanin, Aspartik Asit, Lizin için 3 dakika; Arjinin için 2 dakikadır. Memeli sistemlerinde N-terminalde ki amino asitlerin bozulma yarı ömrü Valin için 100 saat; Metionin, Glisin için 30 saat; Prolin için 20 saat; İzolösin için 20 saat; Treonin için 7.2 saat; Lösin için 5.5 saat; Alanin için 4.4 saat; Histidin için 3.5 saat; Triptofan için 2.8 saat; Tirozin için 2.8 saat; Serin için 1.9 saat; Asparajin için 1.4 saat; Lizin için 1.3 saat; Sistein için 1.2 saat; Aspartik asit 1.1 saat; Fenilalanin için 1.1 saat; Glutamik asit için 1.0 saat; Arjinin için 1.0 saat; Glütamin için 0.8 saat'dir [109].

Çalışmamızın konusu olan PSMD4 (26S proteazom non-ATPase subunit S5a) genidir. PSMD4 geni insan genomunda kromozom 1'in q kolunun 21.3 bölgesinde yer almaktadır. Bu gen 26S proteazomun alt ünitesi olan 19S düzenleyici partikülde bulunan proteini kodlamaktadır. Poliubikitinlenen proteinlerin yıkımından sorumludur [64].

PSMD4 geninin kodladığı 3 protein bulunmaktadır. Bu proteinler S5a, ASF ve Angiosidin'dir. Data analizi yapıldığında S5a ve ASF proteinlerinin amino asit dizilimleri aynıdır. Ancak angiosidin proteini bu iki proteinden karboksil ucunda bulunan fazla 3 amino asit ile farklılık göstermektedir. Amino asit dizilimdeki bu farklılık genel yapısında değişikliğe sebep olmamaktadır. Ancak S5a ve ASF proteinlerinin amino asit dizilimleri tamamen aynı iken işlevleri birbirinden oldukça farklıdır. Angiosidin ve S5a arasındaki farklılığa rağmen genel işlevleri konusunda benzerliklere rastlanmıştır [65].

Bu proteinlerde ASF; memelilerde plazma ve diğer akıcı dokulardan salgılanan bir proteindir. Kanıtlanmış salgı kesici ve anti-enflamatuar aktivitesi bulunmaktadır [76].

S5a proteini ise; 26s proteazom enzim kompleksinin internal poliübikitin tanıma alt birimidir. Proteazom enzim kompleksini bağlar. Hedef proteinlerin yıkımı için sinyal yollar. Poliübikitinlenmiş proteinlerin yıkımından sorumludur [66].

Angiosidin proteini hücreler arası matrikste salgılanmaktadır. Angiosidin TSP-1 proteinin tip1 domaininde bulunan CSVTCG domainine bağlanarak bu proteinin anti-anjiogenik yeteneği kazandırdığı kanıtlanmıştır [78]

Literatürde bu 3 proteinin kanserle ilişkisine bakıldığında yapılan çalışmalardan S5a ve Angiosidin proteinlerin kanserde önemli işlevlerinin olduğu görülmüştür. Ancak iki proteinin hücrede ki çalışma mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Yapılan çalışmalarda; S5a ve Angiosidin proteinlerin birbirine benzer görevlerinin olduğu görülmüştür. Özellikle Angiosidin ve S5a'nın benzer amino asit dizilimi, Angiosidin'in S5a'ya benzer poliubikitinleşme süresindeki işlevi sebebiyle araştırmacıları S5a ve kanser arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönlendirmiştir [67].

S5a ve Angiosidin'in kanserler ile önemli ilişkileri bizi PSMD4 geni incelemeye yönlendirmiştir. Literatür çalışmalarımız sırasında PSMD4 geninin normal ve hipoksik koşullardaki regülasyonu hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bulunan tek çalışmada 2007 yılında Lewitzski ve arkadaşları; PSMD4 geninin promotor bölgesinde hipoksi response element (HRE) domainin bulunduğu biyoinformatik olarak gösterilmiştir. Ancak ayrıntılı bir deneysel yaklaşım sunulmamıştır. Hipoksik koşullar kanser hücreleri açısından oldukça önemli bir durumdur. Hipoksik koşullarda birçok geninin işleyişi değişmektedir. Bu sebepten dolayı PSMD4 geninin hipoksik koşullardaki regülasyonunu araştırmak kayde değer veriler sunacaktır.

Bu kapsamda çalışmalarımızda ilk olarak PSMD4 geninin farklı hücre hatlarındaki ekspresyon profilini ortaya çıkardık. Literatürde akut myeloma lösemi, karaciğer kanseri, meme kanseri, serviks kanseri ve epitelyum hücrelerinde PSMD4 ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Tez kapsamında; Hep-3B (karaciğer karsinomu), DU-145 ve PC-3 (İnsan prostat karsinom hücreleri), MCF7 (meme karsinom hücreleri), Mg63 ve Saos-2 (İnsan kemik karsinom), HT-29 (İnsan kolon karsinom), PANC (İnsan pankreas karsinom), HUVEC (İnsan umbilikal epitelyum hücresi), HeLa (serviks kanseri)'inde PSMD4 ekspresyon profili incelenmiştir. İncelenen tüm hücre hatlarında PSMD4 ifade olmaktadır. Ekspresyon profili analizi sonucu PSMD4 geninin PC-3 hücre hattında daha çok ekspresyon gösterdiğini ancak DU-145 hücre

hattında ise ekspresyonun oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. PC-3 ve DU-145 hücre hatları androjen bağımsız prostat karsinomudur. Ancak PC-3 hücre hattı DU-145'e kıyasla oldukça agresif ve yayılıgandır. Bir diğeri yüksek ekspresyon seviyesi normal bir hücre hattı olan HUVEC hücrelerinde gözlenmiştir. PC-3 kanser hücre hattıdır ancak HUVEC sağlıklı hücredir.

Hipoksi; O₂ oranının azalmasıdır. Hipoksiyaya cevap olarak hücreler bu duruma adapte olabilmek için anjiyogenez, eritrosit üretimi, hücre hayatta kalması ve metabolizmayı kapsayan genlerin transkripsiyon seviyelerini değiştirirler. Bu koşullarda HIF-1 ve HIF-2 genleri aktive olur [92]. Hipoksik ortam O₂ oranını azalmasıyla ve CoCl₂ kullanılarak kimyasal yollarla hipoksik ortam oluşturulabilmektedir.

Hipoksiyanın çalışma prensibi; Prolin hidroksilazlar oksijenin yeterli olduğu durumlarda HIF-1 α 'ya bağlanarak aktivitesini durdurur. Görevini yapamayan HIF proteini proteazomlarda yıkılır [84]. Ancak O₂ yetersizliğinin olduğu durumlarda prolin hidroksilazlar HIF-1 α 'ya bağlanamaz. CoCl₂'de kimyasal yolla O₂ yetersiz bir ortam sağlar. Prolin hidroksilazlar HIF-1 α 'ya bağlanmaz ve protein aktif hale geçer. Oksijen yetersizliği seviyesine ulaşarak, hipoksi ile regüle olan genlerin transkripsiyonlarını etkiler [95-96].

PSMD4 geninin hipoksik ortamda regülasyonu hakkında tek bilgi Dimitrov ve ekibinin yaptığı çalışmada bulunmaktadır. Bu çalışmada PSMD4 promotörün incelenen bölgesinde hipoksi response element (HRE) domainin bulunduğu biyoinformatik olarak gösterilmiştir. Çalışmamız kapsamında ilk olarak biyoinformatik olarak HRE bölgeleri analiz edilmiştir. En büyük promotör parçası (-617/+65) bp'de 4 adet HRE bölgesi bulunmaktadır. (-216/+65) bp'lik promotör parçası ve (-85/+65) bp en küçük promotör parçası 1 adet HRE bölgesi bulundurmaktadır. Ayrıntılı olarak tüm biyoinformatik sonuçlara EK-B kısmında incelenebilir.

Çalışmamızda PC-3 ve HUVEC hücre hatlarında PSMD4 geninin ekspresyon seviyesi yüksek olarak tespit edildiği için bu hücre hatları model olarak seçilmiştir. Geninin hipoksik koşullardaki durumunu inceleyebilmek için hücrelere CoCl₂ kullanılarak kimyasal hipoksiya oluşturulmuştur. Hipoksik koşulların PC-3 ve

HUVEC proliferasyonuna etkisini araştırabilmek için ilk olarak hücrelere MTT testi uygulanmıştır. PC-3 hücre hattında 24 saat’de normoksik ortamda proliferasyonun diğer saatlere göre yüksek olduğu görülmüştür. Hipoksik ortamdaki hücre proliferasyonu ise 24 saat’de diğer saatlere ve aynı saatteki normoksik koşullara göre yüksektir. Erken saat dilimlerinde PC-3 hücre hattında hipoksik koşulların hücre proliferasyonunun etkisi gözlenmemiştir. HUVEC hücre hattının MTT testi sonrasında hücre proliferasyonunun hipoksik ortamdan etkilendiği gözlenmiştir. Normoksik ve hipoksik koşullarda erken saatlerde hipoksik koşulların hücre proliferasyonu azaltıcı yönde etki gösterdiği gözlenmiştir. 24, 48 ve 72 gibi geç saat dilimlerinde ise azaltıcı etkinin arttığı görülmüştür.

PC-3 ve HUVEC hücrelerinde PSMD4 geninin mRNA ve protein düzeyinde hipoksik ve normoksik ortamdaki durumu incelenmiştir. Her iki hücre hattında da öncelikli olarak hipoksik ortamın oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla HIF1 α hipoksik ortamın belirteci olan ve hipoksik ortamda regülasyonu artan genin ekspresyonuna bakılmıştır. Hipoksik ortamdaki ekspresyonun normoksik ortama göre artığı gözlenmiştir. Hücrelerde erken saatlerde hipoksik ortamın daha güçlü oluşmakta olduğu görülmüştür. PC-3 hücre hattındaki hipoksik ve normoksik ortamda PSMD4 geninin mRNA ve protein ekspresyonunu incelediğimizde; erken saatlerde protein ekspresyonunun artığı gözlenmiştir. PC-3 hücre hattında PSMD4 mRNA ekspresyonunda ki artışın; erken saatlerde olduğu görülmüştür. HUVEC hücre hattındaki hipoksik ve normoksik ortamda PSMD4 geninin mRNA ve protein ekspresyonunu incelediğimizde ise; mRNA ekspresyonunun normoksik ortamda hipoksik ortama göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu artış erken saatlerde daha yüksektir. İlerleyen saatlerde hücre proliferasyonuna bağlı hipoksik seviyede azalma olabileceği dikkat çekicidir. Protein ekspresyonu ise hipoksik ortamda 24 saatte yüksektir.

PSMD4 promotörü hakkında tek çalışma 2007 yılında Lewitzki ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmada promotör klonlanmış ve bazı transkripsiyon faktörleri ile bu bölge arasındaki ilişki incelenmiştir. Bizde tez kapsamında PSMD4 promotörü biyoinformatik inceleyerek (-617/+65), (-261/+65), (-85/+65) promotör parçalarını oluşturduk. Bu parçaları PZR koşullarında çoğaltarak ilk olarak pGEMT-Easy vektörüne klonlanmıştır. Ardından pMET-Luc lusiferaz

haberci vektöre alt klonlama yapılmıştır. Klonlama sonrasında PC-3 hücrelerine PSMD4 promotor parçaları geçici transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonrası lusiferaz–seap ölçümleri yapılarak analiz edildi. İlk kez tarafımızca PSMD4 promotor parçaları oluşturulmuş ve bu parçaların bazal ve hipoksik ortamdaki aktiviteleri ölçülmüştür. Ölçüm sonrasında 150 bç'lik (-85/+65) en küçük PSMD4 promotor parçası en aktif bölge olduğu görülmüştür. Bu parçaların hipoksik ortamda aktiviteleri incelendiğinde ise; en küçük PSMD4 promotor parçası 150 bç (-85/+65) 'nin en aktif olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3-25'de PSMD4 promotor parçalarının HRE domaini biyoinformatik olarak gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmalarda ise PSMD4 parçalarının bazal ve hipoksik ortamda en aktif parçası 150 bç'lik bölgesi olduğu gösterilmiştir. Bu bölgeye bağlanan HIF-1 α kanıtlamak amacıyla EMSA primerleri tasarlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarımızda bu bölgeyi EMSA çalışmaları ile kanıtlamayı amaçlamaktayız.

Tez kapsamında yaptığımız bir diğer çalışma ise; PSMD4 geninin klonlanmasıdır. Bu amaçla PSMD4 geni PZR şartlarında çoğaltılmış ökaryot hücrelerde ekspresyon vektörü olarak kullanılan pcDNA 3.3 T.A Gateway topo vektörüne klonlanmıştır. Bir sonraki çalışmalarımızda planlarımız arasında olan kalıcı transfeksiyon amacıyla bu klon kullanılacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, CA., Krieger, M., Scott, MP., Zipursky, SL., Darnell, J. ,*Molecular cell biology*, 66–72, (2004).
- [2] Adams, J., “The proteasome: structure, function and role in the cell”, *Cancer Treat Rev.*, Suppl 1,3-9, (2003).
- [3] Etlinger, J.D., Goldberg, A.L.,“A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes”, *PNAS*, 74 (1), 54–8, (1977).
- [4] Ciehanover, A., Hod, Y, Hershko, A., "A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 81 (4),1100–5, (1978).
- [5] Goldknopf, I.L., Busch, H., "Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24", *PNAS*, 74 (3), 864–8, (1977).
- [6] Tanaka, K., Waxman, L., Goldbert, A.L., "ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin", *The Journal of Cell Biology*, 96 (6), 1580–5, (1983).
- [7] Hough, R., Pratt, G., Rechsteiner, M., "Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate", *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (17), 8303–13, (1987).
- [8] Hershko A., "Early work on the ubiquitin proteasome system, an interview with Avram Hershko", *Cell Death Differ*, 12 (9), 1158–61, (2005).
- [9] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Proteazom>, (12.01.2015).
- [10] Wang, J., Maldonado, M.A., "The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases", *Cell Mol Immunol*, 3, (4),255–61, (2006).
- [11] Rabl J., Smith D.M., Yu Y., Chang S.C., Goldberg A.L., Cheng Y., “Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases“, *Molecular Cell*, 30,360–368, (2008).
- [12] Smith D.M., Chang S.C., Park S., Finley D., Cheng Y., Goldberg A.L., “Docking of the proteasomal ATPases carboxyl termini in the 20S proteasome’s alpha ring opens the gate for substrate entry”, *Molecular Cell*, 27, 731–744, (2007).

- [13] Benaroudj N., Zwickl P., Seemuller E., Baumeister W., Goldberg A.L., "ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation", *Molecular Cell*, 11, 69–78, (2003).
- [14] Nelson J.E., Loukissa A., Altschuller-Felberg C., Monaco J.J., Fallon J.T., Cardozo C., "Up-regulation of the proteasome subunit LMP7 in tissues of endotoxemic rats", *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 135, 324–331, (2000).
- [15] Zwickl P., Ng D., Woo K.M., Klenk H.P., Goldberg A.L., "An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes", *J. Biol. Chem*, 274 (37), 26008–14, (1999).
- [16] Di C.D., "Human erythrocyte contains a factor that stimulates the peptidase activities of multicatalytic proteinase complex", *Italian journal of Biochem*, 213–224, (1992).
- [17] Piccinini M., Mostert M., Croce S., Baldovino S., Papotti M., Rinaudo M.T., "Interferon-gamma-inducible subunits are incorporated in human brain 20S proteasome", *Journal of Neuroimmunology*, 135–140, (2003).
- [18] Stratford, F.L., Chondrogianni, N., Trougakos, I.P., Gonos, E.S., Rivett, A.J., Demartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., "Proteasome response to interferon gamma is altered in senescent human fibroblasts", *FEBS Letters*, 3989–3994, (2006).
- [19] Tanaka, K., Ichihara, A., "Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159: 1309–1315, (1989).
- [20] Di, C.D., "Human erythrocyte contains a factor that stimulates the peptidase activities of multicatalytic proteinase complex", *Italian journal of Biochem*, 213–224, (1992).
- [21] Khor, B., Bredemeyer, A.L., Huang, C.Y., Turnbull, I.R., Evans, R., Maggi, L.B. Jr., et al., "Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis", *Molecular and Cellular Biology*, 26, 2999–3007, (2006).
- [22] Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt G., Rechsteiner, M., "PA200 a nuclear proteasome activator involved in DNA repair", *EMBO Journal*, 21, 3516–3525, (2002).
- [23] Jung, T., Grunen, T., "The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I-structure of proteasomes", *Redox Biology* 1, 178–182, (2013).

- [24] Tanaka, K., et al., "Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes", *EMBO Journal*, Vol.19 No.15 pp., 4144-4153, (2000).
- [25] Uyanıkgil, Y., Sümer Turanlıgil, C., "Ubikitin-Proteozom Yolağının Karsinogenezdeki Rolü", *ARŞİV*, 19: 36, (2010).
- [26] Rape, M., Jentsch, S., Jentsch, "Taking a bite: proteasomal protein processing", *Nat Cell Biol*, 4 (5): E113–6, (2002).
- [27] Asher, G., Reuven, N., Shaul, Y., "20S proteasomes and protein degradation by default", *BioEssays*, 28 (8): 844–9, (2006).
- [28] Shringarpure, R., et al., "Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome", *J Biol Chem*, 278 (1), 311–8, (2003).
- [29] Hanahan, D., Weinberg, R.A., "The Hallmarks of Cancer", *Cell*, 100; 57, (2000).
- [30] Yıldırım, H., Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [31] Türkoğlu, S., İnsan ADAMTS-1 Geninin Transkripsiyonel Regülasyonu, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2012).
- [32] Chesnel, F., et al., "Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of *Xenopus laevis* embryos", *Cell Cycle*, 5 (15), 1687–98, (2006).
- [33] Brito, DA., Rieder CL., Rieder, "Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint", *Curr Biol*, 16 (12), 1194–200, (2006).
- [34] Havens, CG., et al., "Regulation of late G1/S phase transition and APC Cdh1 by reactive oxygen species", *Mol Cell Biol*, 26 (12), 4701–11, (2006).
- [35] Bashir, T., et al., "Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase", *Nature*, 428 (6979), 190–3, (2004).
- [36] Higashitsuji, H., et al., "The oncoprotein gankyrin negatively regulates both p53 and RB by enhancing proteasomal degradation", *Cell Cycle*, 4 (10), 1335–7, (2005).
- [37] Haas, AL., et al., "Coordinated induction of the ubiquitin conjugation pathway accompanies the developmentally programmed death of insect skeletal muscle". *J Biol Chem* 270 (16), 9407–12, (1995).

- [38] Schwartz, LM., et al., "Activation of polyubiquitin gene expression during developmentally programmed cell death", *Neuron*, 5 (4); 411–9, (1990).
- [39] Löw, P., et al., "Expression of a 26S proteasome ATPase subunit, MS73, in muscles that undergo developmentally programmed cell death, and its control by ecdysteroid hormones in the insect *Manduca sexta*", *FEBS Lett*, 400 (3), 345–9, (1997).
- [40] Pitzer, F., et al., "Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death", *FEBS Lett*, 394 (1), 47–50, (1996).
- [41] Adams, J., et al., "Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents", *Cancer Res.*, 59 (11), 2615–22, (1999).
- [42] Orłowski, RZ., "The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis", *Cell Death Differ*, 6 (4), 303–13, (1999).
- [43] Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G.; Brunet; Didelot; Zermati; Schmitt; Kroemer, "Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties", *Cell Cycle*, 5 (22), 2592–601, (2006).
- [44] Park, SH., et al., "The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system", *Mol Biol Cell*, 18 (1), 153–65, (2007).
- [45] Bader, N., Grune, T., et al., "Protein oxidation and proteolysis", *Biol Chem*, 387 (10–11), 1351–5, (2006).
- [46] Haas, AL., et al., "Coordinated induction of the ubiquitin conjugation pathway accompanies the developmentally programmed death of insect skeletal muscle", *J Biol Chem*, 270 (16), 9407–12, (1995).
- [47] Davies, K.J., "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome", *Biochimie*, 83 (3–4), 301–10, (2003).
- [48] Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, AF., Rock, KL., Goldberg, AL., et al., "26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide", *EMBO J.*, 20 (10), 2357–66 (2001).
- [49] Wang, J., Maldonado, M.A., et al., "The Ubiquitin-Proteasome System and Its Role in Inflammatory and Autoimmune Diseases", *Cell Mol Immunol*, 3 (4), 255–61, (2006).

- [50] Mallery, D.L., McEwan, W.A., Bidgood, S.R., Towers, G.J., Johnson, C.M., and James L. C., "Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21)", *PNAS*, 107 (46), 19985–19990, (2010).
- [51] Adams, J., et al., "Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents", *Cancer Res*, 59 (11), 2615–22, (1999).
- [52] Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., Schreiber, S.L., et al., "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin", *Science*, 268 (5211), 726–31, (1995).
- [53] United States Food and Drug Administration press release 2003. Access date 29 December 2006.
- [54] Fisher, R.I., et al., "Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma", *J Clin Oncol*, 24 (30), 4867–74, (2006).
- [55] Jakob, C., et al., "Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma", *Blood*, 109 (5), 2100–5, (2007).
- [56] Shah, S.A., et al., "26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer", *J Cell Biochem*, 82 (1), 110–22, (2001).
- [57] Nawrocki, S.T., et al., "The proteasome inhibitor bortezomib enhances the activity of docetaxel in orthotopic human pancreatic tumor xenografts", *Mol Cancer Ther*, 3 (1), 59-70, (2004).
- [58] Schenkein, D., "Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies", *Clin Lymphoma*, 3 (1), 49–55, (2002).
- [59] Messinger, Y.H., Gaynon, P.S., Spoto, R., van der Giessen, J., Eckroth, E., Malvar, J., Bostrom, B.C., "Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL)", *Blood*, 120 (2), 285-90, (2012).
- [60] Lambrou, G.I., Papadimitriou, L., Chrousos, G.P., Vlahopoulos, S.A., "Glucocorticoid and proteasome inhibitor impact on the leukemic lymphoblast: multiple, diverse signals converging on a few key downstream regulators", *Mol Cell Endocrinol*, 4, 351(2),142-51, (2012).
- [61] Laurent, N., et al., "Effects of the proteasome inhibitor ritonavir on glioma growth in vitro and in vivo", *Mol Cancer Ther*, 3 (2), 129–36, (2004).

- [62] Elliott, P.J., et al., "Proteasome inhibition: A novel mechanism to combat asthma", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104 (2 Pt 1), 294–300, (1999).
- [63] Verdoes, M., et al., "A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes in vitro and in vivo", *Chem Biol*, 13 (11), 1217–26, (2006).
- [64] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=human+psmd4>, (18.10.2014).
- [65] Dimitrov, S., Sabherwal, Y., Raymond, D.D., Heures, D.Z. L., Lu, Q., Tuszyński, GP., "Endothelial apoptotic activity of angiocidin is dependent on its polyubiquitin binding activity", *British Journal of Cancer*, 93, 662 – 669, (2005)
- [66] Hyung, T.K., Kwang, P.K., Uchiki, T., Gygi, S.P., Goldberg, A.L., "S5a promotes protein degradation by blocking synthesis of nondegradable forked ubiquitin chains", *EMBO J.*, 28 (13), 1867–1877, (2009).
- [67] Wang, Z., Fan, C., Zhou, H.F., Lu, J.S., Sun, M.J., Song, J.W., Le, Y., Jiang, H.D, Wang, L.H., Jiao B.H., "S5a binds to death receptor-6 to induce THP-1 monocytes to differentiate through the activation of the NF-kB pathway", *Journal of Cell Science*, 127, 3257–3268, (2014).
- [68] Greig, K. T., Carotta, S., Nutt, S. L., "Critical roles for c-Myb in hematopoietic progenitor cells", *Semin. Immunol.* 20, 247-256, (2008).
- [69] Suzuki, H., Forrest, A. R., van Nimwegen, E., Daub, C.O., Balwierz, P.J., Irvine, K. M., Lassmann, T., Ravasi, T., Hasegawa, Y., de Hoon, M. J., et al., "The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line", *Nat. Genet.*, 41, 553-562, (2009).
- [70] Ramsay, R.G., Gonda T. J., "MYB function in normal and cancer cells", *Nat. Rev. Cancer*, 8, 523-534, (2008).
- [71] Knopfova, L., Smarda, J., "v-Myb suppresses phorbol ester- and modifies retinoic acid-induced differentiation of human promonocytic U937 cells", *Neoplasma*, 55, 286-293, (2008).
- [72] McCann, S., Sullivan, J., Guerra, J., Arcinas, M. and Boxer, L. M., "Repression of the c-myb gene by WT1 protein in T and B cell lines", *J. Biol. Chem.*, 270, 23785-23789, (1995).
- [73] Sparks, A., Dayal, S., Das, J., Robertson, P., Menendez, S., Saville MK., "The degradation of p53 and its major E3 ligase Mdm2 is differentially dependent on the proteasomal ubiquitin receptor S5a ", *Oncogene*, 1–12, (2013).

- [74] Gus, Y., Karni, R., Levitzki, A., “Subunit S5a of the 26S proteasome is regulated by antiapoptotic signals”, *The Febs Journals*, 1742-4658, (2006).
- [75] Lonroth, I., Lange, S., Skadhauge, E., “The antisecretory factors: inducible proteins which modulate secretion in the small intestine”, *Comp Biochem Physiol*, 90, 611–617, (1988).
- [76] Ulgheri, C., Paganini, B., Rossi, F., “Antisecretory factor as a potential health-promoting molecule in man and animals”, *Nutrition Research*, 23; 300–313, (2010).
- [77] http://en.wikipedia.org/wiki/Thrombospondin_1, (03.03.2015).
- [78] Wakiyama, T., Shinoha, T., Shirakusa, T., John, A.S., Tuszynski, G.P., “The localization of thrombospondin-1(TSP-1), cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine (CSVTCG) TSP receptor, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in colorectal cancer”, *Histol Histopathol*, 16, 345-351, (2001).
- [79] Tuszynski, G.P., Rothman, V.L., Papale, M., Hamilton, B.K., Eyal, J., “Identification and characterization of a tumor cell receptor for CSVTCG, a thrombospondin adhesive domain”, *J Cell Biol*, 120, 513–521, (1993).
- [80] Zhou, J., Rothman, V. L., Sargiannidou, I., Dimitrov, S., Qiu, C., Smith, E., Sheffield, J., Sharma, M., Tuszynski, G.P., “Cloning and Characterization of Angiocidin, a Tumor Cell Binding Protein for Thrombospondin-1”, *Journal of Cellular Biochemistry*, 92, 125–146 ,(2004).
- [81] Yang, X., Rothman, V.L., L'Heureux, D.Z., Tuszynski, G., “Reduction of angiocidin expression in human umbilical vein endothelial cells via siRNA silencing inhibits angiogenesis”, *Experimental and Molecular Pathology*, 81, 108–114, (2006).
- [82] Sabherwala, Y., Rothman, V.L., Dimitrov, S., L'Heureux, D.Z., Marcinkiewicz, C., Sharma, M., Tuszynski, G.P., “Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates the anti-angiogenic and anti-tumor activities of angiocidin, a novel tumor-associated protein”, *Experimental Cell Research*, 312, 2443 – 2453, (2006).
- [83] Sabherwal, Y., Rothman, V.L., Poon R.T.P., Tuszynski, G.P., “Clinical significance of serum angiocidin levels in hepatocellular carcinoma”, *Cancer Letters*, 251, 28–35, (2007).
- [84] Liebig, C., Agarwal, N., Ayala, G. E., Verstovsek, G., Tuszynski, G.P., Albo, D., “Angiocidin Inhibitory Peptides Decrease Tumor Burden in a Murine Colon Cancer Model”, *Journal of Surgical Research* ,142, 320–326, (2007)

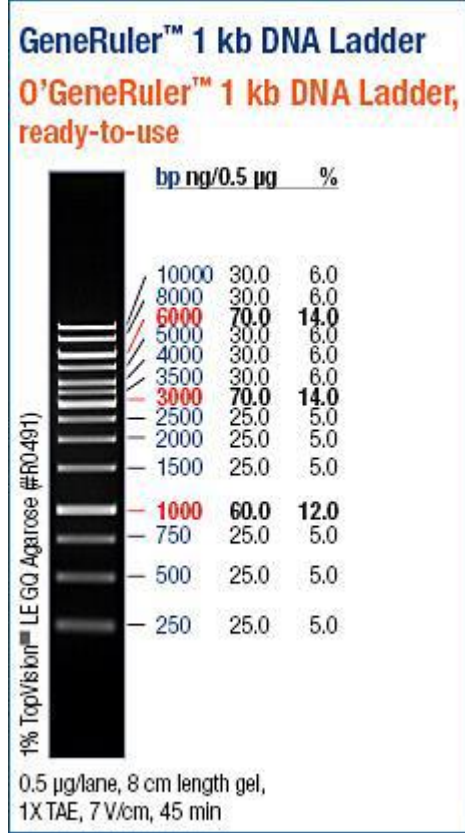
- [85] Hausser, A.G., Rothman, V.L., Dimitrov, S., “Differentiation of Monocytes to Macrophages The Novel Angiogenic Inhibitor, Angiocidin Induces”, *Cancer Res*, 68, 5905-5914, (2008).
- [86] Tuszynski, G.P, Rothman, VL., “Angiocidin induces differentiation of acute myeloid leukemia cells”, *Exp Mol Pathol.*, 95 (3), 249-54, (2013).
- [87] Liebig, C., Wilks, J. A., Feig, B.W., Wang, T. N, Wilson, M., Herdman, A.V., Albo, D., “The Role of Angiocidin in Sarcomas”, *Cancer*, 115, 5251–62, (2009).
- [88] L’Heureux, D.Z., Rothman, V.L., Tuszynski, G.P., “The interaction of angiocidin with tissue transglutaminase”, *Experimental and Molecular Pathology*, 88, 15–25, (2010).
- [89] Godek, J., Sargiannidou, I. , Patel, S., Hurd, L., Rothman, V.L., Tuszynski, G. P., “Angiocidin Inhibits Breast Cancer Proliferation Through Activation of Epidermal Growth Factor Receptor and Nuclear Factor κ B (Nf- κ B)”, *Exp Mol Pathol*, 90 (3), 244–251, (2011).
- [90] Koch, M., Wiese, M., “Gene expression signatures of angiocidin and darapladib treatment connect to therapy options in cervical cancer ”, *J Cancer Res Clin Oncol*, 1317-9, (2012).
- [91] Guan, XG., Guan, XQ., Feng, K., Jian, R., Tian, D., Tian, D., Tong, HB., Sun, X., “Reduction of angiocidin contributes to decreased HepG2 cell Proliferation”, *African Health Sciences* ,Vol 13, Issue 3, (2013).
- [92] Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., Poellinger, L., “Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 a by the Ubiquitin-Proteasome Pathway”, *J. Biol. Chem.*, 274, 6519-6525, (1999).
- [93] Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F., “Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein”, *Science*, 242, 1412–1415, (1988).
- [94] Wang, G.L., Semenza, G.L., “Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia”, *J Biol Chem*, 268; 21513–21518, (1993).
- [95] Torii, S., Okamura, N., Suzuki, Y., Ishizawa, T., Yasumoto, K., Sogawa, K., “Cyclic AMP represses the hypoxic induction of hypoxia-inducible factors in PC12 Cells”, *Journal of Biochemistry*, 11, (2009).
- [96] Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., Millhorn, D.E., “Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-inducible Factor- α and von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-inducible Factor”, *The journal of biological chemistry*, 278, 18, 15911–15916, (2003)

- [97] Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 5510–5514, (1995).
- [98] Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J., Poellinger, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 5667–5672, (1997).
- [99] Jiang, B.-H., Semenza, G. L., Bauer, C., Marti, H. H., Am. J. Physiol., 271, C1172–C1180, (1996).
- [100] Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., Bunn, H. F., J. Biol. Chem., 271, 32253–32259, (1996).
- [101] Salceda, S., Caro, J., J. Biol. Chem., 272; 22642–22647, (1997).
- [102] Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A., Nature, 360, 587–599, (1992).
- [103] Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M., Science, 234, 364–368, (1986).
- [104] Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J., J. Biol. Chem, 272, 11205–11214, (1997).
- [105] Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R., Semenza, G.L., J. Biol. Chem., 272, 19253–19260, (1997).
- [106] Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H. F., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 95, 7987–7992, (1998).
- [107] https://en.wikipedia.org/wiki/PEST_sequence (02.01.2016)
- [108] Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M., "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis", Science journal, 234 (4774), 364–8,(1986).
- [109] https://en.wikipedia.org/wiki/N-end_rule (02.01.2016)

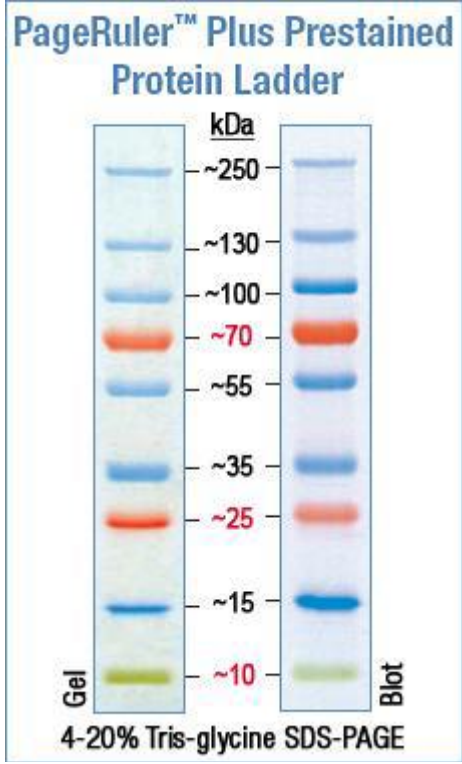
EKLER

6. EKLER

EK A Kullanılan Büyüklük Belirteçleri



Şekil A.1: Fermentas 1 kb DNA büyüklük belirteci.



Şekil A.2:PageRuler Prestained Protein büyüklük belirteci.

EK B PSMD4 Promotor Bilgileri

-617/+65 İnsan PSMD4 Promotor Bölgesini Kesmeyen Enzimler

AarI, AatII, AbsI, Accl, AclI, AflII, AflIII, AgeI, Ajul, AlfI, Alol, AlwNI, Apal, ApaLI, Arsl, Ascl, Asull, Avall, AvrII, BaeI, BamHI, BarI, Bccl, Bcgl, BciVI, BclI, Bdal, Bfil, BglI, BglII, BsaAI, BsaBI, BsePI, BseSI, Bsml, Bsp1407I, BspHI, BspMI, Bsrl, BsrBI, BstEII, BtgZI, Btrl, Cfr10I, Clal, CspCI, Drall, DrallI, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Fall, FokI, FseI, FspAI, HaeII, HaeIV, HindII, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MluI, MmeI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, Nrul, Nspl, OsiI, PacI, Pasi, PflMI, PmaCI, PmeI, Ppil, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, Scal, PI-Scel, SduI, SexAI, SfaNI, Sfil, Sgfl, SgrAI, SgrDI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, Sspl, Stul, Swal, TaqII, TatI, TsoI, Tsp45I, TspDTI, TstI, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

-617/+65 İnsan PSMD4 Promotor Bölgesi

```
TAGAAAGTCATTAGCGATCCCGACACTTTTTTTTTCTTTTTTGAGACGGAGTCTCACTCTGTCCCCC
AGGCTGGAGTGCACTGGCGGATCTCGGCTCACTGCAATCTCTGCCTCCCGGGTCAAGTAATTCTC
CTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCGGGATTACAGGCGTGCGCCACCATGCCCGGCTAATTTTTGTAT
TTTTAGTAGAGACAGGGTTTACCATGCTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCGC
CCGCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGCTAACAGGCGTGAGCCACCGCGCTCGGCCGATCCCGACAC
TTTTTAAATGCCGAAGCCGAATCGACACAGCACTTTCAAAGTTCCTCCATAGCTCCCCTGAGA
TCCGGCCAGCGGAAACCCCAACTGAGAACTGCAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTT
TTTTGTGTTACCGCGATTCCCTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTGGCGGCACCTACA
ACTCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATTG
GTGAAGAGCGACGGCCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCCGGGAGG
GAGGAAGGTGGCAAGATG
```

-261/+65 İnsan PSMD4 Promotor Bölgesini Kesmeyen Enzimler

AarI, AatII, AbsI, Accl, AclI, AflII, AflIII, AgeI, Ajul, AlfI, Alol, AlwNI, Apal, ApaLI, Arsl, Ascl, Asull, Aval, Avall, AvrII, BaeI, BamHI, BarI, BbvCI, Bccl, Bcgl, BciVI, BclI, Bdal, Bfil, BglI, BglII, BpII, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BsePI, BseSI, BseYI, BsgI, Bsml, Bsp1407I, BspHI, BspMI, Bsrl, BsrBI, BstEII, BstXI, BtgZI, Btrl, BtsI, Cfr10I, Clal, CspCI, Drall, DrallI, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, Esp3I, Fall, FokI, FseI, FspAI, Gsul, HaeII, HaeIV, HindII, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MluI, MmeI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, Nrul, Nspl, OsiI, PacI, Pasi, PflMI, PleI, PmaCI, PmeI, Ppil, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PsrI, PstI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, Scal, PI-Scel, SduI, SexAI, SfaNI, Sfil, Sgfl, SgrAI, SgrDI, Smal, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, Sspl, Stul, Styl, Swal, TaqII, TatI, TsoI, Tsp45I, TspDTI, TspRI, TstI, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XmnI

-261/+65 İnsan PSMD4 Promotor Bölgesi

```
GGAATCGACACAGCACTTTCAAAGTTCCTCCATAGCTCCCCTGAGATCCGGCCAGCGGGAAACCC
CAACTGAGAACTGCAATGGCAGGGAAAGTGGAGGCTAGATCCTGTTTTTGTGTTACCGCGATTCC
CTTCAACTACCCTCAAGACGCCTACAAATTTGTTGGCGGCACCTACAACCTCCAGAACGCAACGTG
GGGACGGAGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTGATTGGTGAAGAGCGACGGGCCAA
TTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCCGGGAGGGAGGAAGGTGGCAAGATG
```

-85/+65 İnsan PSMD4 Promotor Bölgesini Kesmeyen Enzimler

AarI, AatII, AbsI, AccI, AclI, AclI, AclI, AflIII, AflIII, Agel, AgsI, AjuI, Alfi, Alol, AlwNI, ApaI, ApaLI, Apol, Arsl, AscI, AsuII, Aval, Avall, AvrII, BaeI, BamHI, BarI, BbvCI, BccI, BcgI, BciVI, BclI, BdaI, BfiI, BglI, BglII, BplI, Bpu10I, BsaAI, BsaBI, BseMII, BsePI, BseSI, BseYI, BsgI, Bsml, Bsp1407I, BspHI, BspMI, Bsrl, BsrBI, BsrDI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtrI, BtsI, Cfr10I, ClaI, CspCI, DraII, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco47III, Eco57I, Eco57MI, EcoNI, EcoP15I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, Esp3I, Fall, Faul, FokI, FseI, FspAI, GsuI, HaeII, HaeIV, HgaI, HindII, HindIII, HpaI, KpnI, MauBI, MluI, MmeI, MslI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, Nrul, NspI, OsiI, PacI, PaeI, PflMI, PleI, PmaCI, PmeI, PpiI, PpuMI, PshAI, PsiI, PI-PspI, PspXI, PstI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, Scal, PI-Scel, SduI, SexAI, SfaNI, SfiI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, Sse8387I, SspI, StuI, StyI, SwaI, TaqII, TatI, Taul, TfiI, TsoI, Tsp45I, TspDTI, TspRI, TstI, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, XmnI

-85/+65 İnsan PSMD4 Promotor Bölgesi

TACAACCTCCAGAACGCAACGTGGGGGACGGAGGCGGAAGCAGCTGGCCAAGCCGAGGTCTGTG
ATTGGTGAAGAGCGACGGGCAATTGGAGGAGTTGTTGTTAGGCCGTCCCGGAGACCCGGTCCGGG
AGGGAGGAAGGTGGCAAGATG

Tüm İnsan PSMD4 Promotor Parçalarında Transkripsiyon Faktörlerin Bağlanma Motifleri

```

=====
( 0.. 59) tagaaagtcattagcgcgacactttttttttcttttttttgagacggagctcact
      23 32          ====GCN4==
      26 35          ====Hb===
      43 52          ====Sp1===
      56 65          ====
=====
( 60.. 119) ctgtccccaggctggagtgcaagtggcgcgatctcggctcactgcaatctctgcctcccc
      56 65 =GR===
      64 73 ====Sp1===
      94 103          ====ER===
      104 113          =C/EBPalp=
      108 119          ====Sp1====
      112 121          =AP-2alp
=====
( 120.. 179) ggttcaagtaattctctgcctcagcctcccagtagcggggattacaggcgtgcgccac
      112 121 h=
      129 138          =NF-kappaB
      132 141          ====E1===
      132 141          ====MyoD==
      134 145          ====AP-1===
      136 145          ==c-Jun==
      136 145          =C/EBPgam=
      138 147          =AP-2alph=
      140 149          ====Sp1===
      177 189          ==
=====
( 180.. 239) catgccggctaattttttgtatttttagtagagacagggtttcaccatgctggccaggc
      177 189 ==Sp1====
      191 200          ====Hb===
      195 204          ==HNF-3==
      230 239          =AP-2alph=
=====
( 240.. 299) tggtctcgaactcctgacctcgtgatccgcccgcttgccctccaaagtgctgggctaa
      251 260          ==RAR-beta
      252 261          =RXR-alpha
      256 265          ====USF===
      263 275          ====Sp1====
      270 282          ====Sp1====
=====
( 300.. 359) caggcgtgagccaccgcgctcggccgatcccgcacttttttaaagtccgaagccggaa
      332 341          ====Hb===
=====
( 360.. 419) tcgacacagcactttcaaaggttctccatagctcccctgagatccggccagcgggaaac
      391 400          =AP-2alph=
      392 401          ====Sp1====
      404 413          ====Sp1===
      405 414          ====NF-1==
      413 422          =NF-kap
      413 422          ====Rel
      414 423          =NF-ka
=====

```

```

( 420.. 479)   cccaactgagaactgcaatggcagggaaagtggaggctagatcctgtttttgtgttacc
                413 422   paB
                413 422   A==
                414 423   ppaB
                436 445           ====REB1==
                439 448           =NF-kappaB
                443 452           ====Sp1====
                449 458           ====Sp1====
                450 459           =represso=
                464 473                               ====Hh====

( 480.. 539)   gcgattcccttcaactaccctcaagacgcctacaaatttgtttggcgacactacaactc
                513 522           =C/EBPalp=
                514 523           ===Oct-1==
                520 529           ====NF-1==
                521 530           =represso=
=====
( 540.. 599)   ccagaacgcaacgtgggggacggaggcgggaagcagctggccaagccgaggtctgtgattg
                552 565           ====Sp1====
                559 571           ====Sp1====
                570 579           ====MyoD==
                574 584           ====NF-1==
                592 601                               ====CTF=
=====
( 600.. 659)   gtgaagagcgacgggccaattggaggagttgtttaggccgtcccggagaccgggtcgg
                592 601   ==
                610 619           ====NF-1==
                618 630           ====Sp1====
                637 647           ====Sp1====
                657 668                               ===
                658 667                               ==

( 660.. 719)   gagggaggaaggtggcaagatg
                657 668   ==Sp1====
                658 667   ==ETF==
                661 670   ====PU.1==

```

EK C PSMD4 Geni Bilgileri

PSMD4 mRNA Dizisi

1 aattggagga gttgttgta ggccgtcccg gagaccggg cgggagggag gaaggtggca
61 agatggtgtt ggaaagcact atggtgtgtg tggacaacag tgagtatatg cggaatggag
121 acttcttacc caccaggctg caggcccagc aggatgctgt caacatagtt tgcattcaa
181 agaccgcag caaccctgag aacaactgg gccttatcac actggctaact gactgtgaag
241 tgctgaccac actcaccaca gacctggcc gtatcctgtc caagctacat actgtccaac
301 ccaagggcaa gatcaccttc tgcacgggca tccgcgtggc ccatctggct ctgaagcacc
361 gacaaggcaa gaatcacaag atgcgatca ttgcctttgt gggaagccca gtggaggaca
421 atgagaagga tctggtgaaa ctggctaaac gcctcaagaa ggagaaagta aatgttgaca
481 ttatcaattt tggggaagag gaggtgaaca cagaaaagct gacagccttt gtaaaccagt
541 tgaatggcaa agatggaacc ggttctcatc tggtagacagt gcctcctggg cccagtttg
601 ctgatgctct catcagttct ccgattttgg ctggtgaagg tggtagcatg ctgggtcttg
661 gtgccagtga ctttgaattt ggagtagatc ccagtgtga tctgagctg gccttgcccc
721 ttcgtgtatc tatggaagag cagcggcagc ggcaggagga ggaggcccgg cgggcagctg
781 cagcttctgc tgctgaggcc gggattgcta cgactgggac tgaagactca gacgatgccc
841 tgctgaagat gaccatcagc cagcaagagt ttggccgac tgggcttct gacctaagca
901 gtatgactga ggaagagcag attgcttatg ccatgcagat gtcctgcag ggagcagagt
961 ttggccaggc ggaatcagca gacattgatg ccagctcagc tatggacaca tctgagccag
1021 ccaaggagga gtagtattac gacgtgatgc aggaccccga gttccttcag agtgcctag
1081 agaacctccc aggtgtggat cccaacaatg aagccattcg aatgctatg ggctccctgg
1141 cctcccaggc caccaaggac ggcaagaagg acaagaagga ggaagacaag aagtgagact
1201 ggagggaaag gtagctgag tctgcttagg ggactgcatg ggaagcacgg aatatagggt
1261 tagatgtgtg ttatctgtaa ccattacagc ctaaataaag cttggcaact tttttcctt
1321 ttttgctca aa

PSMD4 Genini Kesmeyan Enzimler

AarI, AatII, AbsI, Accl, AclI, Acyl, AfIII, Ajul, AlfI, ApaLI, AscI, AvrII, BaeI, BarI, Bcgl, BclI, BglII, BpII, BsePI, BsmI, Bsp1407I, BspHI, BspMI, BstEII, BstXI, BtgZI, BtsI, ClaI, CspCI, DraIII, DrdI, Eam1105I, Eco31I, EcoRI, Esp3I, FseI, GsuI, HaeII, HaeIV, Hgal, HindIII, KpnI, MauBI, MfeI, MluI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NmeAIII, NotI, NspI, PacI, PaeI, PfoI, PI-PspI, PspXI, PstI, PvuI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SanDI, PI-SceI, SexAI, SgfI, SgrAI, SgrDI, SpeI, SphI, TaqII, Tatl, TspGWI, Tth111I, VspI, XbaI, XhoI